



Tesis Doctoral

Control transcripcional del fenotipo pineal: interacción entre factores bHLH y CREB

Tesis para optar al grado de Doctora en Neurociencias
Doctoranda: Lic. Luz Estefania Farias Altamirano.
Directora: Dra. Estela Maris Muñoz.
Codirector: Dr. Mario Eduardo Guido.

Lugar de Trabajo
Instituto de Histología y Embriología de Mendoza
“Dr. Mario Burgos” (IHEM)-UNCuyo-CONICET

COMISIÓN ASESORA

- Dra. Agata Rita Carpentieri. INICSA-CONICET, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Dr. Eduardo Garbarino Pico. CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Dr. Mario Eduardo Guido. CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Dra. Estela Maris Muñoz. IHEM-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:Aclaración.....

Firma:Aclaración.....

Firma:Aclaración.....

*'Time is too slow for those who wait,
too swift for those who fear,
too long for those who grieve,
too short for those who rejoice,
but for those who love, time is eternity'*

Henry Van Dyke

Agradecimientos

A mi directora la Dra. Muñoz, por estos 5 años de trabajo constante, por su apoyo, paciencia, dedicación, y por indicarme el camino a la excelencia científica, gracias.

Al comité de tesis, la Dra. Carpentieri y el Dr. Garbarino Pico, por sus consejos y sugerencias y su buena predisposición para ayudar siempre.

Al Dr. Guido, por acceder a ser mi codirector de tesis y acompañarme en todo este camino.

A todos los integrantes del doctorado de Neurociencias de la Universidad Nacional de Córdoba, por aceptarme como alumna de posgrado y por su amabilidad durante todo el proceso.

Al IHEM y sus integrantes, por permitirme formar parte del equipo y en especial al personal de apoyo por tanta ayuda y cariño recibido durante estos años.

Al Dr. Mirmira (EE.UU.) y al Dr. Rath (Dinamarca), y a los integrantes de sus laboratorios, por abrir sus puertas, por sus enseñanzas y por hacerme sentir como una más. Han sido generadores de recuerdos inolvidables.

A AGENCIA, CONICET y la comisión Fulbright, por abrir nuevas puertas hacia mi crecimiento profesional y personal.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir cada día la aventura de investigar y enriquecer esta maravillosa experiencia.

A mi familia y amigos, por ser pilar en mi vida, por apoyar incondicionalmente mis decisiones y ser partícipes de este viaje.

Publicaciones científicas asociadas con este trabajo de tesis doctoral

- Castro, A.E., Benitez, S.G., **Farias Altamirano, L.E.**, Savastano, L.E., Patterson, S.I., Muñoz, E.M. (2015). Expression and cellular localization of the transcription factor NeuroD1 in the developing and adult rat pineal gland. *Journal of Pineal Research*, 58(4): 439-451. doi: 10.1111/jpi.12228.
- Yu, H., Benitez, S.G., Jung, S.R., **Farias Altamirano, L.E.**, Kruse, M., Seo, J.B., Koh, D.S., Muñoz, E.M., Hille, B. (2016). GABAergic signaling in the rat pineal gland. *Journal of Pineal Research*, 61(1):69-81. doi: 10.1111/jpi.12328.
- **Farias Altamirano, L.E.**, Freites, C.L., Vásquez E., Muñoz, E.M. (2018). Signaling within the pineal gland: a parallelism with the central nervous system. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.11.004
- **Farias Altamirano, L.E.**, *et al.* (2019). Daily dynamics of the transcription factor CREB uncovered cellular heterogeneity within the rat pineal gland. En preparación.

RESUMEN

La glándula pineal (GP) forma parte del sistema circadiano y, a través de la síntesis y liberación de melatonina nocturna, modula la fisiología y el comportamiento de los organismos. Por años se ha considerado que la GP es un órgano homogéneo en término de las células que la componen, las moléculas que se expresan y las funciones que cumple. Estudios recientes a nivel transcriptómico y proteómico han contribuido a desterrar ese paradigma. En el presente trabajo de tesis doctoral se postuló la hipótesis de que los factores de transcripción (FTs) NeuroD1 y CREB actuarían cooperativamente regulando el transcriptoma de la glándula pineal. Esta tesis incluyó múltiples estrategias para el análisis de la expresión génica: transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), *Real Time* PCR e hibridación *in situ* radiactiva (HIS), y proteica: Western blot (WB) e inmunohistoquímica (IHQ) seguida de microscopía confocal y análisis morfométrico; de interacción entre proteínas: coimmunoprecipitación (CoIP), y de éstas con secuencias génicas específicas: ensayo de la luciferasa en la GP de rata y órganos controles. Con el uso de IHQ, observamos que CREB se encuentra en los núcleos de todos los linajes celulares que conforman la GP, siendo su distribución espacial diferente entre pinealocitos y células intersticiales. En los pinealocitos, se observaron diferencias en la disposición espacial de CREB, entre ellos, en un mismo ZT (*Zeitgeber time*) y a lo largo del ciclo L:O, presentando una mayor dispersión durante la fase de oscuridad. Además, el desafío quirúrgico de la extirpación de los ganglios cervicales superiores (GCSx) que inervan a la GP reveló un aumento en la distribución espacial del FT en pinealocitos durante la noche temprana (ZT14), con respecto a lo que ocurrió en animales controles y falsamente operados (FO). El uso de la ARN polimerasa II fosforilada (pPOLII) nos permitió concluir que la GP se encuentra transcripcionalmente activa durante el día y la noche. El análisis de la abundancia de CREB no mostró variaciones diarias en la GP: la proteína total se pudo identificar sin diferencia entre los ZTs analizados. En cuanto a NeuroD1, los niveles del transcripto y de la proteína no manifestaron variaciones diarias en la GP. En referencia a la interacción entre los FTs, la técnica de CoIP evidenció que NeuroD1 y CREB son capaces de coprecipitar durante la fase de luz (ZT6) en la GP y el cerebelo (Ce), órgano control. Ensayos de regulación de la transcripción mediada por CREB y NeuroD1 en una línea celular no pinealocítica señalaron que NeuroD1 modularía positivamente al promotor del gen *Aanat*, y que la combinación NeuroD1+E47 promovería la expresión de dicho gen en condición basal y bajo el efecto de norepinefrina (NE). En el caso de CREB, solo o en las combinaciones NeuroD1+CREB y NeuroD1+CREB+E47, exhibió un efecto modulador negativo sobre el promotor del gen *Aanat*, y el tratamiento con NE no produjo la activación de dicho promotor como ocurriría *in vivo* en la GP. El ensayo de la luciferasa demostró también que el FT NeuroD1 y la combinación NeuroD1+E47+Pdx1 modulan positivamente al promotor del gen de *Ins* (cinco copias del potenciador E2/A3) en una línea celular

no pancreática. En la GP de rata se examinó además, la expresión de potenciales genes blanco para NeuroD1, incluidos los de la vía de síntesis de melatonina e insulina. La expresión del gen *Aanat* se evidenció únicamente durante la noche (ZT18), mientras que las enzimas Tph1 e HIOMT mostraron diferencias sutiles en su expresión durante las fases de luz (ZT6) y de oscuridad (ZT18). Por otro lado, transcritos de los componentes de la vía de señalización de insulina: *Ins1*, *Cpe* e *Insr* se hallaron expresados durante el día y la noche, sin variaciones diarias. Por HIS, se identificó el transcrito del *Insr* en GP, cerebelo e hipocampo, sin diferencias diarias. Por *Real Time* PCR, un método de mayor sensibilidad, se corroboró la presencia del gen de *Ins1* en GP, Ce y células Min 6 productoras de *Ins* a ZT6. La GP presentó niveles mayores del transcrito en comparación con cerebelo. Además de caracterizar a NeuroD1 en la GP, se utilizó el páncreas para realizar un análisis comparativo de la presencia de ésta y otras moléculas importantes en su homeostasis y en la de la GP. Se halló que las proteínas NeuroD1, Pax6 e *Ins* se encuentran en los islotes pancreáticos de Langerhans, específicamente en las células β , a ZT6. Seguido, se investigó la proteína *Ins* en la GP mediante IHQ, y no se logró su identificación. De los resultados documentados aquí, podemos concluir que la GP es un órgano con elevada heterogeneidad y complejidad, y que CREB y NeuroD1 modularían la expresión de genes involucrados en la producción de melatonina, incluido *Aanat*, y otros relacionados con el mantenimiento y homeostasis del fenotipo pineal, como *Ins*. Es nuestro deseo que estos aportes contribuyan a un mejor entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar dentro de la GP, aún cuando sean mediados por moléculas comunes entre el sistema nervioso central (SNC) y otros órganos endócrinos. Además, esperamos que el conocimiento generado en este trabajo sea trasladable al campo de la medicina, y útil en el desarrollo de nuevas metodologías para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades. Entre ellas, podemos mencionar trastornos relacionados con desórdenes circadianos y metabólicos, como la diabetes, y enfermedades neurodegenerativas.

SUMMARY

The pineal gland (PG) is part of the circadian timing system and, through the production and release of nocturnal melatonin, modulates the physiology and behavior of organisms. For years, the PG has been considered a homogeneous organ in terms of cell composition, expressed molecules, and function. Recent transcriptomic and proteomic studies have contributed to dismiss this paradigm. In this Ph.D. thesis we proposed the hypothesis that the transcription factors (TFs) NeuroD1 and CREB regulate cooperatively the PG's transcriptome. To test our proposal in the rat PG and control organs, we have applied multiple strategies, including gene expression techniques, such as reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Real Time PCR and radioactive *in situ* hybridization (ISH); analysis of protein expression and cellular and subcellular distribution via Western blot (WB) and immunohistochemistry (IHC) followed by confocal microscopy and morphometric assays; protein-protein interactions using coimmunoprecipitation (CoIP), and protein-DNA regulatory element interactions by the *in vitro* luciferase method. Using IHC, we have identified CREB in all the nuclei within the PG, although its spatial distribution was different between pinealocytes and interstitial cells. In pinealocytes, differences in the spatial arrangement of nuclear CREB were observed among them, at the same ZT (*Zeitgeber* time), and also through the Light:Dark (L:D) cycle, with a higher dispersion during the nighttime. In addition, the removal of the superior cervical ganglia (SCGx) that innervate the PG has revealed an increase in the spatial distribution of CREB in the pinealocyte nuclei during the early night (ZT14), in comparison with control and sham PGs. The analysis of the phosphorylated RNA polymerase II (pPOLII) lead us to conclude that the PG is transcriptionally active during both the day and night phases. Daily variations in the abundance of total CREB via WB were not found. On the other side, the levels of both NeuroD1 transcript and total protein did not vary in the PG during the L:D cycle. The CoIP technique has indicated that NeuroD1 and CREB are able to interact with each other during the light phase (ZT6) in both the PG and the cerebellum (Ce), which has been used as control. Luciferase assays in a cell line not related to pinealocytes have suggested that NeuroD1 might positively modulate the *Aanat* gene promoter, and that the combination NeuroD1+E47 might promote the expression of *Aanat* gene in both basal conditions and under the effect of norepinephrine (NE). In the case of CREB, alone or combined with NeuroD1, CREB and/or E47, might exert a negative modulation of the *Aanat* gene promoter. In addition, NE has failed to induce the pCREB-dependent *Aanat* gene expression in our *in vitro* studies; induction that represents the main stimulus for the nocturnal synthesis of melatonin *in vivo*. On the other hand, the luciferase assays have showed that NeuroD1 and the combination NeuroD1+E47+Pdx1 positively modulate the *Ins* gene (five copies of the E2/A3 enhancer) in a non-pancreatic cell line. The expression of potential target genes for NeuroD1 in the PG has been examined as well, including those involved in the biosynthetic

pathways of melatonin and insulin. The expression of the *Aanat* gene in the rat PG was evident only during night (ZT18), while the *Tph1* and *HIOMT* genes showed subtle differences between light (ZT6) and dark (ZT18) phases. Along the insulin signaling pathway, the expression of *Ins1*, *Cpe* and *Insr* transcripts has been found both during the day and night phases, without daily variations. Using ISH, the *Insr* transcript has been identified in PG, Ce and hippocampus, and it did not exhibit daily differences. In addition, the more sensitive Real Time PCR confirmed the expression of the *Ins1* gene in PG, Ce and in the *Ins*-producing Min 6 cells at ZT6. Moreover, we have found higher levels of the *Ins* transcript in PG than those detected in cerebellum. Besides studying *NeuroD1* in the PG, we have performed a comparative analysis with pancreas. Precisely, *NeuroD1*, *Pax6* and *Ins* were found in the pancreatic islets at ZT6 via IHC, specifically in β cells. The *Ins* protein was not found, however, in the PG using the same technique. Together these results suggest that the PG is a highly heterogeneous and complex organ. Also we can conclude that CREB and *NeuroD1* might modulate the expression of genes involved in the synthesis of melatonin, including the *Aanat* gene, and others related with the pineal phenotype and homeostasis, such as the *Ins* gene. We wish our results can contribute to a better understanding of the cellular and molecular mechanisms that take place within the PG, even when they are mediated by molecules that also present in the central nervous system (CNS) and other endocrine organs. In addition, we hope that the new insights provided in this PhD. thesis can be translated into the medical field, and that they can be useful in the development of new methods of diagnosis, prevention and treatment of diverse diseases, including circadian disorders, neurodegenerative diseases, and metabolic disorders, such as diabetes.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

5-HT: 5-Hidroxitriptamina
AAAD: Aminoácido Aromático Descarboxilasa
AANAT: Arilalquilamina-N-Acetiltransferasa
AC: Adenilato Ciclasa
ACC: Arteria Carótida Común
Act: Actina
Actb: β -Actina
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADNc: Ácido Desoxirribonucleico copia
AMPc: Adenosin Monofosfato cíclico
ANOVA: del inglés, *Analysis of Variance*
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
ARN total: Ácido Ribonucleico total
ATP: del inglés, *Adenosine Triphosphate*
BCA: Ácido Bicinconinico
Bcl2: del inglés, *β -cell CLL*
bHLH: del inglés, *basic Helix-Loop-Helix*
BMAL1: del inglés, *Brain and Muscle ARNt-Like protein*
bZIP: del inglés, *basic leucine Zipper*
C: Citoplasma
Ca²⁺: ion calcio
Cacna2d1: del inglés, *Calcium voltage gated channel auxiliary subunit alpha 2 delta 1*
CaMKs: del inglés, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein Kinases*
Ccna2: del inglés, *Cyclin a2*
Ccnd1: del inglés, *Cyclin d2*
Cdhr1: del inglés, *Cadherin-related family member 1*
Ce: Cerebelo
CG: Capa Granular
CLOCK: del inglés, *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
CM: Capa Molecular
Cnga1: del inglés, *Cyclic nucleotide gated channel alpha 1*

ColP: Coinmunoprecipitación
Cpe: Carboxipeptidasa E
CPk: Capa de Purkinje
CRE: del inglés, *cAMP Responsive Element*
CREB: del inglés, *cAMP Responsive Element Binding Protein*
Crx: del inglés, *Cone-rod homeobox*
Cry: del inglés, *Cryptochrome*
Cu²⁺: ion cobre
DEPC: del inglés, *Diethyl Pyrocarbonate*
DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2
DPBS: del inglés, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
Dpm: Desintegraciones por minuto
D.O. Densidad Óptica
DTT: Ditioneitol
E: proteína E
E47: proteína E47
E64: del inglés, *trans-epoxysuccinil-L-leucilamido (4-guanidino)-butane*
EEM: Error Estándar de la Media
En2: del inglés, *Engrailed 2*
FO: Falsamente Operados
FT: Factor de Transcripción
G: proteína G
Gad1: del inglés, *Glutamic acid decarboxylase 1*
GCS: Ganglios Cervicales Superiores
GCSd: descentralización de los GCS
GCSx: Ganglionectomía Cervical Superior
GFAP: del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*
Gck: del inglés, *Glucokinase*
GP: Glándula Pineal
H3: Histona 3
Hi: Hipocampo
HIOMT: Hidroxindol-O-Metiltransferasa
HIS: Hibridación *In Situ* radiactiva
HRP: del inglés, *Horseradish Peroxidase*

lapp: del inglés, *Islet amyloid polypeptide*
lba1: del inglés, *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*
ICER: del inglés, *Inducible cAMP Early Repressor*
Id: Inhibidor de la diferenciación
IHQ: Inmunohistoquímica
IL: Islote de Langerhans
IML: células de la columna Intermediolateral
Ins: Insulina
Insr: del inglés, *Insulin receptor*
IP: Ioduro de Propidio
Irs2: del inglés, *Insulin receptor substrate 2*
KO: del inglés, *Knockout*
kDa: kilo Dalton
Lhx9: del inglés, *LIM homeobox 9*
L:O: Luz:Oscuridad
M: Marcador de peso molecular
MafA: del inglés, *MAF BZIP transcription factor A*
Mg²⁺: ion magnesio
Min 6: del inglés, *Mouse insulinoma cell line*
MT: del inglés, *Melatonin receptor*
Mt-nd3: del inglés, *Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3*
NAS: N-Acetilserotonina
NC: Nervios Conarios
NCE: Nervios Carotídeos Externos
NCI: Nervios Carotídeos Internos
NE: Norepinefrina
NeuroD1: del inglés, *Neurogenic Differentiation factor 1*
Ngn3: del inglés, *Neurogenin-3*
NPV: Núcleo Paraventricular
Nr1d1: del inglés, *Nuclear receptor subfamily 1 group d member 1*
NSQ: Núcleos Supraquiasmáticos
Nu: Núcleo
Otx2: del inglés, *Orthodenticle homeobox 2*
P90: Posnatal 90

Pax4: del inglés, *Paired box4*
Pax6: del inglés, *Paired box 6*
pb: pares de bases
PCR: del inglés, *Polymerase Chain Reaction*
pCREB: del inglés, *phosphorylated CREB*
Pdx1: del inglés, *Pancreatic and duodenal homeobox 1*
PE: Páncreas Endócrino
Per: del inglés, *Period*
PFA: Paraformaldehído
PIC: del inglés, *inhibitor cocktail tablets*
PKA: del inglés, *Protein Kinase A*
PKC: del inglés, *Protein Kinase C*
PMSF: del inglés, *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*
pPOLII: ARN Polimerasa II fosforilada
PVDF: Fluoruro de Polivinilideno
QO: Quiasma Óptico
RAd: Receptores Adrenérgicos
Rnd3: del inglés, *Rho family GTPase 3*
Rpl32.1: del inglés, *60S ribosomal protein l32*
rpm: revoluciones por minuto
Rps29: del inglés, *40S ribosomal protein s29*
RT: Retrotranscripción
SB: Sustancia Blanca
scRNA-Seq: del inglés, *single cell RNA Sequencing*
SNC: Sistema Nervioso Central
Tph: Triptófano hidroxilasa
TRH: Tracto Retinohipotalámico
TS: Tronco Simpático
Tuj1: Tubulina III β
Vldlr: del inglés, *Very low density lipoprotein receptor*
VLMCs: del inglés, *Vascular and Leptomeninge Cells*
WB: del inglés, *Western Blot*
Wnt3: del inglés, *Wingless type MMTV integration site family, member 3*
ZT: del alemán, *Zeitgeber Time*

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Publicaciones científicas asociadas con este trabajo de tesis doctoral	4
Resumen	5
Summary	7
Siglas y abreviaturas	9
INTRODUCCIÓN	15
Introducción a la biología circadiana	16
El reloj biológico central, sistema fotoneuroendocrino y la glándula pineal	17
Ritmo circadiano en la síntesis y secreción de la hormona melatonina en la glándula pineal	24
Rol del factor de transcripción CREB sobre el fenotipo de órganos endócrinos	25
Rol del factor de transcripción NeuroD1 sobre el fenotipo de órganos endócrinos	30
Hipótesis de trabajo	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
RESULTADOS	65
Capítulo I	66
Estudio de la abundancia temporal del factor de transcripción NeuroD1 en la glándula pineal	67

Análisis de la abundancia de CREB en la glándula pineal a diferentes ZTs	69
Estudio de la dinámica espaciotemporal del factor de transcripción CREB en la glándula pineal y el cerebelo	71
Análisis de la interrupción simpática sobre la dinámica espaciotemporal de CREB en los pinealocitos, vía GCSx	88
Estudio de la enzima ARN polimerasa II fosforilada como medida de la actividad transcripcional de la glándula pineal	94
Capítulo II	97
Estudio de la interacción proteica entre NeuroD1 y CREB	98
Interacción de NeuroD1 y CREB con secuencias blanco específicas	100
Capítulo III	106
Análisis de la expresión diaria de las enzimas de la síntesis de melatonina en la glándula pineal	107
Análisis comparativo de la expresión génica de insulina y moléculas de señalización de insulina en la glándula pineal y otros sitios del SNC	108
Análisis comparativo del estudio de insulina en el páncreas y la glándula pineal	112
Análisis comparativo de la proteína NeuroD1 en páncreas y glándula pineal	114
DISCUSIÓN	116
CONCLUSIONES	136
PROYECCIONES FUTURAS	140
BIBLIOGRAFÍA	143

Introducción

Introducción a la biología circadiana

En el año 1729, el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortuous de Mairan observó la apertura y cierre de las hojas de la planta *Mimosa pudica* en función aparente de la luz solar [1]. De Mairan colocó la planta en oscuridad constante y notó que el movimiento de las hojas continuaba, a pesar de la ausencia de luz. Este descubrimiento sembró la idea de que los fenómenos biológicos no son estáticos, sino que pueden experimentar cierta ritmicidad. Las oscilaciones de parámetros biológicos con una periodicidad cercana a las 24 h son conocidas como ritmos circadianos y son capaces de mantenerse en ausencia de señales temporales del ambiente. Estos ritmos circadianos son generados y mantenidos por un conjunto de moléculas específicas que interactúan y se autorregulan entre sí. Estas moléculas constituyen lo que se conoce como “reloj circadiano”. Desde entonces, numerosos esfuerzos han sido realizados para comprender cuáles son y cómo se interrelacionan las piezas que componen este reloj interno, cómo se generan y mantienen los ritmos circadianos, y cómo los organismos son capaces de percibir el tiempo y responder al estímulo temporal. La ritmicidad en los procesos biológicos les otorga a los organismos ventajas adaptativas y de supervivencia frente a cambios temporales en sus ambientes, debido a que involucra a la mayoría de los procesos fisiológicos y comportamentales. La alimentación, el ciclo actividad/reposo y las conductas reproductivas, son algunas de las actividades influenciadas por los relojes circadianos [2-6].

En la actualidad, resulta de gran interés no sólo definir los componentes de la biología del reloj, sino también, generar conocimiento sobre las implicancias de su mal funcionamiento en la etiopatogenia y fisiopatología de diversas enfermedades [7-17].

El reloj biológico central, sistema fotoneuroendocrino y la glándula pineal

En los mamíferos, la maquinaria temporal se compone de un reloj biológico central, conocido también como reloj maestro, que se encuentra alojado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo [18]. Además, existen otros relojes, denominados periféricos, localizados en diversos órganos como la glándula pineal (GP), el hígado, el corazón, los riñones y las glándulas

adrenales, entre otros, [19-23]. El reloj maestro junto con los periféricos, forman un sistema complejo y autosustentable, capaz de generar un orden temporal circadiano en los procesos biológicos. Si bien estos relojes son innatos en los seres vivos, pueden ser influenciados y sincronizados por diversos estímulos internos o externos conocidos como *Zeitgebers* (término alemán que podría traducirse como dadores de tiempo, ZTs). Dentro de las señales capaces de dictar la noción de tiempo a un organismo, la luz ambiental es considerada un factor clave en la evolución y supervivencia de los seres vivos. Como consecuencia, surgieron órganos especializados en el procesamiento de la información lumínica. Ejemplo de ello son la retina y la GP. Esta última, en vertebrados superiores, transduce la señal fótica en un mensaje hormonal rítmico mediante la síntesis y secreción nocturna de la hormona melatonina [23-27].

La GP y retina forman parte del denominado sistema fotoneuroendocrino (Figura 1), un complejo multisináptico en el que la actividad de la GP es regulada por el reloj maestro a nivel de las neuronas de los NSQ, de naturaleza GABAérgica, quienes reciben información acerca de los patrones fotoperiódicos por medio de proyecciones de las células ganglionares fotosensibles ubicadas en la retina [28, 29]. Una vez excitados por la influencia retiniana, los NSQ envían señales inhibitorias hacia el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, cuyas neuronas hacen sinapsis a nivel de las astas intermediolaterales (IML) de la médula espinal. Finalmente, las células de esta región transmiten la información hacia los ganglios cervicales superiores (GCS), quienes a través de los nervios conarios (NC), inervan la GP y en ausencia de luz liberan norepinefrina (NE). La NE es un estímulo esencial para la síntesis de la melatonina, y esta última, es considerada un sincronizador endógeno, capaz de modular al reloj maestro (Figura 1) [26, 27, 30, 31].

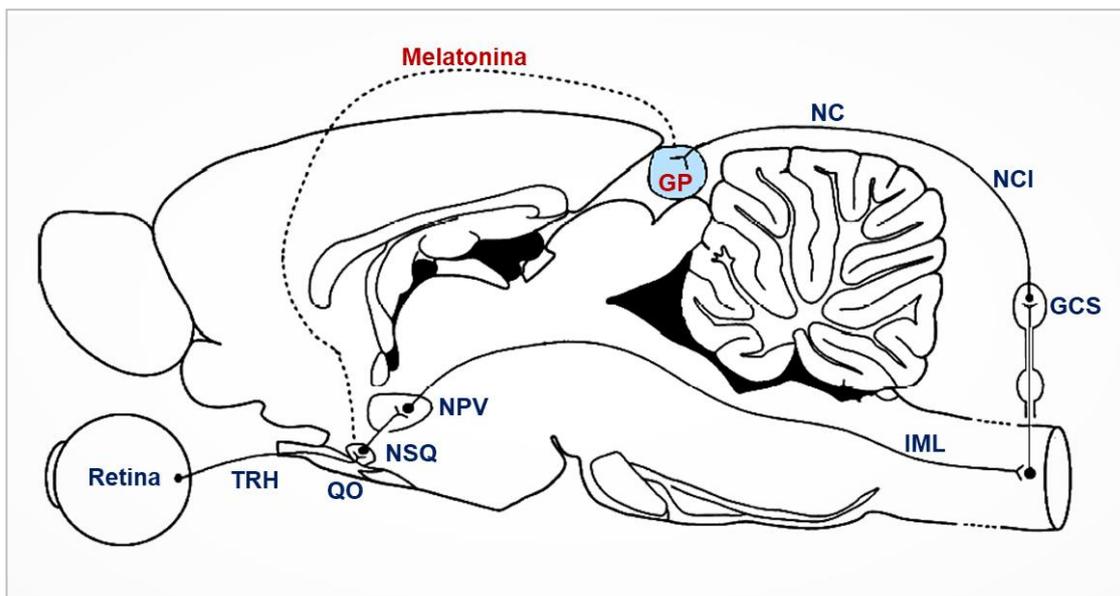


Figura 1. Representación esquemática del sistema fotoneuroendocrino productor de melatonina, en rata.

Circuito multisináptico complejo que transduce la información fotoperiódica en una señal hormonal, la melatonina, durante la noche. GCS: ganglios cervicales superiores; GP: glándula pineal; IML: células de la columna intermediolateral; NC: nervios conarios; NCI: nervios carotídeos internos; NPV: núcleo paraventricular; NSQ: núcleos supraquiasmáticos; QO: quiasma óptico; TRH: tracto retinohipotalámico. Línea punteada: acción moduladora de melatonina sobre los NSQ. Modificada de Klein y cols., 2010 [32].

Los mecanismos por los que se generan y mantienen los ritmos circadianos han sido estudiados con énfasis durante las últimas décadas por la comunidad científica. A nivel molecular, el sistema del tiempo se compone de genes y proteínas reloj que trabajan en conjunto, a través de circuitos de retroalimentación positivos y negativos, para mantener los relojes biológicos en sintonía con el entorno [16, 33-35]. De hecho, los científicos estadounidenses Michael Young, Michael Rosbash y Jeffrey Hall recibieron el Premio Nobel de Medicina o Fisiología 2017 por su aporte al conocimiento de la cronobiología [36-39]. Utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio, descubrieron el gen *Per* (del inglés, *Period*) que codifica para la proteína PER, la cual se acumula y degrada periódicamente dentro de la célula [36]. Además, PER reprime la transcripción de su propio gen, sustentando su propia oscilación [38, 40-42]. A estos trabajos, pioneros en su campo, le siguieron otros estudios que llevaron al descubrimiento de las múltiples piezas que conforman el reloj

circadiano no sólo en *Drosophila melanogaster*, sino en distintas especies, incluyendo al ser humano [43]. En la actualidad, sabemos que en mamíferos la maquinaria molecular involucrada en las oscilaciones temporales en las neuronas de los NSQ tiene como protagonistas centrales a dos factores de transcripción (FT) de la familia de proteínas bHLH (del inglés, *basic Helix-Loop-Helix*): CLOCK (del inglés, *Circadian locomotor output cycles kaput*) y BMAL1 (del inglés, *Brain and muscle ARNT-like protein 1*) (Figura 2) [42, 44-48]. Estos FTs forman heterodímeros y activan la expresión de otros genes, incluyendo a *Per 1-3* y *Cry 1,2* (del inglés, *Cryptochrome*). Dicha activación ocurre mediante interacción con cajas E (CANNTG), secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico) presentes en las regiones regulatorias de los genes blanco [49-52]. PER y CRY heterodimerizan y a su regreso al núcleo inhiben su propia transactivación mediada por el complejo CLOCK-BMAL1, siendo esta represión un evento crucial para iniciar un nuevo ciclo [16, 45, 47, 53-56]. A pesar de los hallazgos encontrados hasta la fecha, el panorama sigue ampliándose, sumandose nuevas piezas y conexiones al reloj, y aún queda mucho por comprender sobre la dinámica del reloj circadiano [16, 57, 58].

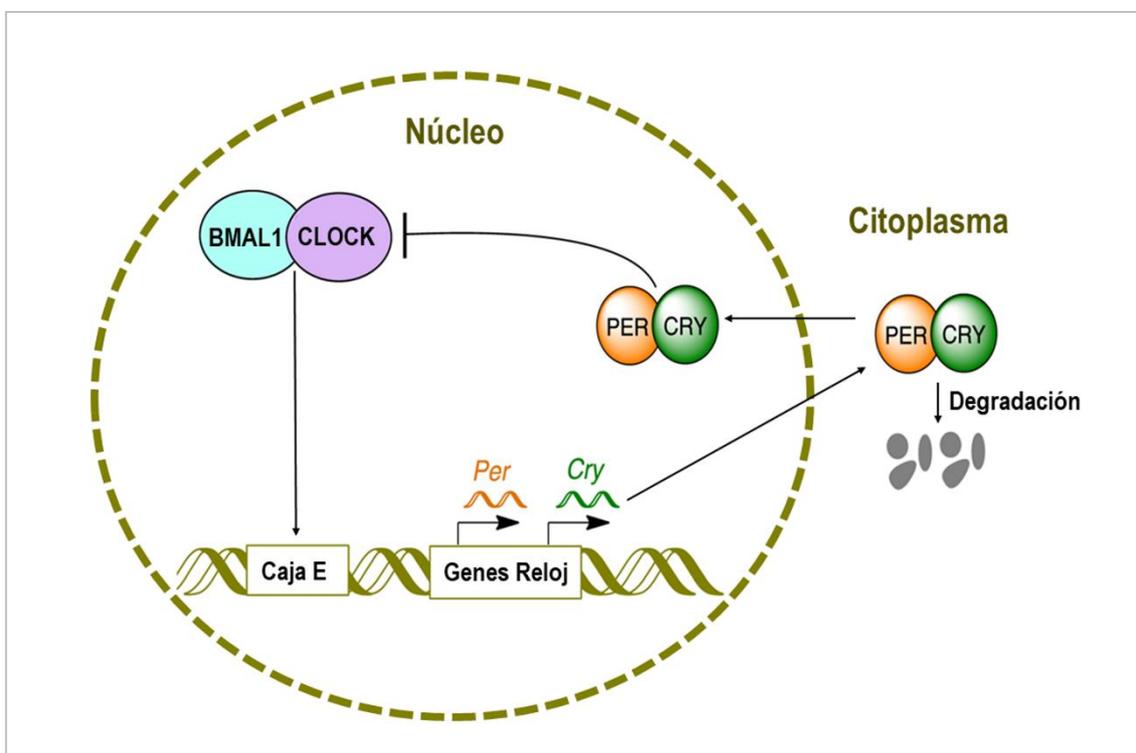


Figura 2. Organización del reloj circadiano central de mamíferos.

La maquinaria del reloj circadiano está compuesta por elementos positivos CLOCK y BMAL1 y negativos PER1-3 y CRY1,2. Tras su unión a secuencias de ADN, cajas E, el heterodímero CLOCK-BMAL1 favorece la expresión de los genes reloj *Per1-3* y *Cry1,2*. Las proteínas PER y CRY dimerizan en el citoplasma e ingresan al núcleo donde se unen a CLOCK-BMAL1 y producen el desacoplamiento de dicho heterodímero, inhibiendo de esta manera su propia transcripción. Cuando los niveles de PER y CRY disminuyen, por degradación proteica, CLOCK-BMAL1 es capaz de activar nuevamente la transcripción de dichos genes reloj. BMAL1 (del inglés, *Brain and muscle ARNt-like protein 1*); CLOCK (del inglés, *Circadian locomotor output cycles kaput clock*); CRY (del inglés, *Cryptochrome*); PER (del inglés, *Period*). Modificado de Minegishi y cols. [59].

La GP actúa como efector y regulador del reloj biológico central a través de la secreción rítmica de la hormona melatonina [31, 60, 61]. En los mamíferos, es un órgano pequeño situado en la región dorso-central del cerebro, entre el mesencéfalo y el diencéfalo [62]. Por su ubicación anatómica próxima a los ventrículos cerebrales y al encontrarse fuera de la barrera hematoencefálica, ha sido catalogada, junto a otras estructuras nerviosas, como órgano circunventricular [63-66]. Se encuentra encapsulada por la piamadre, a través de la cual le llegan vasos sanguíneos y fibras nerviosas [64, 65]. La GP constituye un órgano heterogéneo desde el punto de vista de la diversidad de poblaciones celulares que la conforman. Análisis morfológicos han demostrado que los pinealocitos constituyen el tipo celular mayoritario (80-90%) [67, 68]. Estos investigadores, mediante el estudio de la ultraestructura celular, describieron dos subpoblaciones de pinealocitos diferentes. La primera, los pinealocitos tipo 1 o claros, mostraron núcleos de forma heterogénea, con la cromatina dispersa, y uno o más nucléolos bien definidos. Adicionalmente, presentaron numerosas mitocondrias en el citoplasma; característica que corresponde a un tipo celular activo. La segunda población descrita, los pinealocitos tipo 2 u oscuros, mostraron núcleos con forma más irregular y pequeños, y una cromatina altamente compactada. El 10-20% restante de la población que habita la GP está compuesto por las células gliales y endoteliales de la vasculatura [67, 68]. En la actualidad, la caracterización morfológica de las diferentes poblaciones celulares de la pineal se complementa con el uso de marcadores específicos de linajes que permiten darles identidad de manera precisa [69-75]. Más aún, el surgimiento de nuevos enfoques como el análisis del transcriptoma de células

individuales, *scRNA-seq* (del inglés, *single cell RNA sequencing*) ha permitido discernir con mayor detalle los tipos y subtipos celulares, además de la función que cumpliría cada uno en la biología pineal (Figura 3) [76]. En el trabajo de Mays y cols. se logró caracterizar el transcriptoma de nueve subtipos celulares diferentes y la expresión rítmica de distintos genes en cada subtipo. Este estudio avala las investigaciones previas [67, 68], indicando que los pinealocitos conforman el tipo celular mayoritario del parénquima pineal. Asimismo, a partir de la referida investigación [76], los autores determinaron la presencia de dos tipos de pinealocitos a los que denominaron α y β , que expresan HIOMT (Hidroxindol-O-metiltransferasa conocido también como Acetilserotonina-O-metiltransferasa), que codifica para la última enzima de la síntesis de melatonina [73, 77]. Los pinealocitos β son los más abundantes (95%), mientras que los α son la subpoblación pinealocítica minoritaria. Los α muestran tres veces más expresión de HIOMT que los β , por lo que los autores proponen que los primeros podrían desempeñar un rol especial en la bioquímica de la síntesis de melatonina. Una de la hipótesis que surge de este trabajo es que los pinealocitos α serían los responsables de realizar la metilación de la N-acetilserotonina (NAS) liberada por los pinealocitos β , regulando de este modo el paso final en la síntesis de melatonina. Estos resultados amplían la evidencia previa de la existencia de dos tipos de pinealocitos con diferentes roles en la síntesis de melatonina [73]. El estudio del transcriptoma de células individuales permitió también discernir los otros linajes no pinealocíticos ya mencionados [76]. Se encontraron tres subtipos de astrocitos, dos de células microgliales, células endoteliales y células vasculares y de la leptomeninge (VLMCs, del inglés, *Vascular and Leptomeninge Cells*). Estas últimas fueron identificadas por primera vez en la GP, y además se cree que podrían formar nichos de células madres [78, 79]. Se destaca la gran diversidad de subpoblaciones obtenidas en este estudio transcriptómico, especialmente de los diferentes subtipos de células astrocíticas y microgliales, que se cree son elementos importantes en el mantenimiento de la fisiología pineal [69, 70, 73, 75, 80-83]. La incorporación de nuevas tecnologías como la mencionada anteriormente permitirá grandes avances en el estudio de la diversidad celular, así como también en las interrelaciones entre los distintos linajes dentro de un órgano. Sin embargo, mucho queda por entender aún, ya que en este trabajo se generaron interrogantes con respecto a lo observado

mediante la morfología décadas atrás, por ejemplo, entender si los pinealocitos 1 y 2 son equivalentes a los descriptos en este análisis como α y β . Evidencias recolectadas por nuestro grupo de investigación propone que los pinealocitos α y β corresponderían a los antes llamados pinealocitos tipo 1, y que los pinealocitos tipo 2 serían de naturaleza intersticial [69-72].

Si bien la heterogeneidad a nivel celular presente en la GP debe continuar siendo esclarecida, otros fenómenos biológicos se encuentran mejor entendidos. Por ejemplo, que los pinealocitos de mamíferos han sufrido diferentes cambios a lo largo del proceso evolutivo, divergiendo así de otros linajes que conservaron su capacidad fotorreceptora [25]. Dichas adaptaciones serían el resultado de modificaciones finas a nivel de su maquinaria molecular, las cuales incluyen la eliminación de proteínas y estructuras no funcionales, y la refuncionalización de proteínas ya existentes (Mano y cols., 2007). La construcción del fenotipo pinealocítico es el resultado de un patrón de expresión espacial y temporal finamente regulado de diversos factores de transcripción [72, 84-89]. Los factores de transcripción codificados por genes *homeobox* son de vital importancia en la regulación de la ontogenia de la GP de roedores (Rath y cols., 2013). Mientras que algunos de los miembros fueron identificados como esenciales para el desarrollo normal de la GP tales como Pax6 (del inglés, *Paired box 6*), Otx2 (del inglés, *Orthodenticle homeobox 2*) y Lhx9 (del inglés, *LIM Homeobox 9*), otros como Crx (del inglés, *Cone-rod homeobox*) no son vitales a pesar de modular la expresión de genes tejido-específicos (Acampora y cols., 1995; Matsuo y cols., 1995; Estivill-Torrus y cols., 2001; Mitchell y cols., 2003; Nishida y cols., 2003; Rath y cols., 2006; Abouzeid y cols., 2009; Roving y cols., 2011; Rohde y cols., 2014; Yamazaki y cols., 2014). Alteraciones en los genes que codifican para estas proteínas causan diferentes anomalías, que abarcan desde fallas en la funcionalidad de la GP y la retina hasta la no formación de estos órganos [84, 87, 88, 90-92].

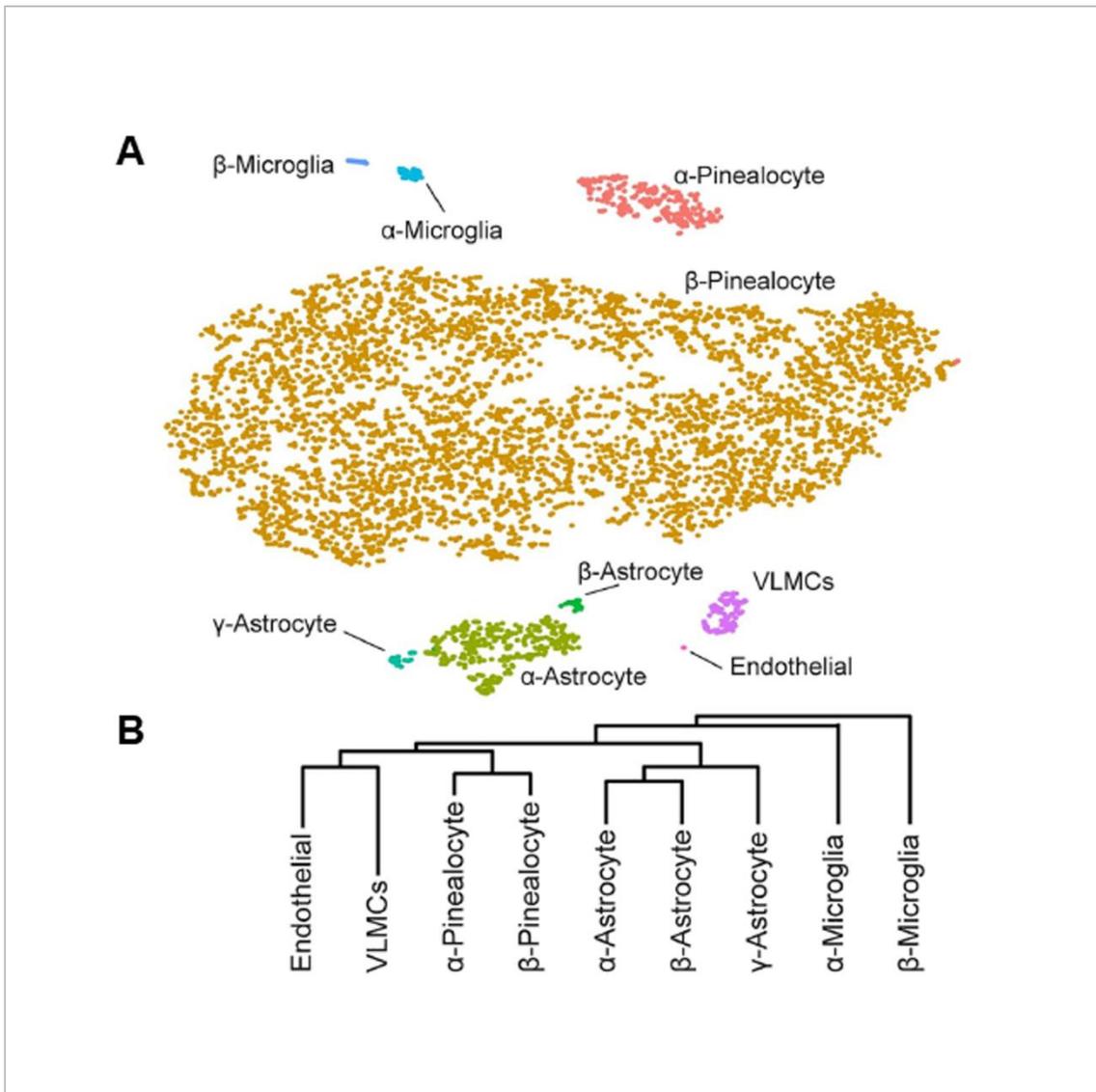


Figura 3. Heterogeneidad celular en la glándula pineal de rata adulta revelada por análisis transcripcional de células individuales mediante *scRNA-seq*.

A- Representación de las diferentes poblaciones y subpoblaciones celulares que componen la glándula pineal. Se utilizó análisis del transcriptoma de células individuales, *scRNA-seq* (del inglés, *single cell RNA sequencing*), y mediante el uso de marcadores específicos de linajes celulares se identificaron dos subpoblaciones de pinealocitos (α y β), dos de microglía (α y β), tres de astrocitos (α , β y γ), una de endoteliales y una de VLMCs (del inglés, *Vascular and leptomeninge cells*). B- Dendrograma que muestra la similitud transcriptómica entre las poblaciones celulares, incluidas las relaciones de los dos subtipos de pinealocitos, los tres subtipos de astrocitos, los dos subtipos de microglía y, las células endoteliales y VLMCs. Tomado y adaptado de Mays y cols. [76].

Ritmo circadiano en la síntesis y secreción de la hormona melatonina en la glándula pineal

La comunidad científica ha estudiado por años la relación que existe entre los relojes biológicos y las funciones fisiológicas de los organismos. Ejemplo de ello es el estudio de las implicancias de la hormona la melatonina, éste potente antioxidante ha sido involucrado en diversos eventos. La modulación de los patrones de sueño, la temperatura corporal, la presión arterial, la ingesta de alimentos, y la reducción del estrés oxidativo son algunos de los procesos en los que participa [60, 61, 93-99]. En la rata, la síntesis de la melatonina requiere de varios pasos enzimáticos, comenzando con la conversión del aminoácido triptófano en 5-hidroxitriptofano por acción de la enzima triptófano hidroxilasa (Tph1). El 5-hidroxitriptofano es descarboxilado posteriormente por la enzima aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD) para generar la 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina. Luego la 5-HT, por acción de la Arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) es convertida en NAS. En un último paso, NAS es finalmente transformada en melatonina por la enzima HIOMT (Figura 4). Dependiendo de la especie en estudio, la producción nocturna de melatonina será limitada por las enzimas AANAT y/o HIOMT [73, 76, 77, 100]. En rata, los niveles del ARNm (Ácido ribonucleico mensajero) de la enzima AANAT se incrementan durante la noche aproximadamente 150 veces (a diferencia de lo observado en retina, en la cual se produce un aumento de unas 10 veces); en contraposición a lo observado en la noche, durante la fase diurna el transcrito de la AANAT es prácticamente indetectable en GP. Como consecuencia de la destacada inducción transcripcional del gen *Aanat* en la noche, se ha propuesto a la rata como el modelo ideal para el estudio de procesos moleculares que regulan el ritmo de síntesis de melatonina. Otra ventaja del uso de la rata se debe a que la mayoría de las cepas de ratón presentan mutaciones espontáneas a diferentes niveles en la cascada biosintética de melatonina [31, 101, 102].

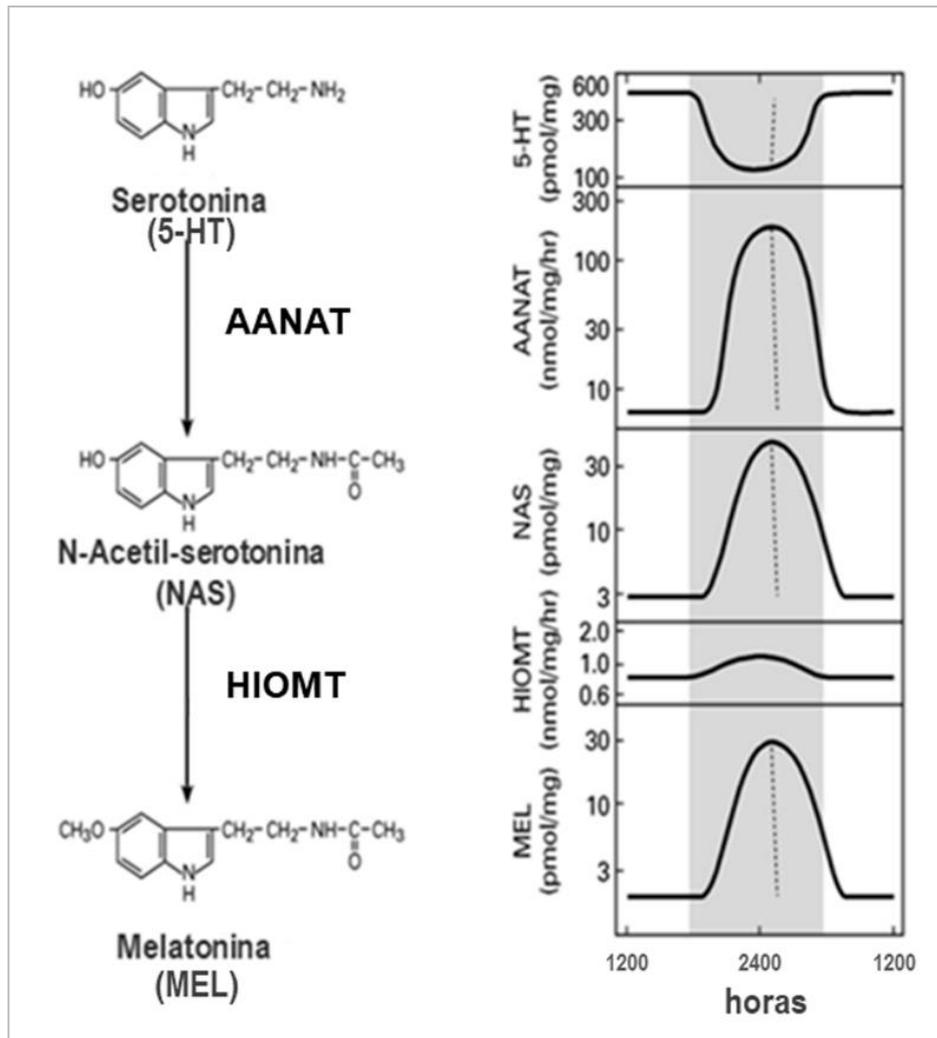


Figura 4. Síntesis de melatonina en la glándula pineal de rata.

El aumento en la actividad de la enzima AANAT y los cambios resultantes en la síntesis de melatonina ocurren durante la fase de oscuridad (área sombreada en las gráficas). AANAT: enzima Arilalquilamina-N-acetiltransferasa; HIOMT: enzima Hidroxindol-O-metiltransferasa. Modificada de Klein, D.C. [77].

Rol del factor de transcripción CREB sobre el fenotipo de órganos endócrinos

A nivel molecular, la síntesis de la melatonina se encuentra finamente regulada por acción de un conjunto de moléculas. El proceso comienza durante la fase nocturna cuando la NE es liberada al parénquima de la GP por las terminales simpáticas provenientes de las neuronas de los GCS. La NE se une entonces a los receptores adrenérgicos (RAd) $\alpha 1$ y $\beta 1$, ubicados en la membrana plasmática de los pinealocitos. La unión de NE a los receptores RAd- $\beta 1$ activa a

la enzima adenilato ciclasa (AC), mediada por la proteína G (Gs), incrementando los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc actúa como segundo mensajero activando a la proteína quinasa A (PKA, del inglés, *Protein Kinase A*), cuyas subunidades catalíticas fosforilan proteínas blanco. La unión de NE a los RAd- α 1, por otro lado, provoca un incremento de calcio (Ca^{2+}) intracelular y diacilglicerol (DAG). Esto conduce a la activación de la proteína quinasa C (PKC, del inglés, *Protein kinase C*), la cual estimula a AC, incrementando aún más la producción de AMPc. La activación de los RAd- α 1 potencia los mecanismos desencadenados por los RAd- β 1. De este modo, las dos vías convergen para generar la fosforilación de diversas proteínas como el factor de transcripción CREB (del inglés, *cAMP responsive element binding protein*) [30, 103] (Figura 5). CREB es un FT perteneciente a la familia bZIP (del inglés, *basic region leucine zipper*). Esta proteína tiene una estructura conformacional específica que le permite unirse a secuencias CRE (del inglés, *cAMP responsive element*) en las regiones regulatorias de los genes blanco, facilitando su expresión génica [31, 104, 105] (Figura 5).

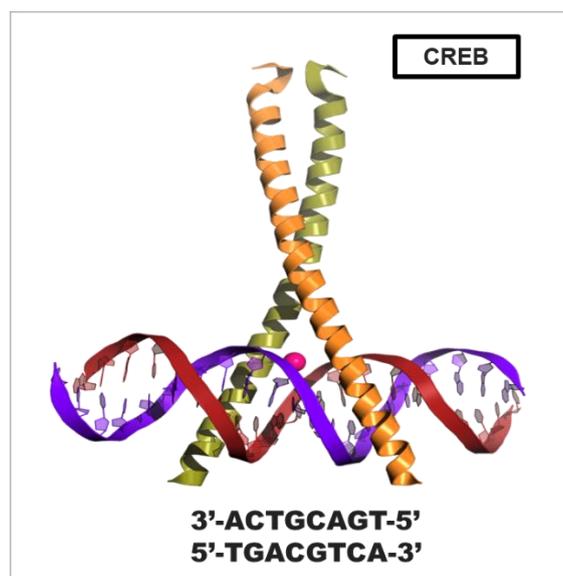


Figura 5. Representación de la interacción del dímero de CREB con la secuencia nucleotídica consenso CRE.

Este esquema fue generado a partir del análisis del complejo CREB-ADN con la secuencia CRE TGACGTCA. Modificado de Schumacher y cols. [106].

En la GP de rata, los niveles totales de CREB son relativamente estables a lo largo del ciclo luz:oscuridad (L:O), mientras que su fosforilación es inducida

por la NE nocturna. La proteína CREB y su forma fosforilada, pCREB, se encuentran entre los FTs que mantienen el ritmo circadiano de la melatonina [107-109]. La fosforilación de CREB en el aminoácido Ser¹³³ está regulada por la vía NE/RAd- β 1/AC/AMPC/PKA. Esta cascada de señalización representa un mecanismo regulatorio central en la GP [107, 110-112] (Figura 6). Más aún, la expresión de los genes *Aanat* e *Hiomt*, que codifican las dos últimas enzimas involucradas en la síntesis de melatonina, AANAT e HIOMT respectivamente, así como también la del gen del RAd- β 1, son inducidas por la fosforilación nocturna de CREB; a través de la unión a las secuencias CRE presentes en sus regiones regulatorias [31, 73, 104, 113-115]. La producción de la melatonina, por la vía NA/RAd- β 1/AMPC/PKA, no solo es dependiente de la activación de CREB, la fosforilación de AANAT también es necesaria. Esta modificación postraduccional ocurre en el citoplasma y permite que AANAT interaccione con la proteína 14-3-3. Este complejo estabiliza a AANAT impidiendo su degradación a nivel proteosomal [24, 31, 116] (Figura 6). Al final de la noche, la síntesis de melatonina es interrumpida, debido en parte, a la expresión de un potente regulador negativo de la transcripción dependiente de AMPC conocido como ICER (del inglés, *Inducible cAMP early repressor*) [108, 117-119].

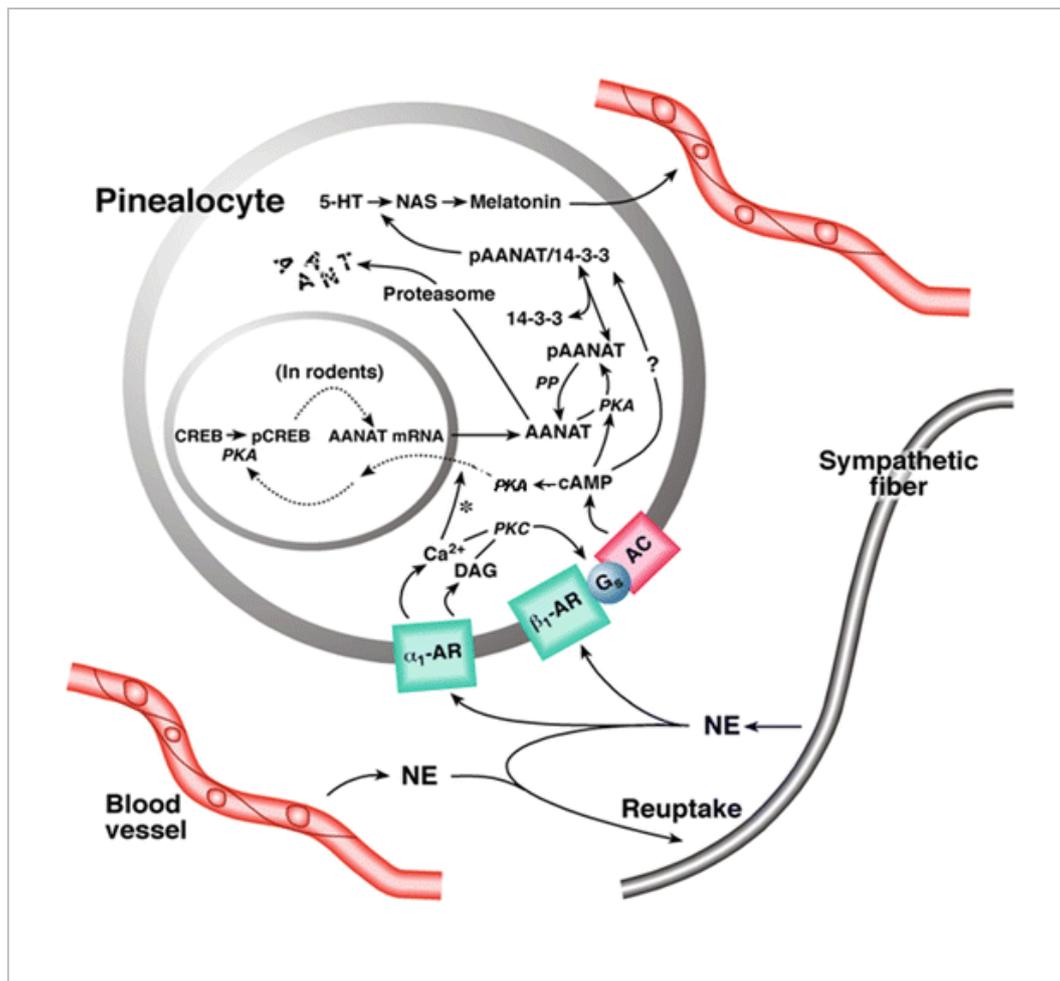


Figura 6. Vías de señalización activadas por la noradrenalina nocturna en glándula pineal de roedores: rol del factor de transcripción CREB. La síntesis nocturna de melatonina es el resultado de la activación de receptores adrenérgicos específicos, principalmente los β_1 y α_1 , y de cascadas de señalización dependiente de los segundos mensajeros AMPc y Ca^{2+} , respectivamente. La fosforilación de CREB es responsable, en parte, del ritmo en la síntesis de la hormona. 5-HT (del inglés, *5-Hydroxytryptamine*); AANAT (del inglés, *Arylalkylamine-N-acetyltransferase*), AC (del inglés, *Adenylate cyclase*); cAMP (del inglés, *cyclic Adenosine monophosphate*); DAG (del inglés, *Diacylglycerol*); Gs (del inglés, *Gs alpha subunit*); NAS (del inglés, *N-acetylserotonin*); NE (del inglés, *Norepinephrine*); PKA (del inglés, *Protein kinase A*); PKC (del inglés, *Protein kinase C*); α_1 -AR (del inglés, *α_1 Adrenergic receptor*); β_1 -AR (del inglés, *β_1 Adrenergic receptor*). Modificado de Ganguly y cols. [30, 103].

En conjunto, estos antecedentes demuestran que las fosforilaciones desencadenadas por la NE nocturna son procesos claves en la ritmicidad de la síntesis de melatonina [114]. Resulta relevante el estudio de estos mecanismos ya que se demuestra la existencia de un delicado equilibrio entre los elementos activadores y represores que cronológicamente regulan las cascadas de

señalización dando como resultado la expresión nocturna del ARNm y de la proteína AANAT. La complejidad en la generación del ritmo de la melatonina en la GP de mamíferos queda de este modo en evidencia. El análisis del transcriptoma en la GP sugiere que la vía de AMPc/CREB podría regular otros fenómenos, incluidos la respuesta inmune/inflamatoria, fotodetección y señalización de la hormona tiroidea [76, 114, 120]. Entonces, CREB y su forma fosforilada resultan vitales para procesos adicionales a la síntesis de melatonina [121].

Si bien el rol de CREB en la pineal ha sido caracterizado, su distribución espaciotemporal e interacción con la cromatina siguen sin ser explorados. La dinámica de unión y disociación de moléculas individuales de CREB a sus sitios CREs fue mostrada en el año 2015 por Sugo y cols. [122]. Estos autores realizaron ensayos *in vitro* en la línea celular neuronal Neuro2a, donde la unión del FT a las secuencias CREs resultó ser transitoria y repetitiva, y tardó varios segundos en completarse. Recientemente, el mismo grupo aplicó microscopía de imágenes de una sola molécula para mostrar que la frecuencia de unión de CREB a sitios genómicos específicos, en las neuronas corticales de ratón, está influenciada por la actividad neuronal [123]. Sin embargo, el tiempo de residencia de CREB no se vió afectado. La importancia del estudio de la dinámica de unión del FT a secuencias específicas radica en que la desregulación de CREB ha sido vinculada a varias enfermedades neuropatológicas, entre ellas la enfermedad de Huntington [121, 124, 125]. Se ha documentado que la regulación de la transcripción mediada por CREB se encuentra aumentada o disminuida dependiendo de la etapa de dicha enfermedad [124, 125].

CREB desempeña un rol significativo en otras estructuras de naturaleza endócrina como el páncreas [126]. La proliferación y supervivencia de las células β y la secreción de insulina (Ins) están reguladas por factores de transcripción cruciales que se activan mediante diferentes vías de señalización. La vía del AMPc es central, y CREB es un elemento transcripcional clave para la detección eficiente de glucosa, transcripción del gen *Ins* y exocitosis de la hormona, y supervivencia de las células β [126-128]. El FT activa la transcripción de genes blanco en respuesta a una amplia gama de estímulos. Entre estos, podemos mencionar diferentes proteínas quinasas, proteínas de andamiaje y cofactores

que permiten a CREB regular específicamente la expresión de genes cruciales como *Ins*, *Bcl2* (del inglés, *β-cell CLL*), *Ccnd1* (del inglés, *Cyclin d2*), *Ccna2* (del inglés, *Cyclin a2*) y *Irs2* (del inglés, *Insulin receptor substrate 2*) [128]. Además, la activación transcripcional mediada por CREB no es tan sencilla, y requiere diversas moléculas que colaboran entre sí para el mantenimiento del fenotipo pancreático [129-131]. Esto es relevante ya que la preservación de una masa de células β funcionales se ha convertido en un punto importante en las investigaciones centradas en diabetes y las terapias futuras para dicha enfermedad [132, 133]. El estudio comparativo de CREB en diferentes órganos endócrinos permite así un mayor entendimiento del rol y funciones del FT.

Rol del factor de transcripción NeuroD1 sobre el fenotipo de órganos endócrinos

Además de los mencionados anteriormente, otros factores de transcripción podrían modular el ritmo de melatonina en la GP de rata [87, 89, 134]. Un candidato potencial es el factor de diferenciación neurogénico NeuroD1/BETA2 (del inglés, *Neurogenic differentiation factor 1/Beta-cell E box trans-activator 2*). NeuroD1 fue presentado inicialmente por su capacidad de convertir células ectodérmicas de *Xenopus* en neuronas y como inductor esencial de la expresión del gen *Ins* [135, 136]. Otros autores han involucrado al FT en la diferenciación y sobrevivencia de linajes neuronales y endócrinos específicos [137-141], y su ausencia se asocia a un amplio espectro de patologías tales como diabetes, dislexia, sordera, ceguera y déficit cognitivo, entre otros [138, 140, 142-144]. NeuroD1 es capaz de unirse a secuencias específicas de ADN conocidas como cajas E (CANNTG) en los promotores de los genes que las contienen (Figura 7). NeuroD1 heterodimeriza en el citoplasma con otros FTs ubicuos denominados proteínas E (E12/47) y luego el complejo es translocado al núcleo para cumplir con su función [145-147]. Esta heterodimerización es vital ya que NeuroD1, por sí solo, es ineficiente en la inducción de la expresión de sus genes blanco [148].

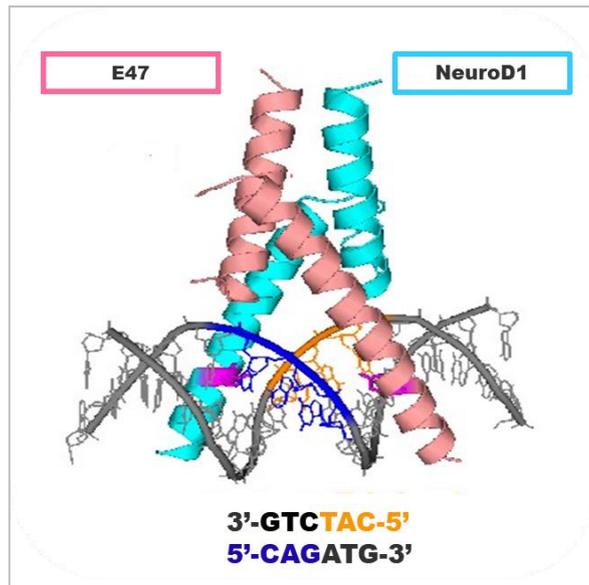


Figura 7. Representación de la interacción del heterodímero conformado por los factores de transcripción NeuroD1 y E47 con la secuencia nucleotídica caja E.

Este esquema fue generado a partir del análisis cristalográfico del complejo NeuroD1/E47-ADN con la caja E (CAGATG) presente en el gen que codifica para la hormona Ins. Modificado de Longo y cols. [146].

En el sistema nervioso, NeuroD1 se expresa durante la ontogenia de la corteza cerebral y médula espinal. Con la progresión del desarrollo, sus niveles disminuyen progresivamente, permaneciendo en el adulto en zonas y tejidos específicos como en el hipocampo (Hi) y cerebelo (Ce) [137, 149]. Por esta razón, se ha postulado que este FT es necesario tanto para la diferenciación como para el mantenimiento de fenotipos neuronales específicos durante la adultez. NeuroD1 se ha propuesto además como FT pionero en precursores neuronales de la corteza murina [150]. En este trabajo se describió que NeuroD1 se une de manera directa y transitoria a elementos regulatorios de genes neuronales, que se encuentran silenciados durante el desarrollo por mecanismos epigenéticos, reclutando luego otras moléculas de la maquinaria transcripcional. La activación transcripcional iniciada por NeuroD1 se mantiene a través de la memoria epigenética a pesar de la posterior desaparición del pionero.

Otras investigaciones proponen que la sobreexpresión de NeuroD1 promueve la reprogramación celular. Se ha demostrado que células gliales de la corteza pueden reprogramarse en neuronas e integrarse a los circuitos neuronales locales en un modelo murino de Alzheimer y en cultivos de células

humanas [151]. Mientras que otros autores confirmaron que células gliales de la médula espinal, tras una injuria, pueden convertirse en células madres y neuronas inmaduras, por efecto de NeuroD1 [152]. Esta función de NeuroD1 se ha documentado además en el páncreas, en el que se encontró que células exocrinas diferenciadas podrían virar al fenotipo de células β por reexpresión de NeuroD1 en combinación de otros FTs. Entre ellos Pdx1 (del inglés, *Pancreatic and duodenal homeobox 1*), Ngn3 (del inglés, *Neurogenin-3*) y MafA (del inglés, *MAF BZIP Transcription Factor A*), esenciales para establecer el linaje β pancreático [153].

La importancia de NeuroD1 ha quedado también expuesta con el uso de ratones KO (del inglés, *Knockout*). Por ejemplo, la retina se encuentra seriamente afectada en ratones KO del tipo condicional mediante el sistema Cre-LoxP. Los animales de dos meses de edad muestran degradación morfofuncional de los fotorreceptores y a los cuatro meses ya es evidente la ausencia de bastones y conos [92, 154]. El uso de ratones neonatales y adultos en los modelos KO global y condicional, respectivamente, revelaron numerosos genes potenciales blanco de NeuroD1 con cajas E en sus regiones regulatorias. Entre ellos *En2* (del inglés, *Engrailed 2*), *Kif5c* (del inglés, *Kinesin family member 5C*), *Gad1* (del inglés, *Glutamic acid decarboxylase 1*), *Rnd3* (del inglés, *Rho family GTPase 3*), *Per3* y *Aanat*, entre otros [89, 92]. El gen *Aanat*, mostró niveles de expresión disminuidos en la GP del KO global [89]. Este resultado propone un posible rol regulatorio de NeuroD1 sobre una de las enzimas principales en la producción melatonina. Los estudios realizados en ratones KO en GP confirmaron que NeuroD1 no es esencial para la formación de la pineal y proponen que su ausencia podría ser en parte compensada por otro/s miembro/s de la familia bHLH [89, 92].

En cuanto al modelo de rata, análisis del transcriptoma evidenciaron la expresión de NeuroD1 en la GP [76, 89, 114, 120]. Mediante la técnica de hibridación *in situ* se detectó el ARNm del FT a partir del estadio embrionario 16 (E16), con aumento de los niveles del mensajero que acompañaba el crecimiento del órgano [89]. La máxima expresión se encontró entre los últimos días del desarrollo embrionario y los primeros días posnatales (E20-P3), y luego se mantuvo estable durante la adultez. Trabajos más recientes evidenciaron la

presencia de la proteína en diferentes poblaciones celulares de la GP [71, 72]. El FT se identificó en los pinealocitos y ciertos subtipos de células intersticiales, mostrando gran heterogeneidad en cuanto a niveles de expresión y distribución subcelular [71, 72, 76]. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que NeuroD1 presenta un ritmo en la partición núcleo:citoplasma en los pinealocitos [71, 72] (Figura 8). El ingreso de NeuroD1 al núcleo a comienzos de la fase nocturna podría estar mediado por fosforilaciones en los residuos Ser²⁷⁴, Ser³³⁶, o en ambos [71, 72]. Mediante disrupción simpática, vía GCSx crónica y antagonistas de los RAd ($\alpha 1$ y β), se observaron alteraciones en la translocación al núcleo de NeuroD1 [71, 72]. Los resultados obtenidos en estos trabajos demuestran que la localización de NeuroD1 en la GP es regulada por la NE proveniente de las neuronas de los GCS, y que los RAd ($\alpha 1$ y β) y las vías de señalización activadas por ellos, modulan el tráfico citoplasma:núcleo. Estos datos son de especial importancia debido al rol central de los eventos postraduccionales en la biología pineal y, más aún, en el ritmo circadiano de la hormona melatonina.

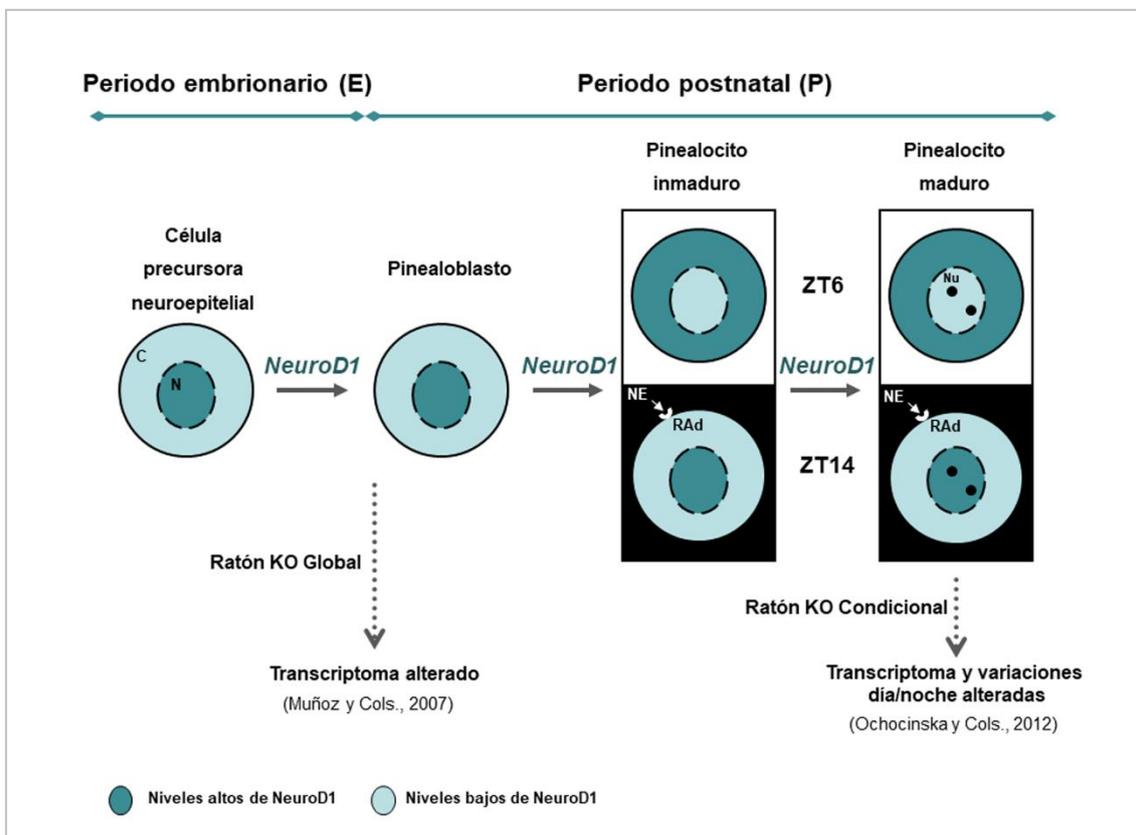


Figura 8. Modelo esquemático que representa el rol modulador de NeuroD1 en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo de los pinealocitos.

NeuroD1 está presente durante toda la ontogenia de la glándula pineal de rata. Durante los estadios embrionarios y posnatales tempranos, cuando el linaje pinealocítico se encuentra en proceso de definición, la proteína muestra una localización predominantemente nuclear. Esto es estable durante todo el ciclo L:O. A medida que los pinealoblastos se transforman en pinealocitos inmaduros, un ritmo diario en la distribución subcelular aparece, con la proteína en el citoplasma durante la fase de luz y nuclear durante la fase de oscuridad. Esta oscilación diaria en la localización subcelular responde a la influencia simpática. Tanto el ritmo de partición como su regulación autonómica se mantienen en la etapa adulta. La ausencia del gen *NeuroD1* causa alteraciones en el transcriptoma de la glándula pineal [89, 92]. Aunque se ha visto que el NeuroD1 no es esencial para la génesis de la glándula pineal como lo son Pax6, Otx2 y Lhx9, se especula que podría interactuar de una manera compensatoria y cooperativa con otros factores de transcripción bHLH y/o homeobox para modular el desarrollo y la homeostasis de la glándula pineal. C: Citoplasma; KO: Knockout; N: Núcleo; NE: Norepinefrina; Nu: Nucléolo; RAd: Receptores adrenérgicos de membrana. ZT: Zeitgeber time. Modificado de Castro y cols. [71, 72].

Mediante el uso de nuevas tecnologías de análisis bioinformático como *HighEgdeS*, otros investigadores sugirieron que NeuroD1 podría regular genes en la GP que no habían sido considerados blanco hasta entonces [155]. Este grupo reanalizó el transcriptoma de la GP de ratones KO global y condicional para el FT [89, 92], y propusieron la regulación de los genes *Ins1*, *Ins2*, *lapp* (del inglés, *Islet amyloid polypeptide*) y *Gck* (del inglés, *Glucokinase*) por parte de NeuroD1. Esto es llamativo debido a que el sistema insulinérgico en el SNC, y en especial en la GP, continúa siendo un interrogante [156-161]. Estos hallazgos traen a discusión un tema recurrente en la literatura: la producción local de Ins en pequeñas cantidades dentro del SNC [162-165]. Los antecedentes mencionados apoyan la hipótesis de la participación de NeuroD1 en la regulación y/o modulación de la fisiología de la GP de roedores.

NeuroD1 ha sido ampliamente caracterizado en el páncreas, y su funcionalidad en el órgano cobró relevancia al dilucidarse su papel en la regulación transcripcional del gen de Ins. [135, 144, 166, 167]. Animales KO para NeuroD1 carecen de islotes de Langerhans a causa de una temprana y masiva muerte de las células precursoras. Como resultado de esta falla, los animales no logran sobrevivir la primera semana de vida ya que desarrollan una severa hiperglicemia [144]. Las implicancias para la salud han provocado que los investigadores tengan gran interés en el estudio de NeuroD1 y su vinculación

con la biología del páncreas. Por ejemplo, se han reportado mutaciones en el FT que estarían asociadas con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) en ratón [168], y poblaciones europeas y asiáticas con predisposición a sufrir DMT 1 y 2 [169-171].

La producción de melatonina no es el único proceso controlado por los relojes circadianos. Continuando con el análisis comparativo entre la GP y el páncreas, podemos mencionar que la síntesis y secreción de Ins es un fenómeno biológico directamente influenciados por la maquinaria circadiana [15, 172-176]. La secreción de Ins está adaptada a los cambios día/noche mediante una sincronización dependiente de la melatonina [177]. Datos experimentales mostraron que la melatonina secretada impacta sobre los receptores MT (del inglés, Melatonin receptor) 1 y 2 en los islotes de Langerhans, provocando una disminución en la secreción de Ins [178-180]. En animales y humanos con DMT2 se ha documentado una disminución en los niveles de melatonina [177, 181]. Por tanto, la suplementación de la dieta con melatonina podría tener efectos beneficiosos sobre la homeostasis de la glucosa [97, 182-184].

Con respecto al rol modulador de la Ins sobre la fisiología pineal, se ha propuesto que la hormona pancreática estaría vinculada a la síntesis de la melatonina. La Ins se uniría a sus receptores en la GP, afectando la cascada de señalización que conduce a un aumento en la actividad de la AANAT. Un estudio realizado en ratas y humanos diabéticos señaló la existencia de una relación inversa entre el aumento de Ins y la secreción de melatonina [185]. Esta caída en los niveles de la melatonina estaría relacionada, en parte, con una disminución del transcripto del Insr y de la actividad de la enzima AANAT en la GP. Además, observaron un incremento del transcripto del receptor de melatonina MT1 en el páncreas de los roedores con diabetes tipo 2, probablemente como mecanismo compensatorio ante la caída de la melatonina [185]. Estos autores proponen que la hormona Ins podría modificar la síntesis de melatonina nocturna, siendo este fenómeno dependiente de la actividad de la enzima AANAT, entre otras [157, 185, 186]. El entendimiento del balance entre los niveles de estas dos hormonas podría abrir nuevas vías en terapias contra la diabetes y otras enfermedades metabólicas.

En conclusión, aún se necesitan esfuerzos que contribuyan a esclarecer el modo en que centros endócrinos diferentes usan moléculas y mecanismos comunes para distinguirse. Asimismo, cómo generan una fina comunicación mediante sus productos y las causas que provocan la alteración de una u otra hormona sobre la salud. Es por esta razón, que en este trabajo de tesis doctoral nos propusimos contribuir al esclarecimiento de la función de los FTs NeuroD1 y CREB en la GP, empleando al páncreas y al cerebelo como órganos endocrino y nervioso control, respectivamente.

Hipótesis de trabajo

La hipótesis general de la presente tesis doctoral es que los factores de transcripción NeuroD1 y CREB modularían cooperativamente el transcriptoma de la glándula pineal.

Objetivo general

La tesis aquí presentada pretende contribuir al conocimiento de los procesos biológicos que sustentan la homeostasis de la glándula pineal. Se busca esclarecer los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la fisiología pineal, a fin de contribuir a la prevención, el diagnóstico y tratamiento de desórdenes circadianos y patologías asociadas como desórdenes metabólicos o neurodegenerativos. Para alcanzar este cometido, en la presente tesis se planteó el estudio del control transcripcional, producto de los factores de transcripción CREB y NeuroD1, y su participación en el mantenimiento del fenotipo pineal.

Objetivos específicos

- 1- Profundizar en la caracterización de los patrones de distribución espacial y temporal de los factores NeuroD1 y CREB en la glándula pineal.*
- 2- Estudiar la potencial interacción entre NeuroD1 Y CREB en la glándula pineal.*
- 3- Identificar genes blanco potencialmente regulados por NeuroD1 en la glándula pineal.*

Materiales y Métodos

Animales

Los resultados presentados en esta tesis doctoral provienen de ensayos que fueron realizados en diferentes laboratorios. Se empleó como modelo a ratas (*Rattus norvegicus*) macho adultas de diferentes cepas. En la mayoría de los experimentos se trabajó con animales de la cepa Wistar de 3 meses de vida (P90, día posnatal 90), estos fueron mantenidos en el bioterio del IHEM, excepto aquellos utilizados para los experimentos de *Real Time* PCR que fueron alojados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Indiana (USA). Para los ensayos de hibridación *in situ* radiactiva (HIS) se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley de 2 meses de vida (P60, día posnatal 60) que fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad de Copenhague (Dinamarca). Todos los animales estuvieron bajo un ciclo L:O de 12:12 h, considerando al encendido de las luces como ZT0 (*Zeitgeber time* 0; 7 a.m.), con libre acceso al alimento y al agua.

Los experimentos y tratamientos practicados sobre los animales fueron previamente evaluados y avalados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo, Mendoza (Protocolos N° 9/2012 y 74/2016); además fueron diseñados según la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos (USA), y siguiendo las directivas de la Unión Europea, 2010/63/UE. Los animales usados en Estados Unidos fueron manipulados de acuerdo con las pautas aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Indiana (IUPUI) (número de autorización 2014-D332336-74). En cuanto a los experimentos con animales Sprague Dawley, éstos se realizaron de acuerdo con la directiva de la UE 86/609/CEE y fueron aprobados por el Consejo Danés para Experimentos con Animales (número de autorización 2012-DY-2934-00022) y por la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad de Copenhague (número de autorización P13-035).

El sacrificio se realizó mediante decapitación con guillotina previa anestesia por vía intraperitoneal, utilizando una mezcla de ketamina/xilacina (dosis: 50 mg/Kg y 5 mg/Kg de peso corporal, respectivamente); mientras que

los animales utilizados para las técnicas de HIS y *Real Time* PCR fueron anestesiados en cámara de CO₂.

Para los estudios de inmunohistoquímica (IHQ), las GPs se colectaron en dos momentos de la fase de luz (ZT6 y ZT10) y dos durante la fase de oscuridad (ZT14 y ZT18), en este último caso bajo una luz roja tenue. Para la técnica de Western blot (WB), las muestras fueron recogidas a ZT6, ZT14 y ZT18, para RT-PCR a ZT6 y ZT18, mientras que para *Real Time* PCR a ZT6. Las muestras de páncreas se utilizaron para ensayos de IHQ, y las mismas se recogieron a ZT6 y ZT18. Las muestras de Cerebelo (Ce) se utilizaron para IHQ, WB y Coinmunoprecipitación (Colp) y fueron tomadas a ZT6.

Remoción de los ganglios cervicales superiores

Ratas machos adultas (P90) fueron sometidas a la remoción bilateral de los ganglios cervicales superiores (GCS), técnica conocida como ganglionectomía (GCSx), siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio y publicado por Savastano y cols. [187]. Brevemente, los animales fueron anestesiados con la mezcla ketamina/xilacina e inmovilizados en posición decúbito dorsal. La zona del cuello fue previamente rasurada y desinfectada con una solución al 70% de alcohol etílico. Luego se realizó una incisión vertical de aproximadamente 2,5 cm de longitud, de manera que las glándulas salivales fueran expuestas y retraídas con el fin de descubrir los músculos adyacentes. La bifurcación de la arteria carótida común (ACC) fue identificada a ambos lados de la línea media y a nivel de una región anatómica conocida como triángulo carotídeo. A continuación, los GCS fueron identificados y removidos por corte de los troncos simpáticos (TS) y los nervios carotídeos internos (NCI) y externos (NCE) (Figura 9A). Finalmente, se procedió a la sutura quirúrgica de la región ventral del cuello y a la espera de la recuperación del animal antes de ser llevado nuevamente al bioterio. La eficiencia del procedimiento se evaluó mediante la confirmación al microscopio óptico de la arquitectura ganglionar y sus ramas, y mediante la confirmación de la ptosis palpebral o blefaroptosis (Figura 9B), la cual debió ser bilateral. Animales con ptosis unilateral o bilateral parcial fueron descartados por eutanasia programada. Los animales del grupo falsamente operado (FO) fueron sometidos a todos los pasos quirúrgicos que conducen a la

exposición de los GCS sin llegar a la remoción de los mismos. Los animales fueron trasladados finalmente al bioterio y mantenidos en las mismas condiciones ambientales descritas anteriormente por un mínimo de tres semanas hasta el sacrificio, a fin de lograr que los efectos de la GCSx fuesen crónicos.

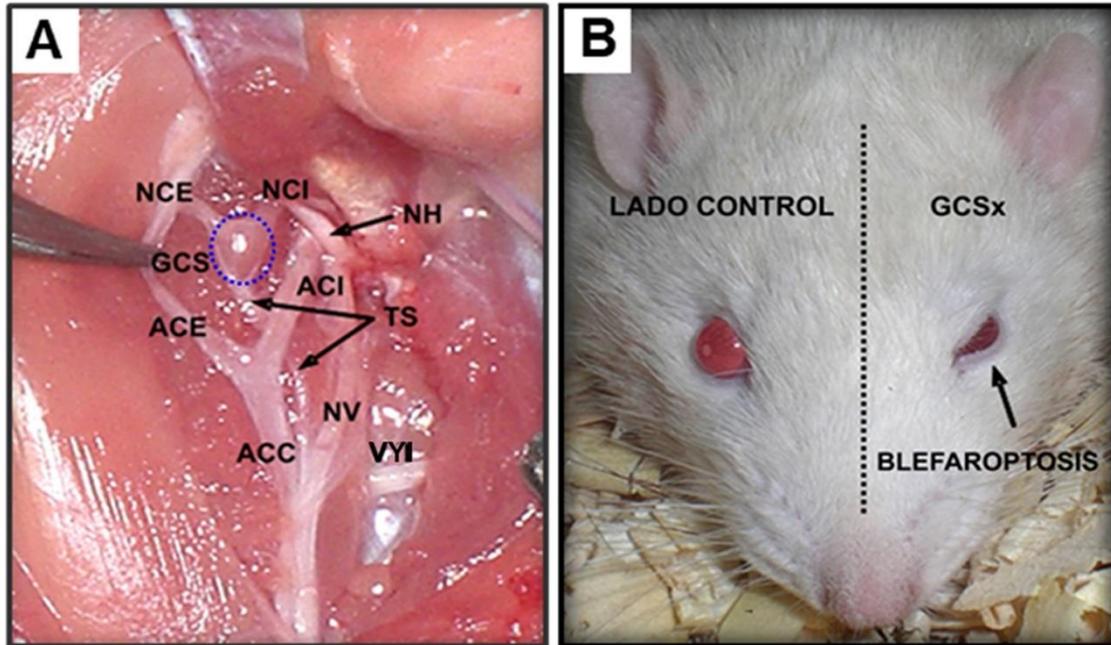


Figura 9. Elementos anatómicos de referencia en la región de los ganglios cervicales superiores y ptosis palpebral posterior a la remoción de los mismos.

A- Disección anatómica de uno de los ganglios cervicales superiores (GCS) y sus adyacencias. En la ganglionectomía (GCSx) se lleva a cabo la remoción del GCS (óvalo de línea punteada azul) mediante un corte a nivel del tronco simpático (TS), del nervio carotídeo interno (NCI), y del nervio carotídeo externo (NCE). B- Ptosis palpebral o blefaroptosis unilateral observada como consecuencia de la remoción exitosa de un GCS. ACC: Arteria carótida común; ACE: Arteria carótida externa; ACI: Arteria carótida interna; NH: Nervio hipogloso; NV: Nervio vago; VVI: Vena yugular interna. Modificada de Savastano y cols. [187].

Inmunohistoquímica (IHQ)

Los tejidos de interés, GP, Ce y páncreas, fueron extraídos e inmediatamente se sumergieron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X (buffer fosfato salino, pH 7,4), a 4°C, durante 24 h para GP y 48 h en el caso de páncreas y Ce. Finalizada la fijación en PFA, los mismos se lavaron tres veces con PBS 1X, en agitación por 5 min, a temperatura ambiente. Luego de los lavados, los tejidos fueron deshidratados en soluciones alcohólicas de

concentraciones crecientes (50, 70, 80, 96 y 100%), durante 15 min en cada solución para las GPs, mientras que páncreas y Ce fueron expuestos durante 60 min a cada solución. Una vez finalizado el procedimiento de deshidratación, las muestras fueron sumergidas en una mezcla 1:1 de xilol:alcohol 100% por 15 min para GP ó 60 min para páncreas y Ce, seguido de dos inmersiones en xileno por 15 min para GPs ó 30 min para páncreas y Ce, y luego en una mezcla 1:1 de xilol:Histoplast (Histoplast, *Biopack*. Cat. 1203.59), la cual se dejó solidificar a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla fue reemplazada por Histoplast puro, para lo cual fue necesario primero derretir la mezcla xilol:Histoplast y reemplazarla con Histoplast puro a 60°C. Se realizaron dos pasajes en Histoplast antes de la inclusión final de los bloques tisulares y el armado de los tacos. Estos últimos fueron almacenados a 4°C hasta el momento de realizar los cortes. Secciones de tejido de un espesor de 10 µm se obtuvieron utilizando un micrótopo *Microm HM-325 (Thermo Fisher Scientific Inc.)*. Los cortes fueron expandidos utilizando un baño termostático a 55-60°C y montados en portaobjetos cargados. Para favorecer la adherencia de las secciones tisulares al vidrio, se las incubó por 2-3 min en estufa a 60°C. Los cortes se almacenaron en cajas cerradas a 4°C hasta su utilización.

Para realizar la IHQ, los cortes se lavaron dos veces, durante 5 min con xilol para remover el Histoplast; luego se rehidrataron en soluciones de alcoholes de concentraciones decrecientes: etanol al 100%, etanol al 96%, etanol al 80%, etanol al 70%, etanol al 50% y finalmente en agua bidestilada, dejándolos 5 min en cada solución. Los tejidos adheridos a los portaobjetos fueron colocados en buffer citrato de sodio (citrato de sodio 10 mM pH 6, Tween-20 al 0,05%) por 30 min dentro de una olla a presión a 100°C con el fin de exponer los epítopes y facilitar la unión específica de los anticuerpos primarios. Una vez terminado el tratamiento de exposición, los cortes se dejaron enfriar en el citrato hasta alcanzar temperatura ambiente. Para reestablecer el pH fisiológico, los tejidos se lavaron 3 veces con PBS 1X, durante 5 min cada vez, en agitación suave. Para bloquear los sitios de unión no específicos, las secciones fueron incubadas con solución de bloqueo [suero de burro al 10% (*Jackson ImmunoResearch Lab.*, Cat. 017-000-121), Tritón X-100 al 1% y gelatina al 0,2% en PBS 1X], por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los cortes de tejido fueron incubados

con una mezcla de anticuerpos primarios diluidos en buffer con suero de burro al 2% (suero de burro 2%, Tritón X-100 1% y gelatina 0,2% en PBS 1X) y se dejaron incubar toda la noche a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Las inmunomarcaciones fueron realizadas con los anticuerpos primarios incluidos en la Tabla 1. Posteriormente, los cortes fueron lavados con PBS 1X en agitación; se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno. Luego, se procedió a incubar las muestras con los anticuerpos secundarios conjugados a diversos fluoróforos (Tabla 2) y diluidos en la solución buffer para anticuerpos con suero de burro al 2%, por 2 h, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. A continuación, los tejidos fueron lavados tres veces con PBS 1X en agitación suave. Finalmente, los cortes fueron montados con medio de montaje conteniendo Mowiol al 9,6 % m/v (*Mowiol 4-88, Sigma-Aldrich, Cat.81381*) y glicerol al 24% m/v en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8.5). Se agregó DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride, Invitrogen, Cat. D1306*) junto a los anticuerpos secundarios en una dilución 1/400 para evidenciar los núcleos celulares. Dependiendo de la combinación de fluoróforos utilizados, se empleó también medio de montaje NPG-glicerol conteniendo n-propil galato al 2% (*Sigma, Cat. P3130*), glicerol al 90%, PBS 1X y, yoduro de propidio 20X al 0,15% (*Sigma, Cat. P4170*) como marcador nuclear. Por último, los cortes inmunomarcados fueron cubiertos con cubreobjetos y almacenados a 4°C hasta su visualización en el microscopio confocal *Olympus FV-1000 (Olympus america Inc., Center Valley, PA, USA)*.

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de IHQ.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie de origen</i>	<i>Dilución de uso</i>	<i>Proveedor y N° de catálogo</i>
Anti-CREB	Conejo	1/300	<i>Abcam, ab31387.</i>
Anti-GFAP	Ratón	1/400	<i>Sigma, G3893.</i>
Anti-Iba1	Cabra	1/400	<i>Abcam, ab5076.</i>
Anti-Ins	Cobayo	1/500	<i>Dako, #A0564.</i>

Anti-NeuroD1	Cabra	1/50	<i>Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-1084.</i>
Anti-Pax6	Conejo	1/200	<i>Covance, PRB-278P.</i>
Anti-pPOLII	Conejo	1/300	<i>Abcam, ab 5408.</i>

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados en ensayos de IHQ.

Anticuerpo	Especie de origen	Dilución de uso	Proveedor y N° de catálogo
Anti-cabra Alexa Fluor 647	Burro	1/200	<i>Jackson ImmunoResearch Lab., 705-605-147.</i>
Anti-Cobayo Alexa Fluor 594	Cabra	1/500	<i>Jackson ImmunoResearch Lab., 106-587-008.</i>
Anti-conejo Alexa Fluor 488	Burro	1/400	<i>Jackson ImmunoResearch Lab., 711-545-152.</i>
Anti-ratón Cianina 3	Burro	1/200	<i>Jackson InmunoResearch Lab., 715-165-151.</i>

Las imágenes de las IHQ fueron obtenidas con el microscopio confocal *Olympus FV-1000*, determinando en primera instancia parámetros específicos que permitieron estandarizar la toma de imágenes entre las diferentes GPs y entre los diferentes ZTs: intensidad de los láseres seleccionados, velocidad de toma de la imagen, apertura del *pinhole*, resolución de la imagen y voltaje del fotomultiplicador a fin de evitar la saturación de la imagen capturada.

El modelo de trabajo para el análisis morfométrico y estadístico se puede observar en la Figura 10. El procesamiento y análisis de las fotografías se logró con el programa *Image J 1.52 d (NIH, USA)* mediante el desarrollo de un protocolo especialmente diseñado que permitió aislar núcleos individuales de las fotografías tomadas y determinar el número de píxeles fluorescentes y de intensidad de fluorescencia. El cálculo del número de núcleos a aislar para obtener una representación estadísticamente adecuada para cada ZT y la

verificación de la normalidad de los datos obtenidos se logró por medio del programa *PRISM6* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

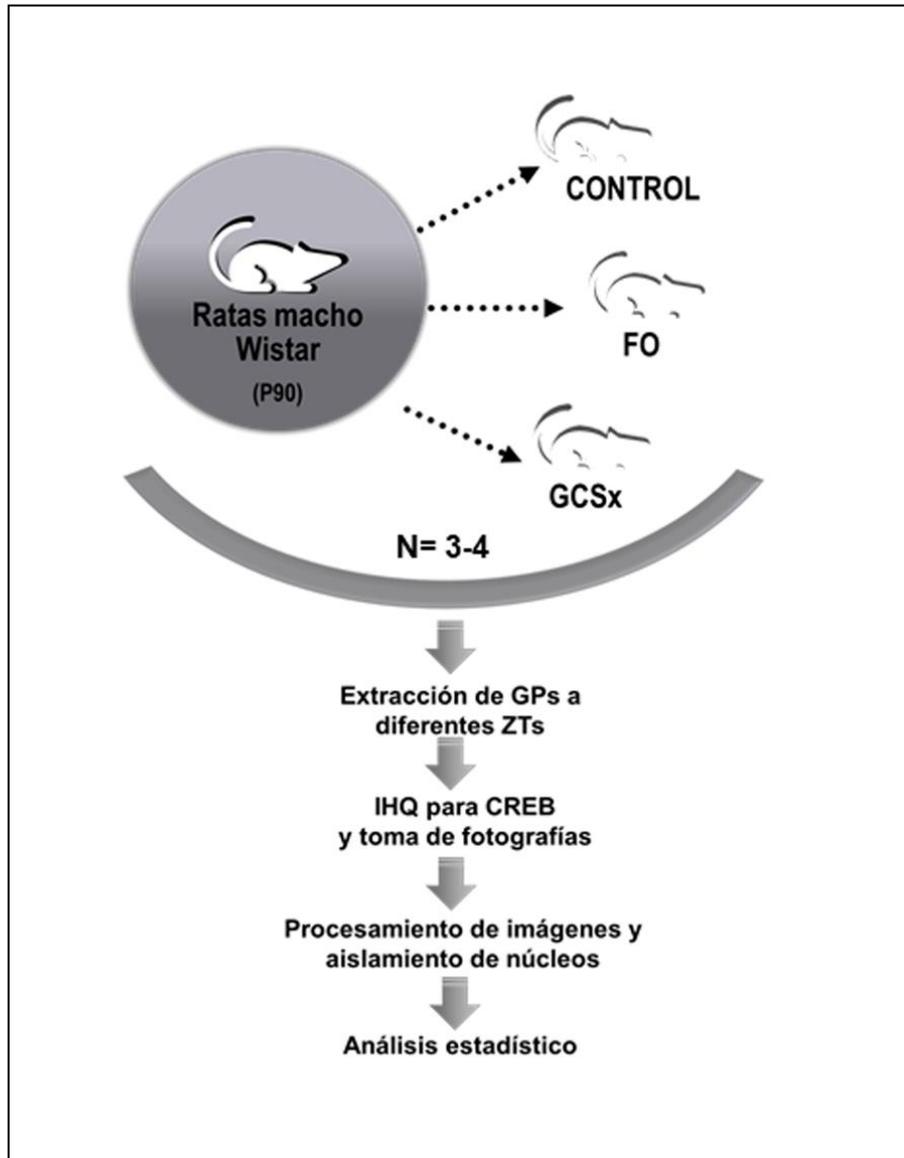


Figura 10. Modelo de trabajo para el análisis morfométrico y estadístico.

Ratas machos Wistar (P90) fueron sometidas a cirugía para generar los grupos de animales ganglionectomizados (GCSx) y falsamente operados (FO). Ambos grupos permanecieron durante un mínimo de 3 semanas en periodo de recuperación para asegurar la degeneración de los nervios conarios y la no liberación de NE a nivel de la glándula pineal (GP). Se comprobó la correcta extracción de los ganglios cervicales superiores (GCS) mediante el signo de blefaroptosis (Figura 9B). Los animales del grupo falsamente operado (FO) fueron sometidos a todos los pasos quirúrgicos que conducen a la exposición de los GCS sin llegar a la remoción de los mismos. El grupo CONTROL se conformó de animales que no fueron sometidos a

procedimientos quirúrgicos. Secciones de GPs de los grupos CONTROL, FO y GCSx, fueron utilizadas en ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) para la proteína CREB. DAPI se utilizó como marcador nuclear. Se tomaron fotografías de las IHQ con el microscopio confocal *Olympus FV-1000*. Las fotografías fueron sometidas a análisis morfométrico. Para este fin se diseñó un protocolo específico que nos permitió cuantificar el número píxeles de CREB, en núcleos de pinealocitos individuales, con el programa *Image J 1.52 d* (NIH, USA). Para el análisis morfométrico y estadístico se utilizó ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey con el programa *PRISM6* (*GraphPad Software Inc., La Jolla, CA*).

Western blot (WB)

Un mínimo de 10 GPs provenientes de ratas adultas se recolectaron a ZT6, ZT14 y ZT18 en nitrógeno líquido, y fueron almacenadas en microtubos a -80°C hasta el momento de la extracción proteica. Además, se recolectó Ce a ZT6, que sirvió para la optimización de los anticuerpos para las diferentes moléculas estudiadas y como control en las experiencias.

Para la obtención de extractos proteicos totales, el contenido de cada microtubo se homogeneizó en baño de hielo utilizando un homogeneizador (*Bio-Gen PRO200 Homogenizer, Pro-Scientific, Cat. 01-01200*) y buffer de lisis tritón al 0,5% (Tris-HCl 1 M pH 7,5, NaCl 150 mM, tritón 100X al 0,5%, EDTA 5 mM) suplementado con los inhibidores de fosfatasa: NaF 1 M y Na₃VO₄ (ortovanadato de sodio) 100X, y los inhibidores de proteasas: PMSF 1000X (del inglés, *phenylmethylsulfonyl fluoride*,) y con las tabletas comerciales PIC (del inglés, *inhibitor cocktail tablets, Roche, Cat. 11836153001*) que contienen: *Pepstatin A, Bestatin, Leupeptin, Aprotinin* y E64 (del inglés, *trans-epoxysuccinil-L-leucilamido (4-guanidino)-butane*). Luego de la homogeneización de los tejidos, los microtubos fueron incubados en hielo, por 10 min. Posteriormente se los centrifugó a 13000 rpm, a 4°C, durante 15 min, y se recuperaron los sobrenadantes para su análisis.

La medición de la concentración de proteínas totales se realizó utilizando el kit comercial *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Fisher Scientific, Cat. 23225*), basado en el método del ácido bicinconínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas. Este método combina la reducción de Cu⁺² (ion cobre) en forma de CuSO₄ a Cu⁺¹ ante la presencia de proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret), con la detección altamente sensible y

selectiva del catión Cu^{+1} . La cantidad de ion cúprico reducido es proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la solución. El producto de reacción de color púrpura de este ensayo se debe al secuestro de un ión cuproso por dos moléculas de BCA, exhibiendo este complejo un máximo de absorbancia a 562 nm. El ensayo es lineal en un rango de concentración de proteínas entre 20-2000 $\mu\text{g/ml}$. [188]. Se preparó la solución de trabajo mezclando el reactivo de BCA con una solución de CuSO_4 4 % en proporción 50:1 y se adicionaron 200 μl de la misma a pocillos de una placa de 96 pocillos, conteniendo las muestras proteicas a determinar y muestras del estándar, albúmina sérica bovina (BSA, del inglés, *Bovine Serum Albumin*, Santa Cruz Biotechnology, Cat. sc-2323) de concentración conocida (provista en el kit), en diluciones seriadas de concentraciones comprendidas entre 0 y 1 mg/ml. La placa se incubó a 37 °C, durante 30 min y se leyó luego la absorbancia en un espectrofotómetro (*Multiskan FC*, Thermo Fisher Scientific, Cat. 51119000). Con los valores obtenidos para las distintas diluciones del estándar se confeccionó una curva de calibración a la cual se le realizó una regresión lineal, obteniéndose así los valores de la ordenada al origen y la pendiente. Con dichos valores se pudo proceder al cálculo de la concentración para las respectivas muestras de los lisados totales, empleándose un volumen tal de muestra que no excediera los límites de linealidad de la curva.

Las proteínas fueron resueltas por electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida-SDS (15%; 0,5%), según las indicaciones del manual *Lab Reference* (Cold Spring Harbor Laboratory press) para identificar CREB (43 kDa) y NeuroD1 (49 kDa). Para la detección de CREB y NeuroD1 en GP, se sembraron 40 μg de proteínas totales. Como control de carga se utilizaron los anticuerpos anti-Act (Actina, 42 kDa), anti-H3 (Histona, 17 kDa) o anti-Tuj1 (Tubulina III β , 50 kDa), siempre se incluyó un control negativo incubado solo con el anticuerpo secundario (Tabla 3). Las muestras sembradas se prepararon en microtubos, agregando al lisado proteico (40 μg proteínas totales), 6,25 μl de *SDS-PAGE Sample Loading Buffer 4X* (Tris 1,5 M, glicerol 40%, SDS 8%, azul de bromofenol 1%), al cual se le añadió β -mercaptoetanol al 10% v/v antes de usar. Se llevó cada microtubo a un volumen final (V_f) de 25 μl con H_2O miliQ. A continuación, las muestras fueron calentadas a 100°C durante 5 min para

permitir la desnaturalización de las proteínas, y luego se dejaron reposar a temperatura ambiente, por 40 min. Transcurrido ese tiempo las muestras fueron sembradas en el gel de poliacrilamida. Se sembró, además, el marcador de peso molecular (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. 26619*). La resolución de las muestras se llevó a cabo en una cuba electroforética (*Mini-PROTEAN® Tetra Cell, BIO-RAD, Cat. 165-8000*), con buffer de corrida 1X, pH 8.3 (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.1%) a 100 voltios, durante 180 min. Las proteínas fueron luego transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), utilizando un buffer de transferencia 1X, pH 8.3 (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%, metanol al 20%) a 25 voltios, 50 min, en cuba semiseca (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BIO-RAD, Cat. 170-3940*).

Para verificar la eficiencia de la transferencia, la membrana fue teñida con una solución rojo Ponceau (0,5 g de rojo Ponceau S, 1 ml de ácido acético glacial, H₂O miliQ hasta Vf=100 ml) durante 15 min. De esta forma se corroboró la presencia de las bandas proteicas, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos mediante el uso de una solución de bloqueo (BSA al 5%, 0,1% v/v de Tween-20 en TBS 1X) en agitación suave, a temperatura ambiente por 1 h. Como control adicional de la transferencia, el gel remanente fue sometido a una tinción con solución de azul de Coomassie (0,25 g de Coomassie brillant blue G250, 25 ml de ácido acético glacial, 125 ml de metanol, H₂O miliQ hasta un Vf=100 ml) con el fin de confirmar la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF y su consecuente ausencia en el gel. Luego del bloqueo, las membranas fueron enjuagadas 3 veces en agitación suave, por 10 min con solución de lavado (Tween-20 al 0.05% en TBS 1X), y posteriormente se las incubó a 4°C durante toda la noche, con el anticuerpo primario a ensayar (Tabla 3) diluido en la solución buffer para anticuerpos (BSA al 5%, Tween-20 al 0.05% en TBS 1X). El exceso de anticuerpo primario fue eliminado con solución de lavado, enjuagando tres veces en agitación suave durante 10 min. Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4) conjugado a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) en solución de lavado, en agitación, a temperatura ambiente, por 1 h. Posteriormente se procedió a lavar las membranas tres veces con solución de lavado, en agitación, por 10 min cada vez y se lavaron por última vez con TBS 1X (para evitar que el

Tween-20 del T-TBS interfiriera con la reacción del luminol). Para revelar las membranas y visualizar las bandas se utilizó el kit comercial *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (EMD Millipore, Cat. WBKLS0100), el cual consta de dos reactivos: A (que contiene luminol) y B (con peróxido de hidrógeno). Se mezclaron ambos reactivos en una relación 1:1, en una dilución 1/10 y el preparado se utilizó para mojar cada membrana durante 5 min, sin exponer a la luz. Luego las bandas proteicas fueron visualizadas con el equipo LAS-4000 (*ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences*).

Coinmunoprecipitación (CoIP)

Para realizar esta técnica se usó GP (un mínimo de 10 GPs) y cerebelo (entre 20 y 40 µg). Las muestras se recolectaron a ZT6 en nitrógeno líquido, y fueron almacenadas en microtubos a -80°C hasta el momento de la extracción proteica. Para la obtención de extractos proteicos totales, se utilizó el método descrito para WB, en el que el contenido de cada microtubo se homogeneizó en baño de hielo utilizando un homogeneizador (*Bio-Gen PRO200 Homogenizer, Pro-Scientific, Cat. 01-01200*) con diferente buffer de lisis desnaturante (0,60 g Tris-base, 0,88 g NaCl, 0,5 g Desoxicolato de sodio, 0,1 g SDS, H₂O miliQ hasta Vf=100 ml) suplementado con NP40 al 0,05% y con los inhibidores de fosfatasa: NaF 1 M y Na₃VO₄ 100X, y los inhibidores de proteasas: PMSF 1000X y con las tabletas comerciales PIC. Luego de la homogeneización de los tejidos se centrifugó a 10000 rpm, a 4°C, durante 20 min, y se recuperaron los sobrenadantes que se trasvasaron a microtubos enfriados previamente y fueron colocados en hielo. La concentración proteica de los extractos se realizó utilizando el kit comercial *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, como se describió anteriormente en el apartado de WB.

A continuación, 500 µl del homogenato proteico se colocaron en un microtubo limpio y frío, a una concentración de 1 mg/ml. El preaclaramiento del lisado se realizó de la siguiente manera: se resuspendieron las perlas de agarosa (*Protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz Biotechnology, Cat. sc-2003*) con vórtex suave y se agregaron 20 µl de perlas al lisado celular y la mezcla se incubó en agitación a 4°C, por 30 min. Luego se centrifugó a 1300 rpm, a 4°C, por 2 min y el sobrenadante se transfirió a otro microtubo.

Para realizar la inmunoprecipitación, se agregaron 2 µg del anticuerpo para NeuroD1 (Tabla 3) al microtubo de sobrenadante del paso anterior y se incubó en agitación, a 4°C, por 2 h. Pasado este tiempo, se agregaron 30 µl de las perlas al microtubo en hielo y se incubó en agitación, a 4°C, por 1 h. Seguido a la incubación, se centrifugó el microtubo a 1300 rpm, a 4°C, por 30 seg. El sobrenadante (SN) obtenido fue recogido en un microtubo y almacenado a 4°C, mientras que el precipitado (IP) remanente fue lavado 4 veces con 500 µl de PBS frío (con agregado de los inhibidores usados para preparar el buffer de lisis), centrifugando a 1300 rpm durante 30 seg después de cada lavado. Los sucesivos sobrenadantes obtenidos fueron guardados a -20°C. Tras realizar el último lavado y centrifugación, al precipitado obtenido se le agregaron 50 µl de *SDS-PAGE Sample Loading Buffer* (25 µl de *Sample Loading Buffer* 4X + 25 µl de agua miliQ). Se agitó vigorosamente y se calentó a 100°C durante 5 min. Una vez finalizado este paso, el precipitado se almacenó a -20°C hasta el día siguiente, en el que se procedió con la siembra del gel de poliacrilamida y se continuó con los pasos del WB, tal como se lo describió en el apartado anterior.

Tabla 3: Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de CoIP y WB.

Anticuerpo	Especie de origen	Dilución de uso	Proveedor y N° de catálogo
Anti-Act	Conejo	1/5000	<i>Sigma</i> , A2066.
Anti-CREB	Conejo	1/3000	<i>Cell Signaling</i> , 9197.
Anti-H3	Conejo	1/10000	<i>EMD Millipore</i> , 07-690.
Anti-NeuroD1	Conejo	1/3000	<i>Cell Signaling</i> , 4373.
Anti-NeuroD1 (para inmunoprecipitar)	Cabra	1/26 (2 µg)	<i>Santa Cruz Biotechnology Inc.</i> , sc-1084.
Anti-TUJ1	Ratón	1/5000	<i>Covance</i> , MMS-435P.

Tabla 4: Anticuerpos secundarios utilizados en ensayos de WB.

Anticuerpo	Especie de origen	Dilución de uso	Proveedor y N° de catálogo
Anti-conejo HRP	Burro	1/50000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-035-152.
Anti-ratón HRP	Burro	1/50000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-035-003

Transcripción reversa seguido de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La extracción de ácido ribonucleico total (ARN total), la transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se realizaron siguiendo un protocolo de rutina de laboratorio, el cual fue adaptado para los genes blanco del presente trabajo.

La extracción de ARN total se realizó a partir de un mínimo de 5 GPs que fueron recolectadas a ZT6 y ZT18 y almacenadas a -80°C luego de la extracción. La homogeneización de los tejidos se llevó a cabo mediante el método de fenol-cloroformo basado en el método clásico ideado por Chomczynski y Sacchi [189]. Se agregaron 250 µl del reactivo Trizol (*TRI Reagent®*, *Sigma-Aldrich*, Cat. T9424) por cada 20 mg de tejido, y éstos se disgregaron mecánicamente utilizando un émbolo plástico. El homogenato obtenido se incubó a temperatura ambiente, durante 5 min, antes de adicionar 100 µl de cloroformo (*Chloroform*, *Sigma-Aldrich*, Cat. 372978), luego se agitó vigorosamente durante 15 seg, y se incubó a temperatura ambiente, durante 2-3 min. Una vez cumplido el tiempo, se procedió a la separación de fases, centrifugando los homogenatos bajo las siguientes condiciones: 12.000 rpm, a 4°C, por 15 min. La fase acuosa fue transferida con precaución, evitando arrastrar la interfase, a un nuevo

microtubo estéril, previamente enfriado. Seguidamente, se precipitó el ARN total mediante el agregado de 250 μ l de alcohol isopropílico (*Isopropyl alcohol, Sigma-Aldrich*, Cat. W292907) e incubación a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 12.000 rpm, 4°C, durante 10 min, precipitando el ácido ribonucleico en el fondo del microtubo. Se descartó el sobrenadante y se lavó el ARN total con 500 μ l de etanol al 75%. Se agitó vigorosamente la muestra por unos segundos y se llevó a centrifugar nuevamente, esta vez a 7.500 rpm, a 4°C, por 5 min. Se descartó el etanol, y el precipitado obtenido se dejó secar al aire. Por último, el ARN total precipitado fue resuspendido en 20 μ l de agua tratada con DEPC (del inglés, *diethyl pyrocarbonate*) libre de nucleasas (*UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen*, Cat. 10977023). Se realizó la medición de la concentración de ARN total para cada una de las muestras, con los objetivos de normalizar la cantidad de ARN total a usar en la reacción de retrotranscripción posterior y evaluar la calidad de ARN total a través de la relación A260/A280, la cual fue aceptada entre los valores de 1,8-2. La medición se realizó con el espectrofotómetro *NanoDrop (Espectrofotómetro NanoDrop™ Lite, Thermo Fisher Scientific Inc*, Cat. 269-275200). Los ARN totales fueron almacenados a -80°C hasta su posterior reacción de amplificación.

De cada una de las muestras se tomó 1 μ g de ARN total, y se agregó H₂O DEPC en cantidad necesaria para llegar a un Vf= 2 μ l. Se utilizó este método con el fin de que todas las muestras partieran de la misma concentración de ARN total (0,5 μ g/ μ l) y que las potenciales variaciones en las bandas obtenidas luego de la RT-PCR y la electroforesis fueran producto sólo de la diferente expresión de los genes blanco.

Para la retrotranscripción (RT), se preparó en hielo una mezcla de síntesis de ácido desoxirribonucleico copia (ADNc), conteniendo: 3 μ l de H₂O DEPC; 0,5 μ l de cebadores al azar (*Random Nonamers, Sigma-Aldrich*, Cat. R7647); 0,5 μ l de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (10 mM); y 2 μ l de ARN total (muestra problema). Se incubaron los microtubos a 65°C durante 5 min, utilizando una placa termostaticada, luego se colocaron inmediatamente en hielo y se les agregaron a cada microtubo: 2 μ l de buffer de síntesis de ADNc 5X; 0,5 μ l de DTT (*dithiotreitol, Invitrogen*, Cat. 12236014); 1,25 μ l de H₂O DEPC y 0,25 μ l de la enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa (*ThermoScript™ Reverse*

Transcriptase, Invitrogen, Cat. 12236014). La mezcla, con un Vf=10 µl, fue llevada al termociclador (*MultiGene™ Mini Personal Thermal Cycler, Labnet*, Cat. TC020) donde fue sometida a ciclos de: 25°C por 10 min; 50°C por 60 min y por último 85°C por 5 min. El ADNc obtenido fue almacenado a -80°C.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se procedió de la siguiente manera: se añadió un control negativo, en el cual se reemplazó el ADNc con H₂O DEPC, y un control de carga que consistió en el gen *β-actina* (*Actb*), que fue usado para calcular la expresión relativa del gen blanco. Para comenzar la PCR se preparó una mezcla de reacción que contenía por cada muestra: 2,5 µl de buffer 10X; 0,5 µl de dNTPs (10 mM, *dNTPs Set, Invitrogen*, Cat. 10297018); 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM); 0,25 µl de cebadores sentido y anti-sentido para los ADNc de los genes blanco y *Actb* (Tabla 5); 18,5 µl de H₂O DEPC; 2 µl de ADNc y 0,2 µl de la enzima Polimerasa (*Taq DNA Polymerase, recombinant, Thermo Fisher Scientific*, Cat. 10342020). El Vf de la mezcla para cada microtubo de PCR fue de 25 µl. La mezcla se llevó al termociclador, en el cual se configuraron las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30 seg; 58°C por 1 min y 72°C por 1 min. Se añadió también una etapa de elongación final de 72°C por 10 min para las cadenas de ADN que no pudieron sintetizarse completamente. Una vez finalizado el proceso, se almacenó el producto de PCR a -80°C hasta su análisis.

Para las electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 1,5% peso/volumen (p/v). Para ello se disolvieron 0,45 g de agarosa en 30 ml de buffer TAE 1X por calentamiento en microondas. Se le añadieron 0,3 µl de Gel Red (*Gel Red™ Nuclei Acid Gel Stain, Biotium*, Cat. 41003), se mezcló la solución y se vertió sobre el molde de la cuba. Se añadió inmediatamente el peine y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 40 min. Luego se retiró el peine con precaución, y se agregó el buffer de corrida (buffer TAE 1X). Se prepararon las muestras mezclando el producto de PCR con agua DEPC y buffer de carga (*DNA Gel Loading Solution, Quality Biological, Inc.* Cat. 351-028-031). Para visualizar el tamaño de los fragmentos obtenidos se corrieron las muestras en paralelo con un marcador de peso molecular (*GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas*, Cat. SM0321) con bandas de 100 a 1000 pb. Los geles fueron resueltos a 90 V, por 1 h, y luego se observaron en el equipo *LAS-4000*.

Análisis de bandas

Las bandas generadas tanto en la técnica de WB como en la de RT-PCR fueron analizadas con el programa *ImageJ 1.52d*® (NIH, USA). El mismo permitió determinar la densidad óptica (D.O.) de cada una de las bandas con gran precisión. Una vez obtenidos los valores para cada banda se relativizaron los valores de la D.O. de las moléculas estudiadas con respecto a los controles internos elegidos en cada situación, y se realizaron los análisis estadísticos correspondientes.

Real Time PCR

La técnica de PCR en tiempo real (*Real Time PCR*) cuantitativa se incluyó para agudizar la detección de aquellos transcriptos que se encontraban en el límite de detección de las técnicas aquí utilizadas. Es decir se utilizó para medir y comparar los niveles del transcripto del gen *Ins1* en la GP, Ce y células Min 6 productoras de Ins, a ZT6. En N₂ líquido, se recolectaron muestras de GPs y Ce de 5 ratas machos adultas (P90) de la cepa Wistar y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Para la extracción de ARN total los tejidos fueron disgregados mecánicamente utilizando un émbolo de vidrio y buffer de lisis provisto por el kit (*RNeasy Plus mini kit*, Qiagen, Cat. 74134). En cuanto a las células, luego de que llegaran a una confluencia del 90%, se cosecharon y se homogeneizaron con una jeringa agregando el buffer de lisis. Mediante el uso del *RNeasy Plus mini kit* (Qiagen, Cat. 74134) se extrajo el ARN total de los tejidos y de las células siguiendo las instrucciones provistas en el manual. Las concentraciones de ARN total obtenidas fueron medidas en un espectrofotómetro (*NanoDrop*™, Thermo Fisher Scientific Inc.) y la calidad del producto se evaluó a través de la relación A260/A280, aceptando valores entre 1,8-2. De cada una de las muestras se tomó 1 µg de ARN total, y se agregó H₂O DEPC en cantidad necesaria para llegar a un Vf = 2 µl (0,5 µg/µl).

Para la síntesis de ADNc se preparó en hielo una mezcla reacción conteniendo: 5 µl de H₂O DEPC; 1 µl de cebadores al azar (*Random Hexamers*, Thermo Fisher Scientific, Cat. N808127); 1 µl de dNTPs (10 mM); y 0,5 µg de ARN total (muestra problema). Se incubaron los microtubos a 65°C por 5 min

utilizando el termociclador (*T100™ Thermal Cycler, BIO-RAD*, Cat. 1861096), luego se colocaron inmediatamente en hielo y se le agregaron a cada microtubo los siguientes reactivos provistos por el kit (*M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen*, Cat. 28025-013): 4 µl de buffer de síntesis de ADNc; 2 µl de DTT (0,1 M); 1 µl de H₂O DEPC y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa. La mezcla, con un Vf=20 µl, fue llevada al termociclador donde fue incubada a 37°C por 50 min, 70°C por 15 min (para inactivar la enzima), y por último a 4°C, por 5 min. El ADNc obtenido fue almacenado a -80°C.

Se realizaron tres experimentos independientes de *Real Time* PCR para *Ins1*, tomando *Actb* como gen de referencia. Se empleó el kit *SensiFAST™ SYBR®* (*Bioline*, Cat. Bio94005), siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando 2 µl de ADNc o H₂O DEPC (esta última para el control negativo), 0,3 µl de cada uno de los cebadores diseñados para cada molécula (Tabla 5), 10 µl de *Master Mix SYBR Green* (*Bioline*, Cat. Bio94005) y 7,4 µl de H₂O DEPC. El proceso final se llevó a cabo por duplicado y en un Vf=20 µl por pocillo, usando una placa de 96 pocillos (*MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, ThermoFisher Scientific*, Cat. N810560). Para la amplificación se usó el equipo *QuantStudio 3* (*QuantStudio™ 3 Real Time PCR System, ThermoFisher Scientific*, Cat. A28137). El programa de PCR incluyó los siguientes ciclos de temperatura: 95°C por 2 min, 40 ciclos de (95°C por 5 min, 58°C por 10 seg, 72°C por 10 seg).

Los niveles de expresión de *Ins1* se calcularon utilizando el método de cuantificación relativa con relación a un gen de referencia, basado en comparar los valores de Ct (del inglés, *Threshold cycle*) de los productos. El valor de Ct es el número de ciclos donde el producto de amplificación se eleva por encima de un umbral determinado. La amplificación para el gen de *Ins* (gen problema) y de *Actb* (gen de referencia) se realizó por duplicado en cada experimento independiente y se utilizó el promedio de los Ct de los duplicados para cada gen. Así la diferencia entre los valores de Ct se calculó:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}$$

Por último, para determinar el nivel de expresión del gen problema en las diferentes muestras se calculó:

$2^{-\Delta Ct}$ = Normalización

Mediante este método se han analizado los niveles de expresión del gen de *Ins1* en la GP, el Ce y las células Min 6, y se procedió al análisis estadístico para determinar las diferencias en la expresión del transcripto.

Tabla 5: Cebadores utilizados en la RT-PCR y/o Real Time PCR.

Nombre del gen	Secuencia nucleotídica	Tamaño del amplicón	Técnica
<i>Aanat</i> ID: 25120	Sentido: CTTTGGGACAAGGAGAGACTTAC Anti-sentido: CCCTTACCTCTCTACTCCACTT	482 pb	RT-PCR
<i>Actb</i> ID:81822	Sentido: CTTCCTTCTGGGTATGGAATC Anti-sentido: TCAGTAACAGTCCGCCTAGA	353 pb	RT-PCR
<i>Actb</i> ID:81822	Sentido: AGGTCATCACTATTGGCAACGA Anti-sentido: CACTTCATGATGGAATTGAATGTAGTT	118 pb	Real Time PCR
<i>Hiomt</i> ID:246281	Sentido: TGAGGCTAGGATAGGCAAGA Anti-sentido: CGATGACATCAGGGAGATCAAA	662 pb	RT-PCR
<i>Ins1</i> ID:24505	Sentido: TGGCTTCTTCTACACACCCAAG Anti-sentido: ACAATGCCACGCTTCTGCC	132 pb	RT-PCR/Real Time PCR
<i>NeuroD1</i> ID:29458	Sentido: TGGCTTCTTCTACACACCCAAG Anti-sentido: ACAATGCCACGCTTCTGCC		RT-PCR
<i>Tph1</i> ID:24848	Sentido: CAGTGGCTTTGAGGTCCTCTT	280 pb	RT-PCR

	Anti-sentido: TCTCGGTTGATGTCGCAGTC		
--	---------------------------------------	--	--

Hibridación *in situ* radiactiva (HIS)

Para estudiar la localización anatómica y expresión de los genes involucrados en la vía de señalización de Ins: *Ins*, *lapp*, *Gck*, *Cpe* e *Insr*, se realizó la técnica de hibridación *in situ* radiactiva (HIS). Para ello se extirparon cerebros enteros (incluida la GP) de ratas machos adultas de dos meses de vida (P60), de la cepa Sprague Dawley. Se tomaron 4 cerebros a ZT6 y 4 a ZT18. Luego de la extracción, los mismos fueron congelados inmediatamente en CO₂ sólido y almacenados a -80°C. Se realizaron cortes sagitales de los cerebros de 12 µm de espesor en un criostato (*Cryostat Leica CM3505, Leica Biosystem*). Las secciones fueron fijadas en PFA al 4% por 5 min, lavadas 2 veces con PBS 1X y acetiladas en solución de anhídrido acético al 0,25% durante 10 min. Seguidamente, los tejidos fueron deshidratados gradualmente en soluciones alcohólicas de concentraciones crecientes (70%, 5 min; 80%, 1 min; 95%, 2 min y 100%, 1 min). Una vez finalizado el procedimiento de deshidratación, las muestras fueron sumergidas en cloroformo durante 15 min, seguido de etanol al 100% durante 1 min y luego en etanol al 95% por 1 min. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con sondas de ADN, marcadas radiactivamente con S³⁵, diseñadas para los genes de estudio (Tabla 6). Luego, los tejidos se expusieron, junto con el estándar cerebral marcado con C¹⁴ (*GE Healthcare, Cat. RPA504L*), a una placa fotográfica (*Cronex 5 X-ray film, Agfa, Cat. QRX1824*) a 4°C, por 12 y 40 días.

Una vez pasado el tiempo de exposición, la placa fotográfica se reveló y se digitalizó. Se cuantificaron las D.O. de las imágenes y se transformaron los datos a dpm (desintegraciones por min)/mg de tejido, utilizando el estándar calibrado. Para estas determinaciones se usó el programa *Scion Image Beta 4.0.2* (*Scion Frederick, MD, USA*) [190]. Luego de obtener los datos, éstos fueron comparados y analizados estadísticamente.

Tabla 6: Sondas utilizadas en la HIS.

Nombre del gen	Secuencia de la sonda	Posición
Cpe ID: 25669	GCCTTCTTTCTCATTAAACATACACGATCCTATCCAA	703-668
Gck ID: 24385	GAAGTCAGAGATGCATTTCAGAGATGTAGTCAAAGAG	606-571
Iapp ID: 24476	TCTTCCCATATGTATTGGATCCCACATTGGTTGGTG	229-194
Ins1 e Ins2 ID:24505 e 24506	AGTTGCAGTAGTTCTCCAGTTGGTAGAGAGAG	388-357
Insr ID:24954	CTTTTAGACTTTCTAGGCCATAGACACGGAAAAGAA	649-614

Cultivo de células

Cultivos de células Min 6 (línea celular de insulinoma de ratón), fueron utilizados para los ensayos de *Real Time* PCR, y células 293T (células embrionarias de riñón), se utilizaron para los ensayos de luciferasa. Los cultivos se realizaron de la siguiente manera: en primer lugar, se prepararon los medios de cultivo agregando a un medio base DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Cat. 119665-092*), suero fetal bovino al 10% (*Bio West, Cat. S520*); penicilina/estreptomicina al 0,01%, y β -mercaptoetanol al 0,005%. En el caso de las células 293T el medio base se suplementó, además, con aminoácidos no esenciales hasta una concentración de 0,1 mM (*Lonza, Cat. 13-114E*), L-glutamina 200 mM (*Corning, Cat. 25-005-CI*), y se mezclaron todos los componentes por inversión. Luego, los medios se filtraron y se guardaron a 4°C hasta su posterior utilización.

Los viales con las líneas celulares almacenadas en N₂, se descongelaron bajo agua corriente; luego las células fueron transferidas a un tubo de 15 ml y se les agregaron 15 ml del medio correspondiente a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Las células fueron resuspendidas gentilmente en el medio y centrifugadas a bajas revoluciones (1200 rpm) por 2 min. A continuación, se aspiró el sobrenadante generado y al precipitado de células obtenido se le agregaron 10 ml de medio. Se resuspendió nuevamente y se transfirió la suspensión de células a un frasco de cultivo. El medio de cultivo se cambió cada

2-3 días o cuando las células llegaron a la confluencia del 90% aproximadamente.

Las células fueron repicadas una vez alcanzada la confluencia del 90% del frasco de cultivo. Se aspiró el medio agotado en nutrientes y el cultivo se lavó con 10 ml de DPBS 1X, libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (ion magnesio) (*Dulbecco's phosphate buffered saline, Thermo Fisher Scientific, Cat. A1285601*). Se aspiró luego el DPBS y se agregaron 5 ml de tripsina. El frasco fue incubado por 2 min a 37°C, o hasta que las células se despegaran del fondo. Se agregaron a continuación 10 ml de medio de cultivo para detener la reacción de la tripsina. Luego se transfirió la suspensión a un tubo de 15 ml y éste se centrifugó a 1200 rpm por 2 min. Se aspiró el medio de la superficie, se adicionaron 10 ml de medio de cultivo fresco al precipitado de células y se las resuspendió en el mismo. Posteriormente, se realizó una dilución de 1/5 de la suspensión celular para el conteo de las células en una cámara de Neubauer. Según la concentración de células obtenida, se sembraron 0.6×10^6 células aproximadamente, en placas de cultivo de 6 pocillos.

Ensayos de transfección y de medición de la actividad de luciferasa

Mediante esta técnica se estudió la interacción entre NeuroD1 y CREB sobre regiones regulatorias de potenciales genes blanco, específicamente los genes *Aanat* e *Ins*. Se clonaron los plásmidos de expresión para CREB y NeuroD1, como así también para la proteína E47 y Pdx1. Además de los plásmidos de expresión de las proteínas mencionadas, se clonó un fragmento de 1500 pb de la secuencia promotora del gen *Aanat*, conteniendo sitios potenciales para la unión de NeuroD1, caja E, y para la unión de CREB, sitio CRE (Figura 11). El promotor del gen *Aanat* de rata se clonó en un plásmido junto con el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor mínimo de prolactina (Prl). Como control del ensayo, se trabajó en paralelo con un plásmido conteniendo el gen de la luciferasa bajo el promotor mínimo de Prl y cinco copias del potenciador E2/A3 (5FF) del promotor del gen *Ins* de rata, con 5 copias de la caja E (Figura 11). Una vez obtenidos todos los plásmidos, se procedió a la transfección de células 293T.

fucsia), para la potencial unión de CREB y NeuroD1, respectivamente, además de la caja TATA (marcada en amarillo), el sitio CCAAT invertido (marcado en gris) y la secuencia de inicio de la transcripción (marcada en rojo); y B- Cinco copias del potenciador E2/A3 (5FF) del promotor del gen *Ins* de rata que contiene cajas E (marcadas en fucsia); C- Plásmido usado para el clonado, pFoxLucPrl de 5079 pb, que contiene el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor mínimo de prolactina (Prl).

Tabla 7: Plásmidos utilizados para realizar el ensayo de la luciferasa.

<i>Plásmidos de expresión de proteínas</i>
pbat12 (vacío)
pbat12-NeuroD1
pbat12-E47
pbat12-CREB
pbat12-Pdx1
<i>Plásmidos reporteros</i>
pFoxLucPrl-Aanat
pFoxLucPrl-E2/A3 (5FF)
(del promotor del gen de <i>Ins</i>)

La transfección se realizó en formato de placa de 6 pocillos, con los reactivos provistos con el kit y de acuerdo con el protocolo descrito a continuación. El día antes de la transfección, se sembraron $0,6 \times 10^6$ células por pocillo en una placa de 6 pocillos (*Corning™*, Cat. 3599) en 2 ml de medio de cultivo con suero y antibióticos. Las células se incubaron (a 37°C y 5% de CO₂) hasta que la confluencia de los cultivos en los pocillos alcanzó aproximadamente el 90-95% para el día de la transfección. El día de la transfección se diluyó un total de 1,9 µg de ADN en 500 µl de medio OPTIMEM (*Opti-MEM™ Reduced Serum Medium, Thermo Fisher Scientific, Cat. 31985070*), y 8,75 µl de lipofectamina por reacción. El ensayo se realizó por duplicado para cada condición estudiada. Se mezcló por pipeteo y las muestras se incubaron a temperatura ambiente, durante 30 min. Se aspiró suavemente el medio de cultivo

de las placas y se lavaron las células una vez con 2 ml de PBS 1X (*Gibco*, Cat. 70011044). Se agregaron 1.5 ml de medio de cultivo nuevo y 500 µl de la mezcla de ADN a cada pocillo con los cultivos. Las células fueron preincubadas en condiciones de crecimiento normal durante 24 h para permitir la transfección, luego se cambió el medio y se cultivaron 24 h más. Previo a la cosecha de las células, 3 h antes, se trataron las células con 1 µM de NE o con vehículo (medio de cultivo).

Tabla 8: Combinaciones de plásmidos utilizados en los ensayos de la luciferasa.

	pFoxLucPri- <i>Aanat</i>	pFoxLucPri- E2/A3 (5FF)	pbat12 (vacío)	pbat12- NeuroD1	pbat12- E47	pCFCRE13- CREB	pbat12- Pdx1
Sin NE	X		X				
	X		X	X			
	X		X		X		
	X		X			X	
	X		X	X	X		
	X		X	X	X	X	
Con NE	X		X				
	X		X	X			
	X		X		X		
	X		X			X	
	X		X	X	X		
	X		X	X	X	X	
Sin NE		X	X				
		X	X				
		X	X	X			
		X	X		X		

		X	X				X
		X	X	X	X		
		X	X	X	X		X

El ensayo de la medición de la luciferasa se realizó con un kit comercial (*Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega*, cat. E1910) siguiendo las especificaciones del proveedor. Dos días después de la transfección, se eliminó el medio de crecimiento y las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X. Luego, las células se incubaron en 200 µl de buffer de lisis pasiva de células, provisto por el kit, durante 20 min a temperatura ambiente. Se transfirieron 20 µl del lisado anterior a placas de 96 pocillos (*96 Well Tissue-Culture Treated Plates, BD Falcon®*, Cat. #38022). Los lisados restantes fueron utilizados para medir la concentración proteica en cada muestra en el *NanoDrop™*. Los ensayos de luciferasa se midieron en un luminómetro (*Glomax Multidetecion System, Promega*, Cat. E7031). Brevemente, se inyectaron 50 µl del reactivo *Luciferase Assay Reagent II* provisto por el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Cat.E1910)* al lisado, y el equipo midió automáticamente la actividad de luciferasa durante 10 seg. Luego, se inyectaron 50 µl del reactivo *Stop and Glo®* del kit, para detener la actividad de luciferasa. Las mediciones obtenidas fueron relativizadas en función de la concentración de proteínas totales en cada muestra y luego normalizadas al plásmido vacío pbat12.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos fueron analizados con la prueba de AD (Anderson y Darling) para corroborar la normalidad de estos, un $p > 0.01$ indica que los datos proceden de una población normal. Una vez determinada la normalidad de los datos, se los analizó usando el programa *PRISM6*. Se realizaron las pruebas t de Student, ANOVA (Análisis de la varianza) de una o dos vías, según el caso, seguido de la prueba posterior de Tukey. Luego los resultados fueron representados gráficamente como la media \pm EEM (error estándar de la media). Un $p < 0,05$ fue considerado significativo.

A fin de analizar la significancia estadística de los datos las muestras se trabajaron de la siguiente manera en relación con la técnica empleada (Tabla 9).

Tabla 9: Muestras consideradas para el análisis estadístico según la técnica empleada.

Técnica	Muestra	N	Análisis estadístico
IHQ/morfometría	GP	3-4 GPs (113-233 núcleos de pinealocitos)	ANOVA, 1 vía
WB	GP	10 GPs (3 pooles por cada ZTs)	ANOVA, 1 vía
RT-PCR	GP	5 GPs (3 pooles por cada ZT)	t de Student
Real Time PCR	GP	5 GPs	ANOVA, 1 vía (el ensayo se realizó por duplicado, en 3 experimentos independientes)
	Ce	1	
	Células MIN 6	Células confluentes	
HIS	Cerebros	4 cortes (por cada ZT)	ANOVA, 2 vías
Ensayo de la luciferasa	Células 293T	Células confluentes	Para <i>Aanat</i> : ANOVA, 2 vías (el ensayo se realizó por duplicado)
			Para <i>Ins</i> : ANOVA, 1 vía (el ensayo se realizó por duplicado, en 3 experimentos independientes)

Resultados

Capítulo I

Para evaluar la hipótesis de que NeuroD1 y CREB son FT capaces de modular la expresión de genes específicos en la GP, en primer lugar, se procedió a indagar en el comportamiento diario de estas moléculas.

Estudio de la abundancia temporal del factor de transcripción NeuroD1 en la glándula pineal

Como se mencionó en la introducción, NeuroD1 ha sido previamente detectado y caracterizado en la GP de rata [71, 72, 76, 114, 120]. Por lo tanto, se decidió corroborar la presencia y abundancia de la proteína total en nuestro modelo experimental.

El FT se identificó en todos los tiempos elegidos (Figuras 12 y 13), y no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las muestras de día y noche. Este resultado refuerza los hallazgos publicados por nuestro grupo anteriormente [71, 72, 76], y contribuye con la hipótesis de que el ritmo diario de NeuroD1 no se percibe al estudiar la abundancia de la proteína total. En cambio, eventos postraduccionales (como las fosforilaciones en los residuos Ser²⁷⁴ y Ser³³⁶) afectarían la distribución subcelular (citoplasma:núcleo) a largo del ciclo L:O, y serían en parte modulados por la NE vía RAdS (α 1 y β) [71, 72].

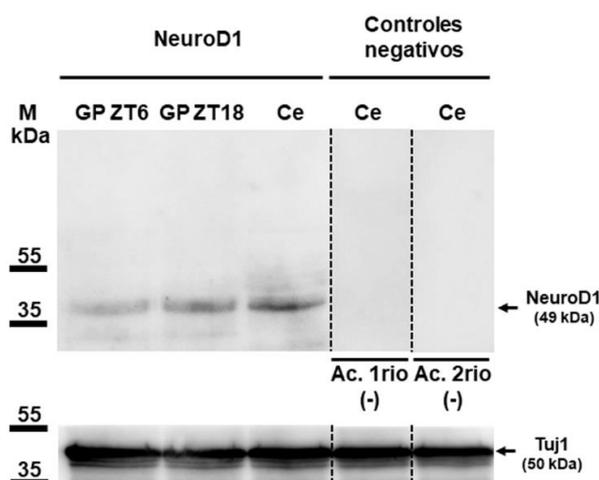


Figura 12. Identificación de la proteína NeuroD1 en extractos totales de cerebelo y glándula pineal mediante Western blot.

Extractos proteicos totales de glándulas pineales (10 GPs por ZT) recolectadas durante el mediodía (ZT6) y la medianoche (ZT18), y extracto proteico total de cerebelo (Ce) a ZT6 como control positivo, fueron analizados para NeuroD1. Se observan las bandas esperadas de

aproximadamente 49 kDa para NeuroD1. Las bandas específicas están ausentes en los controles negativos donde se omitieron los anticuerpos primario y secundario (4^{ta} y 5^{ta} calle, respectivamente). Se empleó la proteína Tuj1 como control de carga de aproximadamente 50 kDa. Se sembraron 40 µg de extracto proteico en cada calle. M: Marcador de peso molecular. ZT: *Zeitgeber time*.

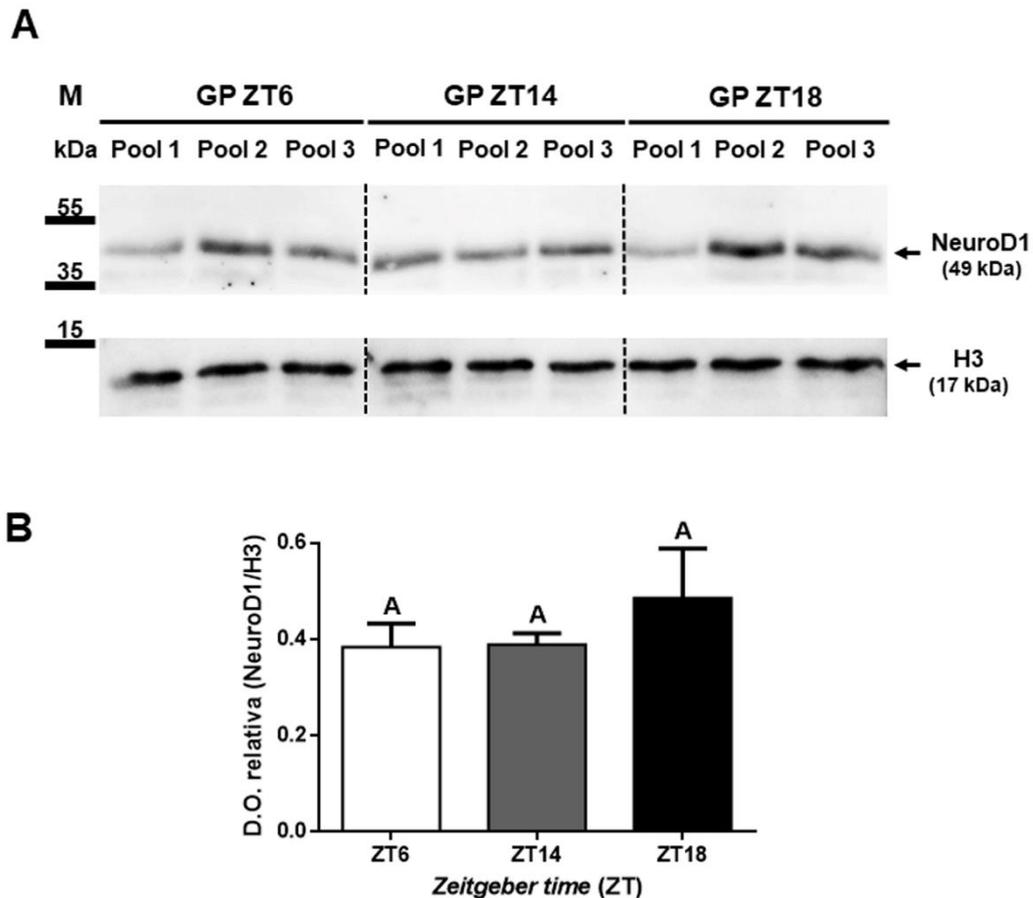


Figura 13. Análisis de la abundancia diaria de NeuroD1 en extractos totales de glándula pineal mediante Western blot.

A- Extractos proteicos totales de pools de glándulas pineales (10 GPs por pool) recolectadas durante el día (ZT6) y la noche (ZT14 y ZT18), fueron analizados para NeuroD1. Se observan las bandas esperadas de aproximadamente 49 kDa. Se empleó histona 3 (H3) como control de carga, de aproximadamente 17 kDa. Cada pool contuvo 10 GPs. Se sembraron 40 µg de extracto proteico en cada calle. M: Marcador de peso molecular. B- Gráfica representativa de la abundancia de NeuroD1 para los ZTs estudiados. Se analizó la densidad óptica (D.O.) de las bandas obtenidas en A y se determinó la abundancia relativa de NeuroD1 respecto a H3. Los valores representan las medias de las D.O. ± el EEM. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una vía, $p=0,51$, seguido por el método de Tukey.

Adicionalmente, con el fin de profundizar en el análisis de las oscilaciones diarias de NeuroD1, se realizó un estudio a nivel transcripcional mediante RT-PCR. De acuerdo con los resultados obtenidos, no se encontraron variaciones marcadas entre los diferentes ZTs (Figura 14); lo que coincide con estudios publicados anteriormente [89, 114] y se correlaciona con los ensayos de WB realizados para la proteína NeuroD1 (Figuras 12 y 13).

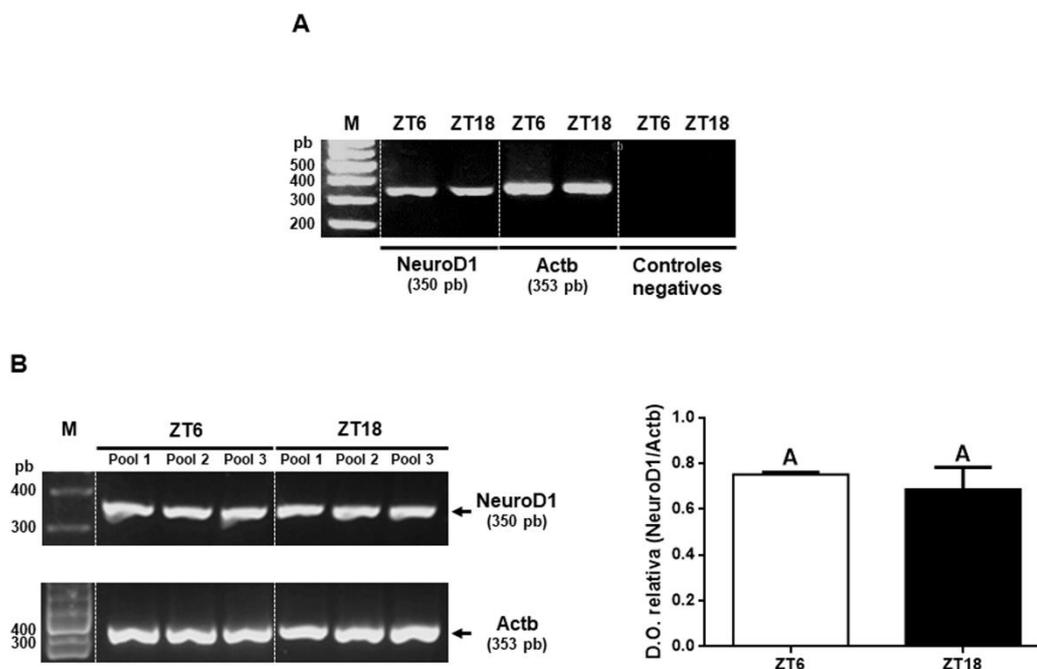


Figura 14. Análisis de la expresión diaria de Neurod1 en glándula pineal mediante RT-PCR. A- La expresión de NeuroD1 fue analizada en la glándula pineal (GP) de día (ZT6) y de noche (ZT18). Se visualizan los fragmentos esperados para NeuroD1, de 350 pb, en ambos ZTs estudiados. Como control de carga se empleó Actb, 352 pb. Se utilizó un marcador con fragmentos de longitudes conocidas (M). Los controles negativos se realizaron por omisión de los cebadores. B- Se analizó la densidad óptica (D.O.) de las bandas producto de RT-PCR para NeuroD1 de día (ZT6) y de noche (ZT18), y se determinó la abundancia relativa de NeuroD1 respecto a Actb. Cada pool contuvo 5 GPs. En la gráfica se representan los valores las medias de las D.O \pm el EEM. Los datos fueron analizados utilizando prueba t de Student, $p=0,53$.

Análisis de la abundancia de CREB en la glándula pineal a diferentes ZTs

Otro factor ampliamente estudiado en la GP es CREB, cuya actividad es inducida durante la noche, regulando en última instancia el ritmo circadiano de

la síntesis de melatonina [107, 108]. En consecuencia, se estudiaron los niveles diarios de la proteína CREB en extractos totales de GP mediante WB. Se pudo comprobar que la proteína está presente a lo largo del ciclo L:O analizados (ZT6, ZT14 y ZT18), sin variaciones estadísticamente significativas entre los ZTs analizados ($p=0,23$) (Figura 15).

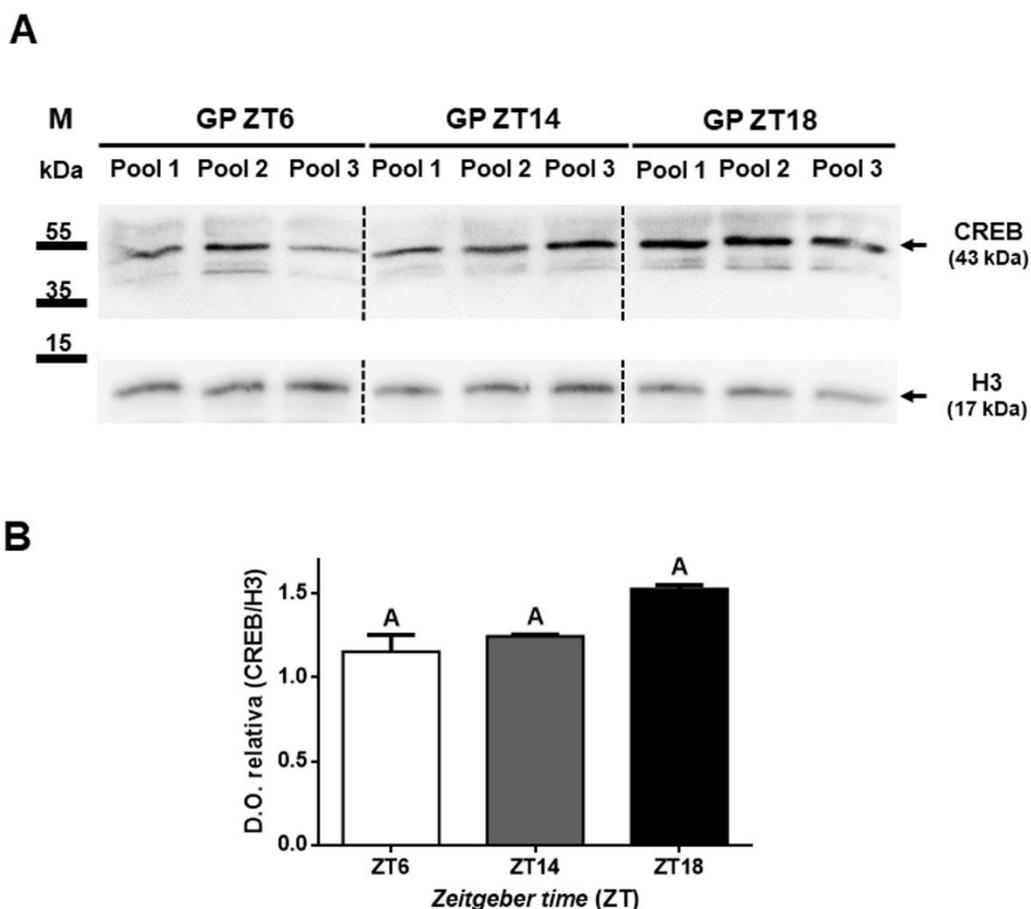


Figura 15. Análisis de la abundancia diaria de CREB en extractos totales de glándula pineal mediante Western blot.

A- Extractos proteicos totales de glándulas pineales (GPs) recolectadas durante el día (ZT6) y la noche (ZT14 y ZT18), fueron analizados para CREB, vía Western blot. Bandas específicas de aproximadamente 43 kDa son indicadas para CREB. Se muestra histona 3 (H3) como control de carga, de aproximadamente 17 kDa. Cada pool contuvo 10 GPs. Se sembraron 40 μ g de extracto proteico en cada calle. M: Marcador de peso molecular. B- Gráfica representativa de la abundancia de CREB para los ZTs analizados. Se analizó la densidad óptica (D.O.) de las bandas obtenidas en A y se determinó la abundancia relativa de CREB respecto a H3. Los valores representan las medias de las D.O. \pm el EEM. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una vía, $p=0,23$, seguido por el método de Tukey.

Estudio de la dinámica espaciotemporal del factor de transcripción CREB en la glándula pineal y el cerebelo

Seguido al análisis de la abundancia proteica en el cual no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el día y la noche para la proteína total, nos propusimos estudiar la dinámica espaciotemporal de la proteína mediante IHQ, seguida de microscopía confocal. Esta estrategia permitió identificar las poblaciones celulares que expresan CREB y estudiar en simultáneo la distribución diaria de este marcador a nivel subcelular. Los estudios realizados mostraron la marca de CREB en los núcleos de todas las poblaciones que conforman la glándula. A grandes rasgos y según la morfología que presentan los núcleos, se pudieron observar dos grandes poblaciones: pinealocitos, con núcleos grandes y heterogéneos, y con varios nucléolos bien definidos, y células intersticiales no pinealocíticas, que presentan una morfología nuclear más variada. En cuanto a la localización espacial de CREB, se detectó que presentaba un patrón de distribución diferencial en las distintas poblaciones que componen la GP. En los núcleos de las células intersticiales, la marca se mostró como un puntillado fino y de distribución homogénea, mientras que, en los núcleos de los pinealocitos, la marca se presentó como grumos más discretos y de tamaño y distribución heterogénea. Cabe destacar que se identificaron variaciones en el tamaño y en la distribución de los grumos del CREB nuclear, aún entre pinealocitos (Figura 16). La diversidad observada entre las poblaciones que componen la GP, incluida aquella entre los mismos pinealocitos, es un tema de interés en la actualidad ya que sugiere especificidad funcional y la posible existencia de circuitos internos que podrían sincronizar la fisiología de la glándula [72-74, 76].

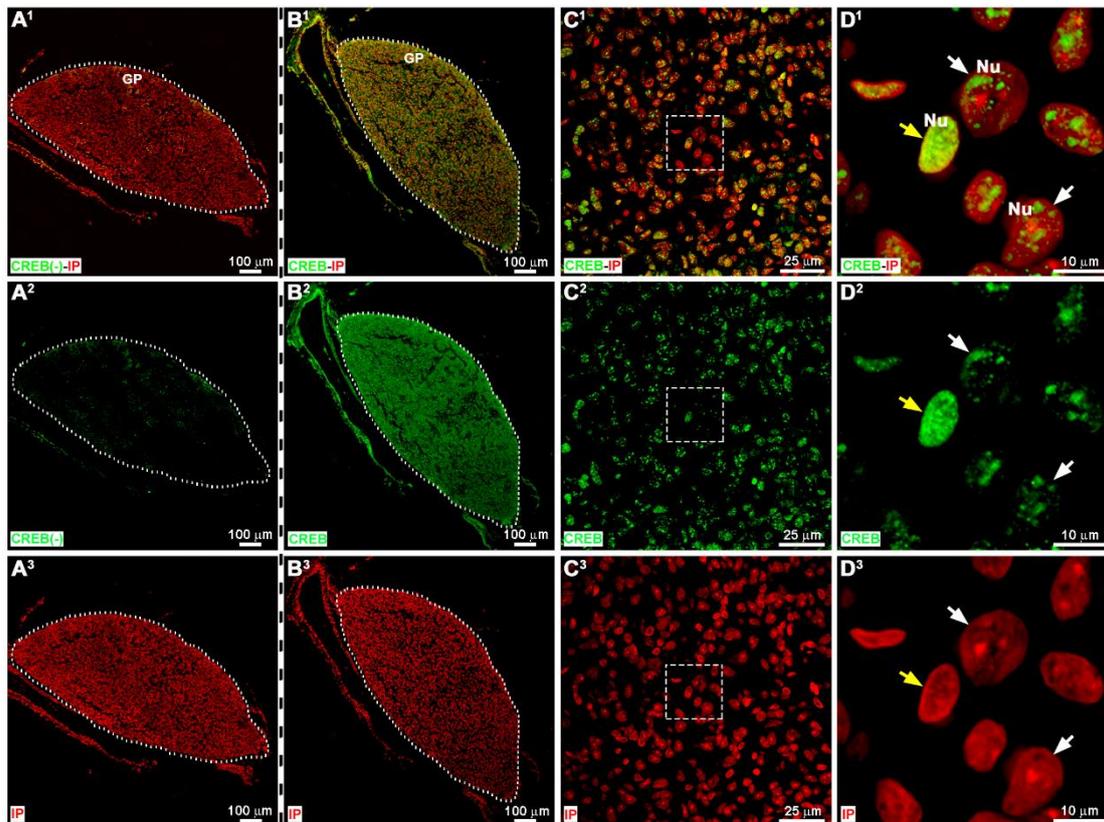


Figura 16. Análisis de la distribución de CREB en la glándula pineal a ZT14 mediante IHQ. CREB: verde. Núcleos visualizados con IP: rojo. A¹-A³- Sin anticuerpo anti-CREB (control negativo). B¹-B³, C¹-C³, D¹-D³- Con anticuerpo anti-CREB. A¹-A³, B¹-B³- Imágenes capturadas con objetivo 10X, escala 100 μm. Las líneas punteadas blancas delimitan el perímetro de las GPs. C¹-C³- Imagen capturada con objetivo 60X, escala 25 μm. El cuadrado punteado blanco delimita la zona que se muestra a mayor aumento en D¹-D³. D¹-D³- Imagen capturada con objetivo 60X, con aumento de 5X, escala 10 μm. Los núcleos de los pinealocitos CREB positivos son indicados con flechas blancas. El núcleo positivo de la célula intersticial es indicado con flecha amarilla. GP: Glándula pineal. Nu: Núcleo. IP: Ioduro de propidio.

Para corroborar la identidad de las células intersticiales con marca positiva para CREB se utilizaron diferentes marcadores de linaje celular. El marcador Iba1 (del inglés, *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) permitió identificar células microgliales en la GP. La marca de CREB en la microglía se presenta en el núcleo con una distribución homogénea y de puntillado fino (Figura 17). Además, la reconstrucción tridimensional de una célula microglial facilitó comprobar que CREB se encuentra recluido en el núcleo (Figura 18).

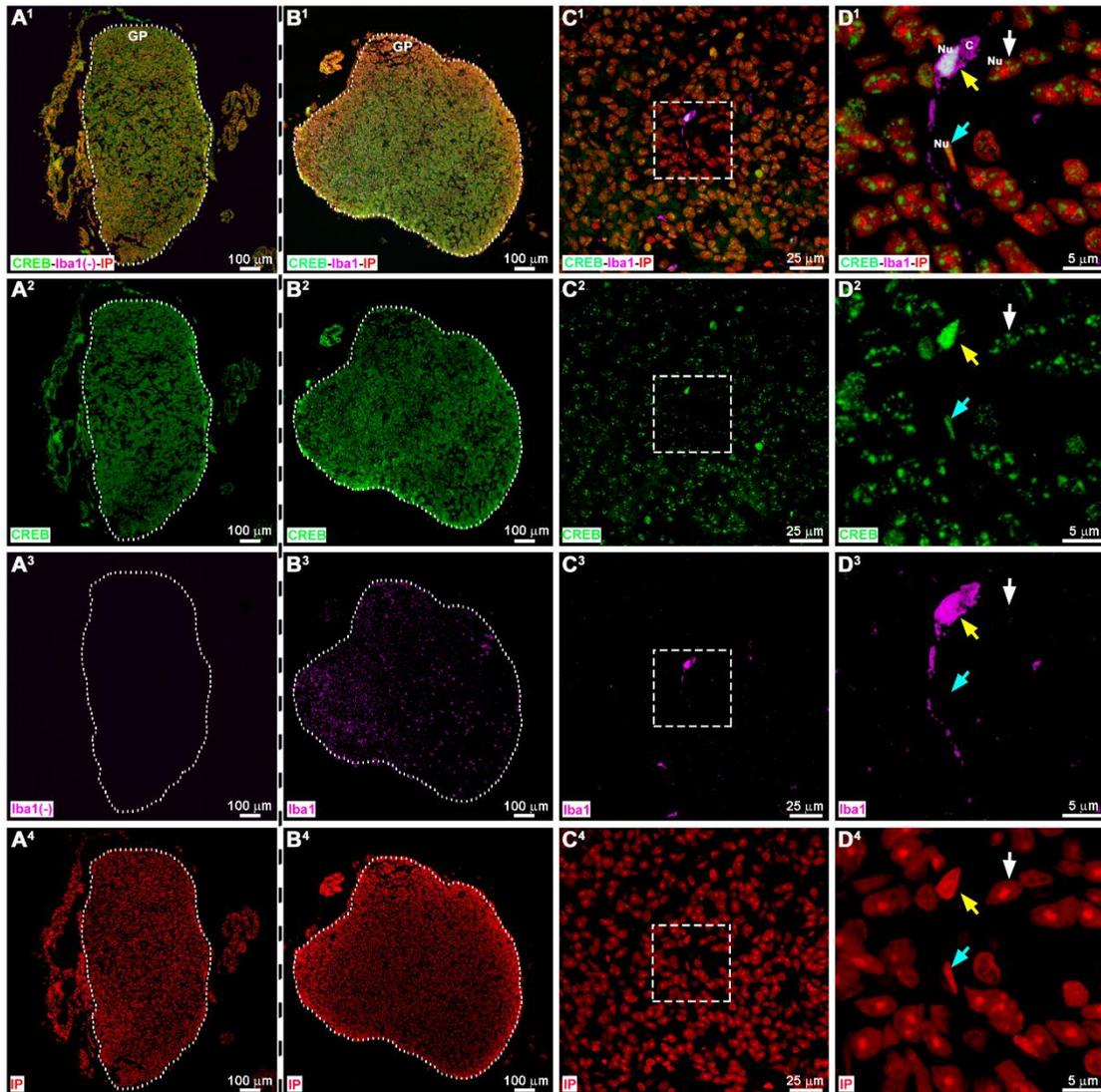


Figura 17. Análisis de la distribución de CREB e Iba1 en la glándula pineal a ZT14 mediante IHQ.

CREB: verde. Iba1: magenta. Núcleos visualizados con IP: rojo. A¹-A⁴- Sin anticuerpo anti-Iba1 (control negativo). B¹-B⁴, C¹-C⁴, D¹-D⁴- Con anticuerpo anti-CREB y anti-Iba1. A¹-A⁴, B¹-B⁴- Imágenes capturadas con objetivo 10X, escala 100 μm. Las líneas punteadas blancas delimitan el perímetro de las GPs. C¹-C⁴- Imagen capturada con objetivo 60X, escala 25 μm. El cuadrado punteado blanco delimita la zona que se muestra a mayor aumento en D. D¹-D⁴- Imagen capturada con objetivo 60X, con aumento de 2X, escala 5 μm. El núcleo del pinealocito positivo para CREB es indicado con flecha blanca. El núcleo positivo para CREB de la célula microglial inmunorreactiva para Iba1, es indicado en flecha amarilla. El núcleo de la célula intersticial positivo para CREB es indicado con flecha cian. GP: Glándula Pineal. Nu: Núcleo. C: Citoplasma. IP: Ioduro de propidio.

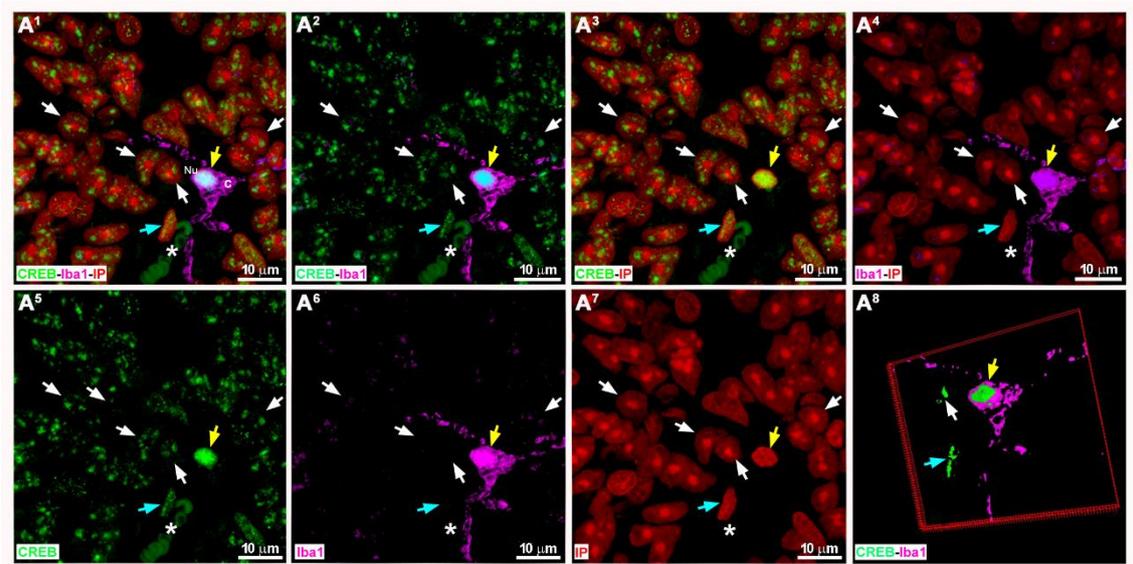


Figura 18. Análisis de la distribución de CREB e Iba1 en la glándula pineal a ZT14 mediante IHQ y reconstrucción tridimensional de la microglía.

CREB: verde. Iba1: magenta. Núcleos visualizados con IP: rojo. A¹-A⁸- Con anticuerpo anti-CREB y anti-Iba1. A¹-A⁷- En cada imagen se muestran diferentes combinaciones de los canales para lograr una mejor visualización de la distribución de CREB en los núcleos de las células. Las imágenes fueron capturadas con objetivo 60X, con aumento de 2x, escala 10 μm. Los núcleos de pinealocitos son indicados con flecha blanca. El núcleo positivo de la célula microglial es indicado con flecha amarilla. Una célula intersticial, perteneciente posiblemente a una célula endotelial por su cercanía con el vaso sanguíneo, es indicada con flecha cyan. Glóbulos rojos de un vaso sanguíneo son denotados mediante un asterisco blanco. En A⁸- Se muestra la reconstrucción tridimensional de una célula microglial que contiene la marca de CREB dentro de su núcleo e Iba1 citoplasmático, y otros núcleos de células no microgliales positivas para CREB (pinealocito y célula intersticial). Nu: Núcleo. C: Citoplasma. IP: Ioduro de propidio.

Otro marcador utilizado fue GFAP (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), que es característico del linaje astrocítico. Se observó que los astrocitos están presentes mayoritariamente en el polo proximal, cerca del tallo de la GP. Además, estas células GFAP positivas presentaron marca de CREB, con una distribución de un puntillado fino y homogéneo (Figura 19).

El uso de estos dos marcadores específicos de linaje permitió dar identidad celular a la marca de CREB en al menos dos poblaciones diferenciales no pinealocíticas. Sin embargo, se visualizaron otros tipos celulares positivos para CREB de puntillado fino y homogéneo que no son células microgliales, ni astrocitos. Entre ellas, existe una población de morfología nuclear alargada y de tamaño pequeño que se encuentra en íntimo contacto con los vasos sanguíneos,

lo que sugiere podrían ser células endoteliales (Figura 19, indicada en flecha cian).

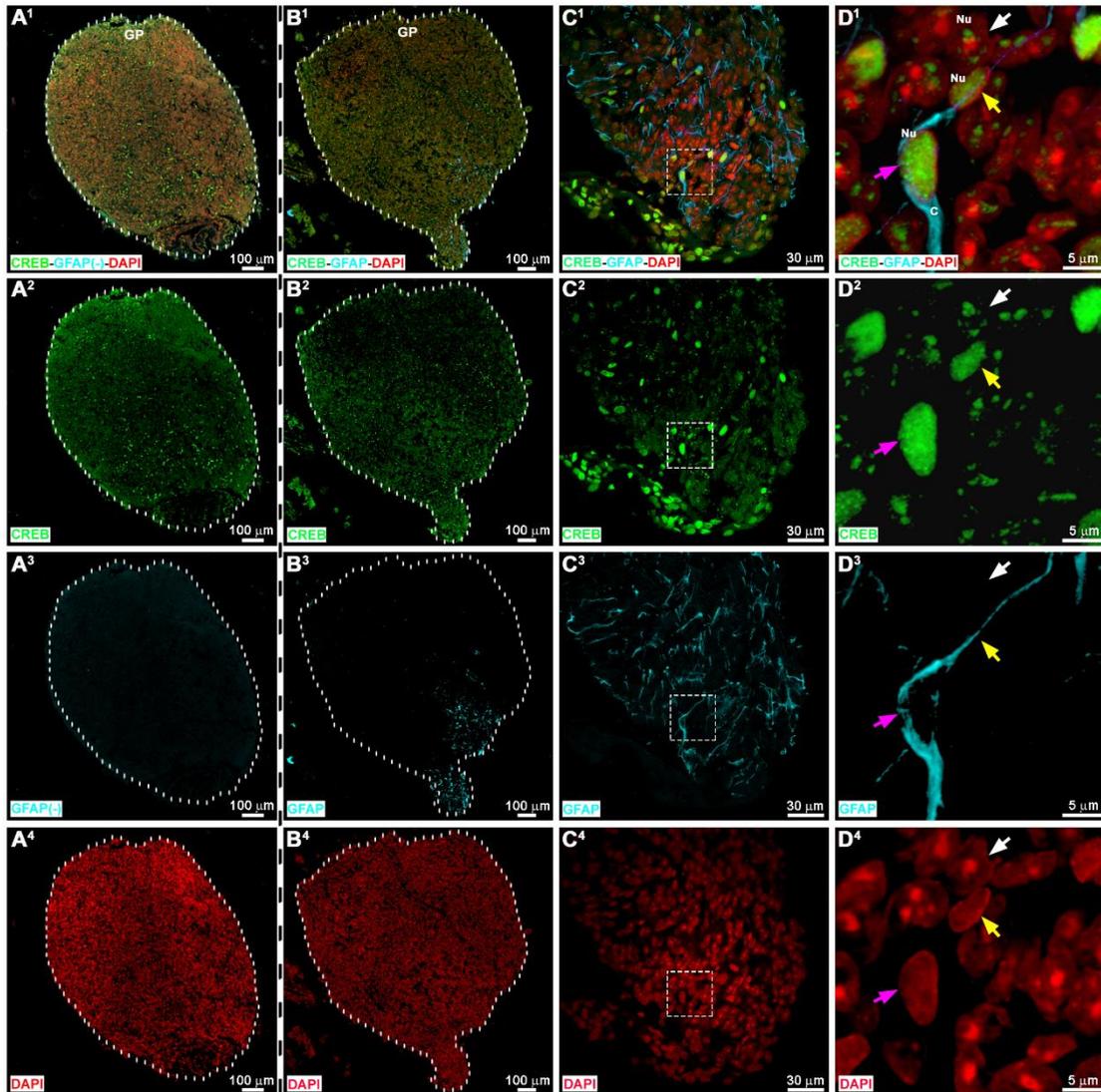


Figura 19. Análisis de la distribución de CREB y GFAP en la glándula pineal a ZT14 mediante IHQ.

CREB: verde. GFAP: cian. Núcleos visualizados con DAPI: rojo. A¹-A⁴- Sin anticuerpo anti-GFAP (control negativo). B¹-B⁴, C¹-C⁴, D¹-D⁴- Con anticuerpo anti-CREB y anti-GFAP. A¹-A⁴, B¹-B⁴- Imágenes capturadas con objetivo 10X, escala 100 µm. Las líneas punteadas blancas delimitan el perímetro de las GPs. C¹-C⁴- Imagen capturada con objetivo 60X, escala 30 µm. Se puede observar que la marcación para GFAP se encuentra mayoritariamente recluida al polo proximal de la GP. El cuadrado punteado blanco delimita la zona que se muestra a mayor aumento en D. D¹-D⁴- Imagen capturada con objetivo 60X, con aumento de 6.1X, escala 5 µm. El pinealocito positivo para CREB es indicado con flecha blanca. El núcleo positivo para CREB del astrocyto inmunoreactivo para GFAP es indicado en flecha magenta. El núcleo de la célula intersticial positivo para CREB es indicado con flecha amarilla. GP: Glándula pineal. Nu: Núcleo. C: Citoplasma.

Para complementar el estudio e investigar distribución diferencial en otras zonas del SNC, se analizó la expresión de CREB en el Ce. En este órgano se encontró que CREB se expresa abundantemente en los núcleos de las células de la capa de Purkinje y en aquellas residentes en la capa granular. La marca fue aquí también heterogénea entre los tipos celulares. En las células de Purkinje, CREB se mostró en forma de grumos de tamaño y distribución variable, mientras que en las células granulares lo hizo como un puntillado homogéneo y fino (Figura 20).

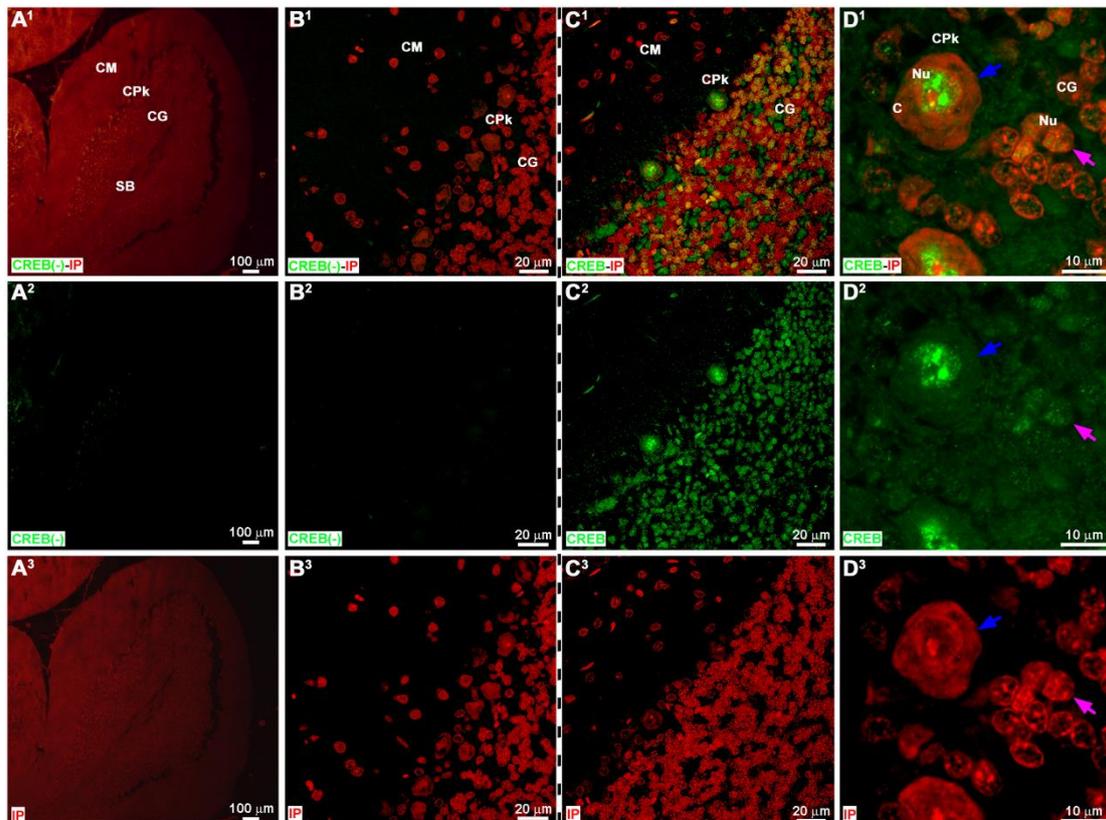


Figura 20. Análisis de la distribución de CREB en el cerebelo a ZT6 mediante IHQ.

CREB: verde. Núcleos visualizados con IP: rojo. A¹-A³, B¹-B³- Sin anticuerpo anti-CREB (controles negativos). C¹-C³, D¹-D³- Con anticuerpo anti-CREB. (A¹-A³)- Imagen capturada con objetivo 10X, escala 100 μm. B¹-B³, C¹-C³- Imágenes capturadas con objetivo 60X, escala 20 μm. D¹-D³- Imagen capturada con objetivo 60X, con aumento de 3.8X, escala 10 μm. El núcleo de la célula de Purkinje positivo para CREB es indicado con flecha azul. El núcleo positivo de la célula de la capa granular positivo para CREB es indicado en flecha magenta. CM: Capa Molecular. CPk: Capa de Purkinje. CG: Capa granular. SB: Sustancia blanca. Nu: Núcleo. C: Citoplasma. IP: Ioduro de propidio.

Teniendo en cuenta que la dispersión espacial de CREB en el núcleo podría estar relacionada con su función y actividad transcripcional [105, 191], ya que la proteína es fosforilada y activada durante la noche en la GP [108, 111], se decidió investigar con detalle la dinámica espaciotemporal del FT en los núcleos de los pinealocitos en diferentes momentos del día (ZT6 y ZT10) y la noche (ZT14 y ZT18). Se pudo demostrar que todos los pinealocitos presentaban marca nuclear para CREB, y que en los diferentes ZTs analizados existiría una aparente variación en cuanto a la distribución del FT en los núcleos observados (Figura 21). Un primer análisis sugirió que esta dispersión de CREB podía ser mayor durante la noche temprana (ZT14) y la medianoche (ZT18), respecto a lo observado en el día (ZT6 y ZT10) (Figura 21).

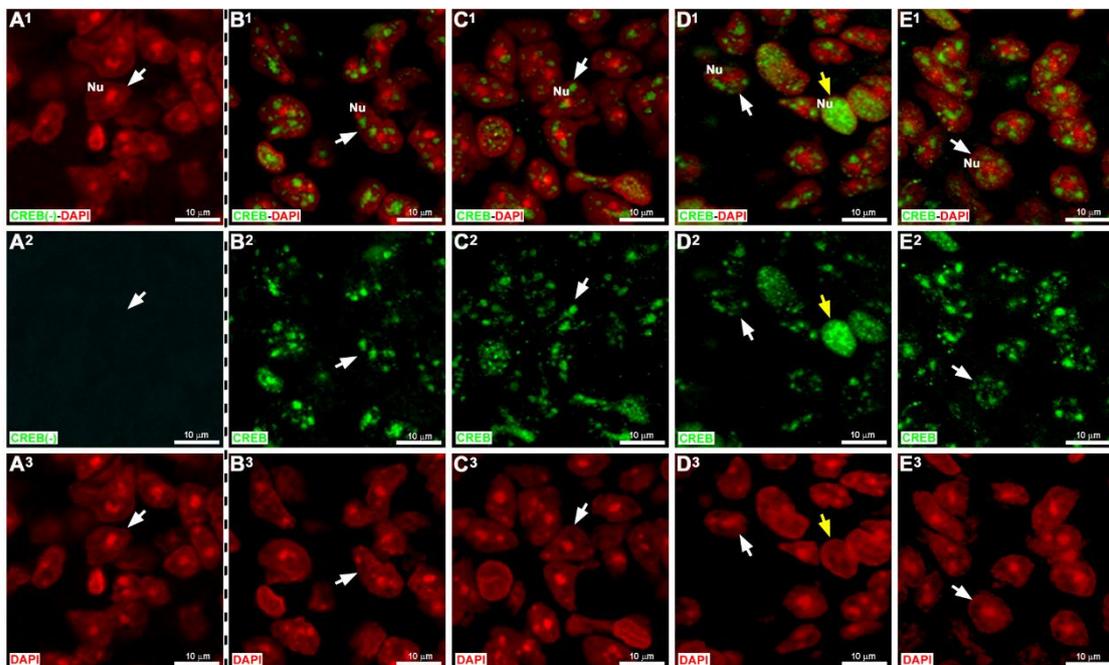


Figura 21. Análisis de la distribución de CREB en glándula pineal a diferentes ZTs mediante IHQ.

CREB: verde. Núcleos visualizados con DAPI: Rojo. A¹-A³, B¹-B³- ZT6. C¹-C³- ZT10. D¹-D³- ZT14, E¹-E³- ZT18. A¹-A³- Sin anticuerpo anti-CREB (control negativo), B¹-B³, C¹-C³, D¹-D³, E¹-E³- Con anticuerpo anti-CREB. Las imágenes fueron tomadas con objetivo 60X, aumento 2X, escala 10 µm. Se observan núcleos de pinealocitos positivos para CREB indicados con flechas blancas. El núcleo de una célula intersticial positivo para CREB es indicado con flecha amarilla. Nu: Núcleo. C: Citoplasma.

A fin de estudiar con detalle el fenómeno, se aislaron núcleos individuales

de pinealocitos a partir de las imágenes obtenidas. Se empleó el programa *ImageJ 1.52d*® para analizar y cuantificar la marca de CREB. Se encontró que la mayoría de los pinealocitos mostraba mayor dispersión espacial de CREB en los ZTs nocturnos con respecto a los diurnos. Esto puede ser observado en las Figuras 22, 24, 26 y 28, en las cuales se muestran núcleos representativos con una ocupancia de CREB a ZT14 y ZT18 mayor que a ZT6 y ZT10. En las Figuras 23, 25, 27 y 29 se pueden observar veinte núcleos representativos de cada ZT, tomados de diferentes GPs. En las figuras mencionadas anteriormente se evidencia, una vez más, la heterogeneidad dentro de la población pinealocítica.

El seguimiento de la dinámica espaciotemporal de CREB fue realizado únicamente en pinealocitos, ignorando otras poblaciones como células astrocíticas y microgliales. El motivo de esta exclusión se debe a que el patrón de distribución del FT en los linajes de astrocítico y microglial es homogéneo sobre todo el núcleo celular (Figuras 17-19), resultado dificultoso contabilizar grumos discretos con la metodología empleada.

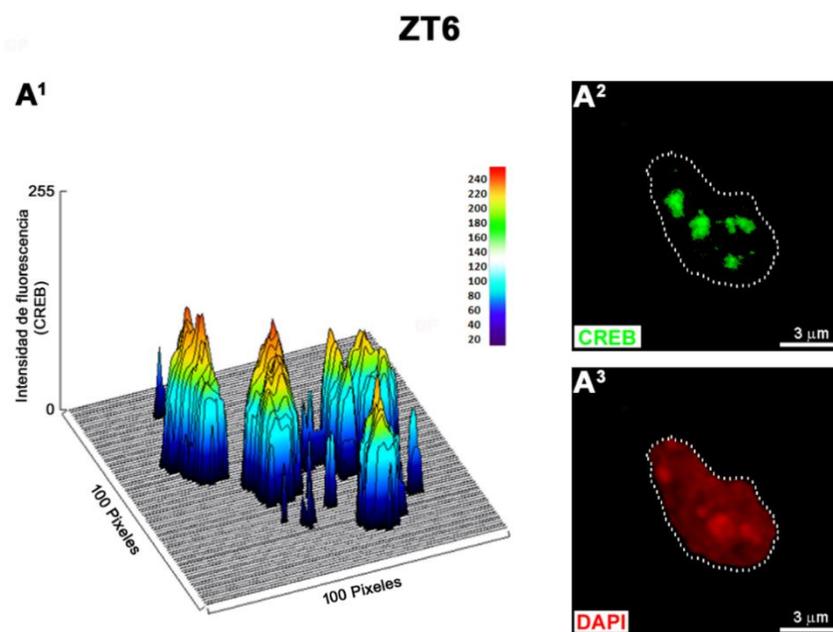


Figura 22. Representación de la distribución espacial de CREB en el núcleo de un pinealocito a ZT6.

A1- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área (en pixeles) que ocupa dicho factor de transcripción para un núcleo individual de pinealocito a ZT6. El rango de intensidades varía de 0 a 255. A2-A3- La línea punteada blanca delimita el núcleo del pinealocito evidenciado mediante DAPI (rojo), mientras que la marca de CREB se denota en

verde. El núcleo representativo aquí mostrado fue aislado de una imagen de IHQ, seguida de microscopía confocal, tomada con objetivo 60X, aumento 2X. Escala 3 μ m. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d*® (NIH, USA) y la herramienta *Surface plot* para realizar estas reconstrucciones.

ZT6

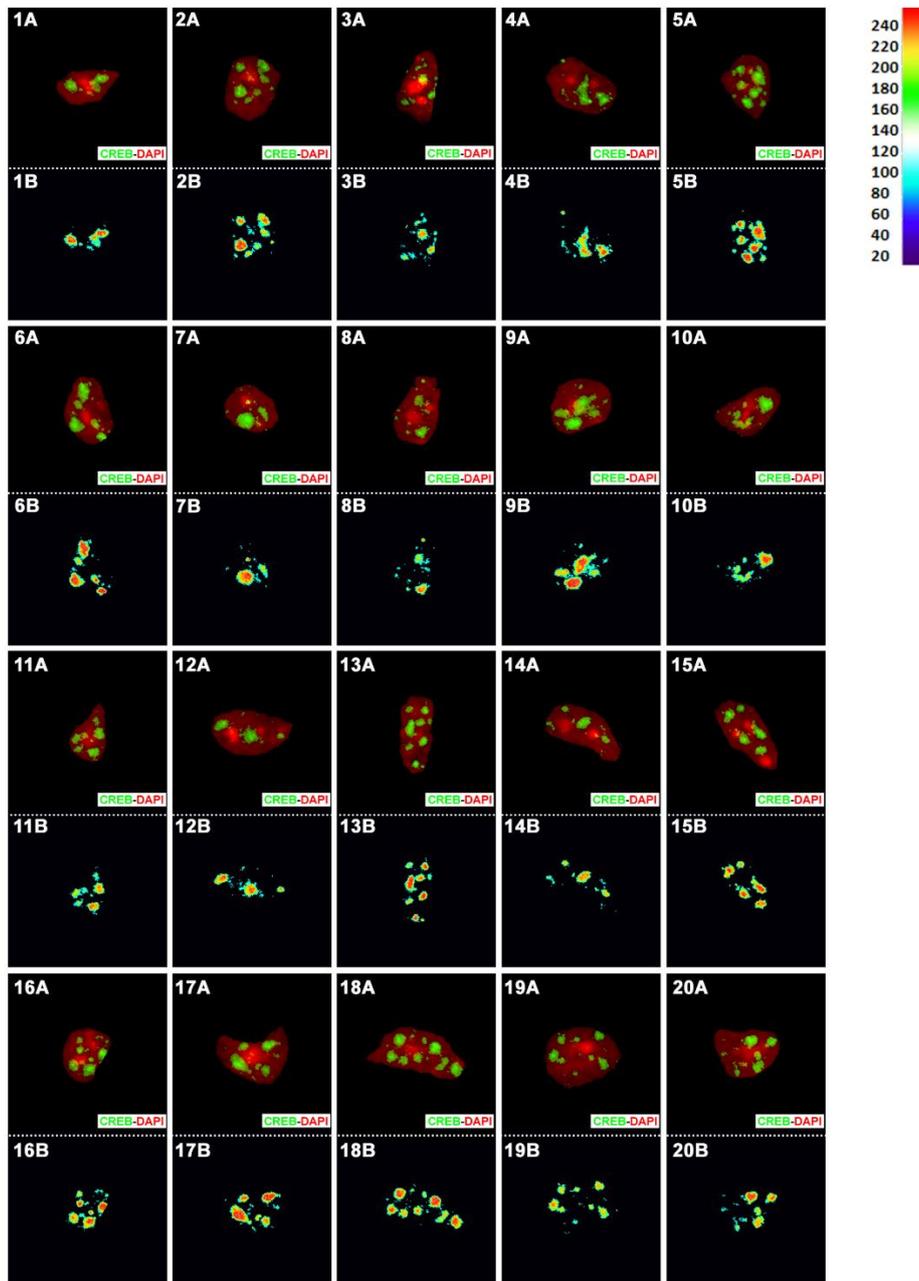


Figura 23. Análisis de la distribución espacial de CREB en núcleos de pinealocitos individuales a ZT6.

Núcleos de pinealocitos aislados de imágenes obtenidas por IHQ, seguida por microscopía confocal. A¹-A²⁰. Los núcleos son identificados mediante DAPI (rojo) mientras que la marca de

CREB se denota en verde. B¹-B²⁰- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área de cada núcleo de pinealocito. El rango de intensidad varia de 0 a 255. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d* ® (NIH, USA) para realizar estas reconstrucciones. Núcleos obtenidos de 4 GPs diferentes.

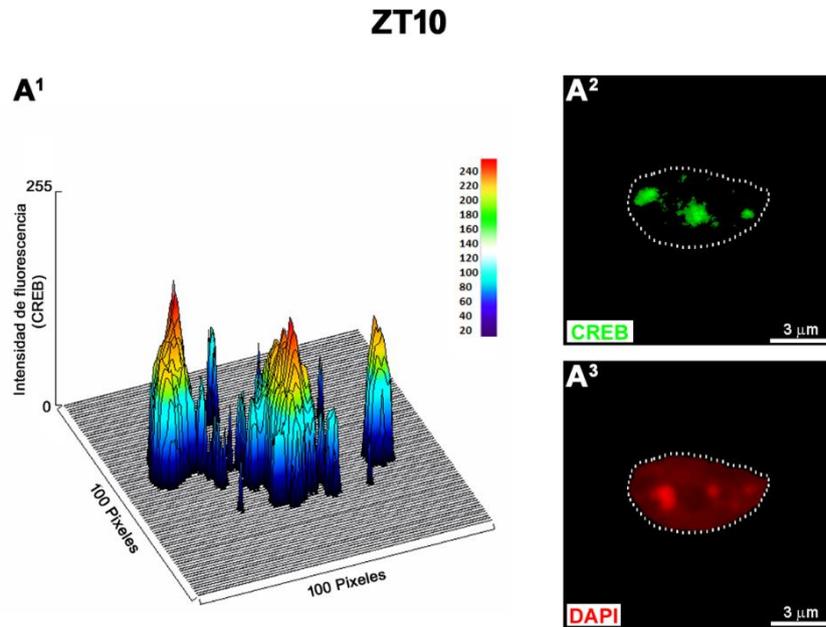


Figura 24. Representación de la distribución espacial de CREB en el núcleo de un pinealocito a ZT10.

A¹- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área (en píxeles) que ocupa dicho factor de transcripción para un núcleo individual de pinealocito a ZT10. El rango de intensidades varia de 0 a 255. A²-A³- La línea punteada blanca delimita el núcleo del pinealocito evidenciado mediante DAPI (rojo) mientras que la marca de CREB se denota en verde. El núcleo representativo aquí mostrado fue aislado de una imagen de IHQ, seguida de microscopía confocal, tomada con objetivo 60X, aumento 2X. Escala 3 µm. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d* ® (NIH, USA) y la herramienta *Surface plot* para realizar estas reconstrucciones.

ZT10

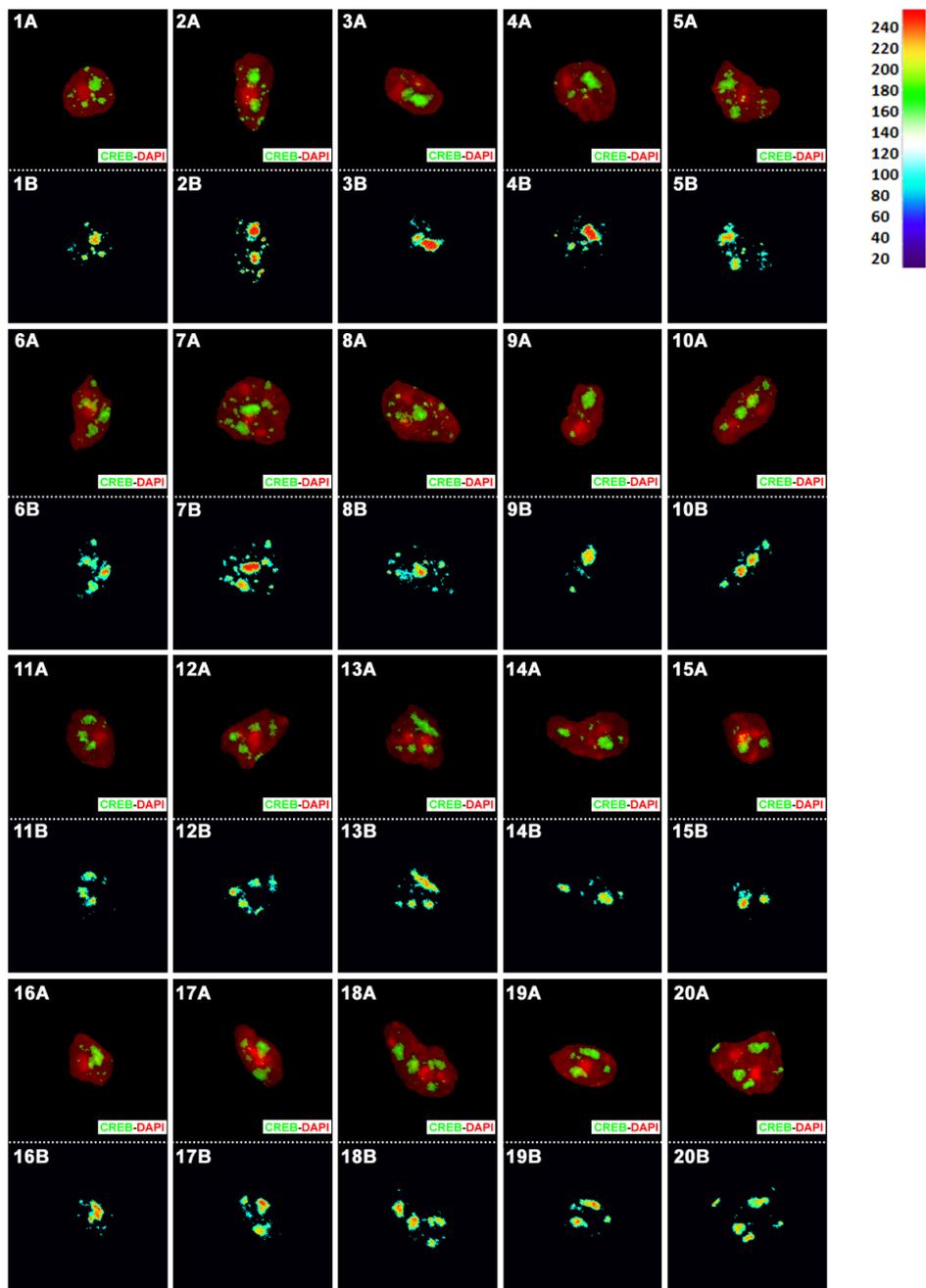


Figura 25. Análisis de la distribución espacial de CREB en núcleos de pinealocitos individuales a ZT10.

Núcleos de pinealocitos aislados de imágenes obtenidas por IHQ, seguida por microscopía confocal. A¹-A²⁰- Los núcleos son identificados mediante DAPI (rojo) mientras que la marca de CREB se denota en verde. B¹-B²⁰- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área de cada núcleo de pinealocito. El rango de intensidades varía de

0 a 255. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d*® (NIH, USA) para realizar estas reconstrucciones. Núcleos obtenidos de 4 GPs diferentes.

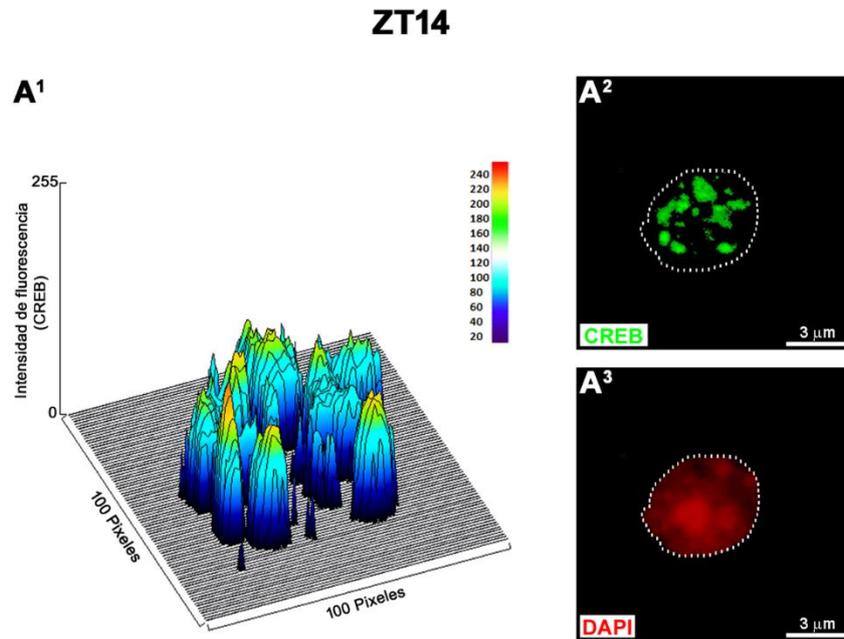


Figura 26. Representación de la distribución espacial de CREB en el núcleo de un pinealocito a ZT14.

A¹- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área (en pixeles) que ocupa dicho factor de transcripción para un núcleo individual de pinealocito a ZT14. El rango de intensidades varía de 0 a 255. A²-A³- La línea punteada blanca delimita el núcleo del pinealocito evidenciado mediante DAPI (rojo) mientras que la marca de CREB se denota en verde. El núcleo representativo aquí mostrado fue aislado de una imagen de IHQ, seguida de microscopía confocal, tomada con objetivo 60X, aumento 2X. Escala 3 μm. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d*® (NIH, USA) y la herramienta *Surface plot* para realizar estas reconstrucciones.

ZT14

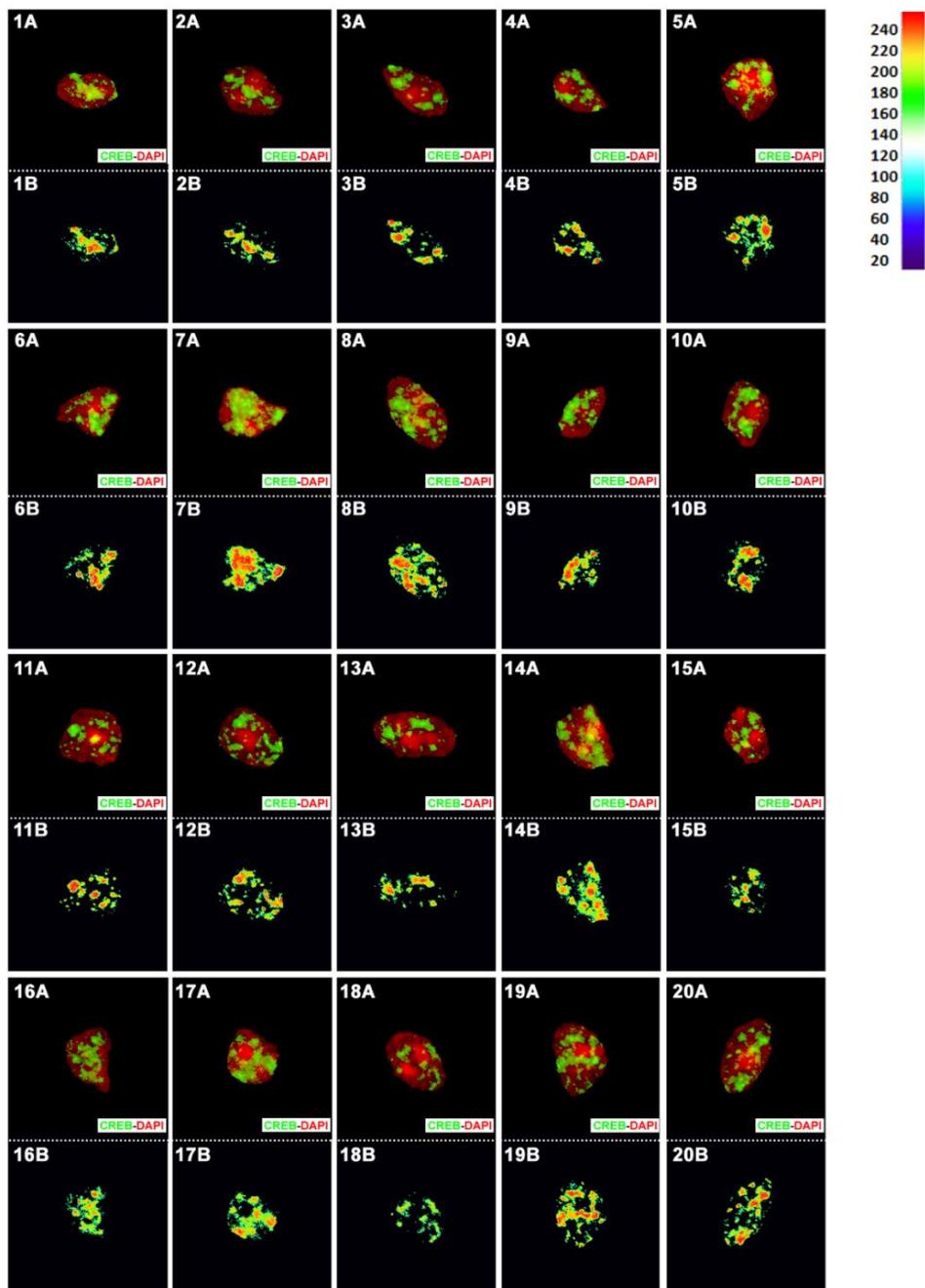


Figura 27. Análisis de la distribución espacial de CREB en núcleos de pinealocitos individuales a ZT14.

Núcleos de pinealocitos aislados de imágenes obtenidas por IHQ, seguida por microscopía confocal. A¹-A²⁰- Los núcleos son identificados mediante DAPI (rojo) mientras que la marca de CREB se denota en verde. B¹-B²⁰- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área de cada núcleo de pinealocito. El rango de intensidad varía de 0

a 255. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d*® (NIH, USA) para realizar estas reconstrucciones. Núcleos obtenidos de 3 GPs diferentes.

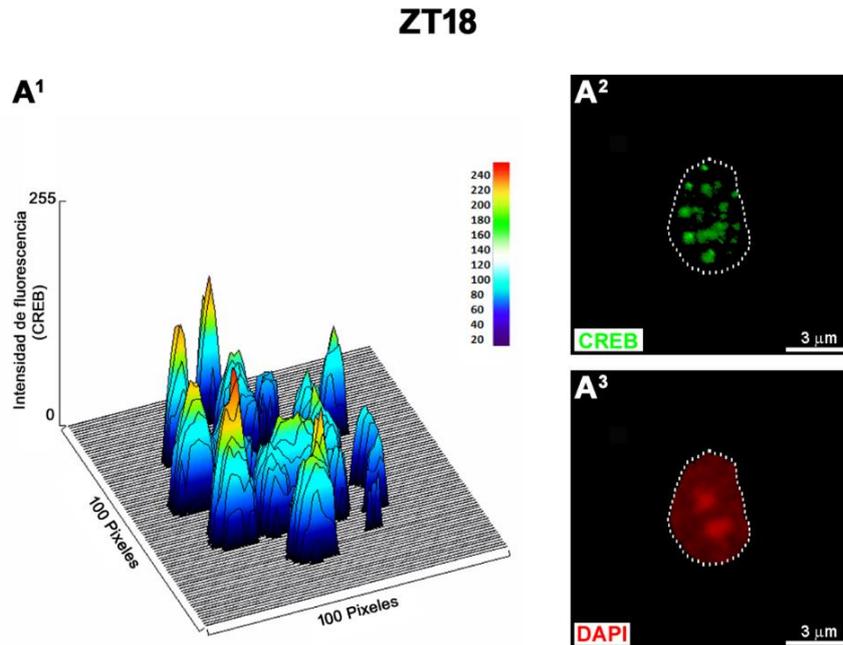


Figura 28. Representación de la distribución espacial de CREB en el núcleo de un pinealocito a ZT18.

A¹- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área (en píxeles) que ocupa dicho factor de transcripción para un núcleo individual de pinealocito a ZT18. El rango de intensidades varía de 0 a 255. A²-A³- La línea punteada blanca delimita el núcleo del pinealocito evidenciado mediante DAPI (rojo) mientras que la marca de CREB se denota en verde. El núcleo representativo aquí mostrado fue aislado de una imagen de IHQ, seguida de microscopía confocal, tomada con objetivo 60X, aumento 2X. Escala 3 µm. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d*® (NIH, USA) y la herramienta *Surface plot* para realizar estas reconstrucciones.

ZT18

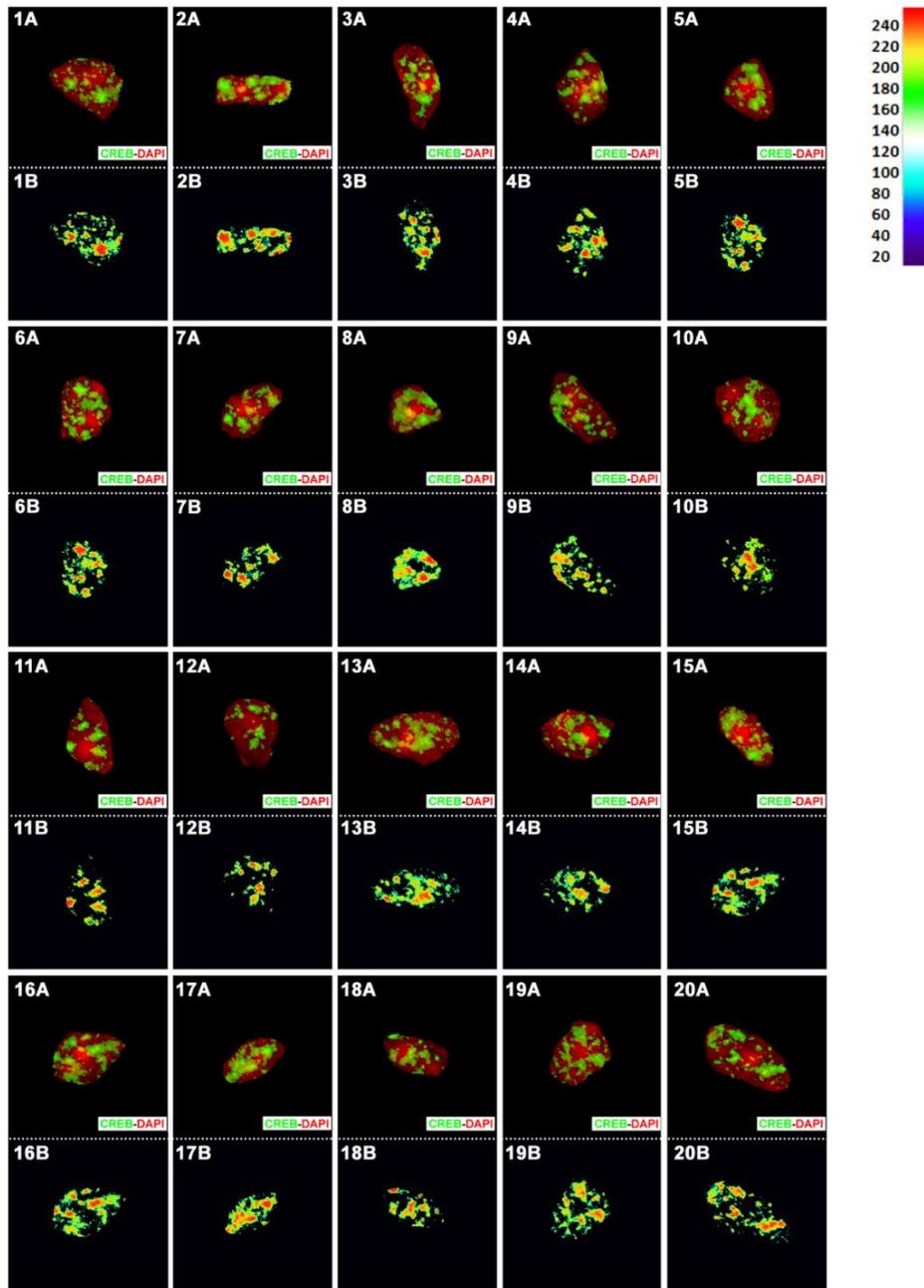


Figura 29. Análisis de la distribución espacial de CREB en núcleos de pinealocitos individuales a ZT18.

Núcleos de pinealocitos aislados de imágenes obtenidas por IHQ, seguida por microscopía confocal. A¹-A²⁰- Los núcleos son identificados mediante DAPI (rojo) mientras que la marca de CREB se denota en verde. B¹-B²⁰- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área de cada núcleo de pinealocito. El rango de intensidades varía de 0 a 255. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d*® (NIH, USA) para realizar estas reconstrucciones. Núcleos obtenidos de 3 GPs diferentes.

Debido a las observaciones que sugirieron la existencia de una dinámica espaciotemporal diaria de CREB en los pinealocitos, se decidió cuantificar esta dispersión espacial en los distintos ZTs y comparar si existen diferencias entre el día y la noche. Para ello, se cuantificó el número de pixeles totales de CREB en núcleos individuales de pinealocitos a ZT6, ZT10, ZT14 y ZT18. Se encontraron núcleos con bajo, medio y alto contenido de pixeles. Es interesante destacar que la dispersión entre los datos obtenidos en cada ZT fue importante, resultado de la variabilidad en la dispersión espacial de CREB dentro del linaje pinealocítico (Figura 30).

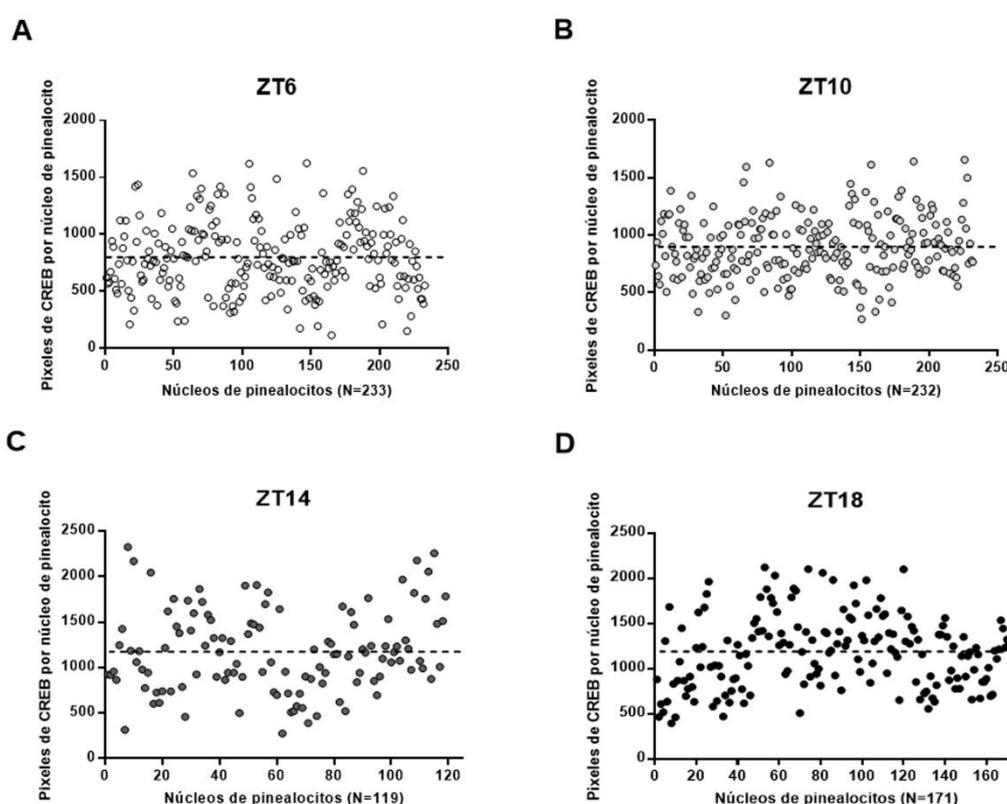


Figura 30. Representación gráfica del número de pixeles totales de CREB por núcleo de pinealocito en los diferentes ZTs.

Cada círculo representa los pixeles totales encontrados en cada núcleo de pinealocito analizado. A- El total de núcleos analizados a ZT6 fue 233. B- El total de núcleos analizados a ZT10 fue 232. C-El total de núcleos analizados a ZT14 fue 119. D- El total de núcleos analizados a ZT18 fue 171. Se puede observar la gran heterogeneidad respecto a la cantidad de pixeles totales de CREB por núcleo entre los pinealocitos en cada ZT. La línea punteada negra, representa la media de pixeles de CREB en cada ZT. Los núcleos fueron tomados de imágenes obtenidas por IHQ, seguida de microscopía confocal. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d* © (NIH, USA) para aislar

núcleos individuales y cuantificar los pixeles totales de CREB en cada uno de ellos. Se utilizaron 3-4 GPs diferentes por ZT.

Luego de cuantificar la cantidad de pixeles totales de CREB por núcleo en cada ZT, los datos fueron promediados por ZT y analizados a fin de determinar si pertenecían a una población normal (ver Materiales y Métodos, páginas 44-46, 63 y 62). A continuación, se realizaron comparaciones estadísticas entre los ZTs por ANOVA de una vía ($p=0,0001$), y se corroboró que los ZT14 y ZT18 presentaban mayor cantidad de pixeles promedio respecto a los ZT6 y ZT10 (Figura 31).

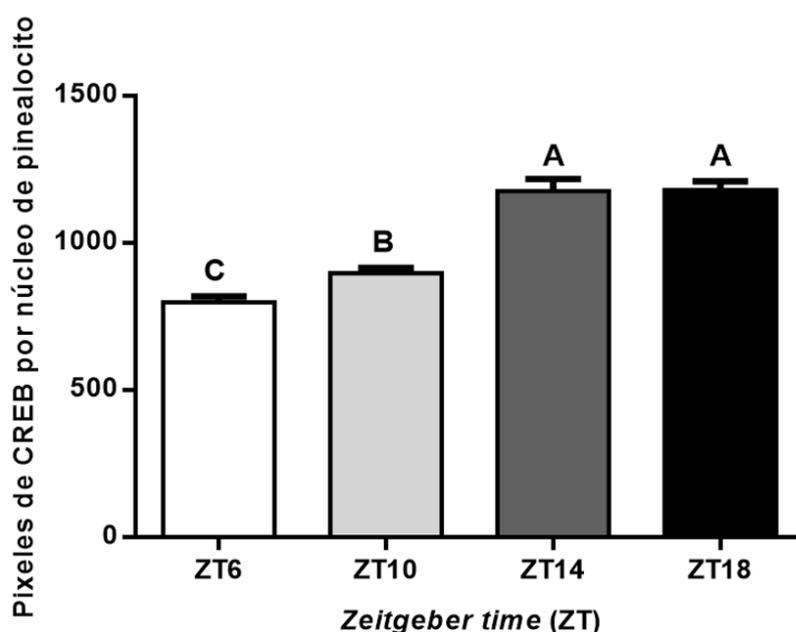


Figura 31. Cuantificación y análisis estadístico de los pixeles promedio de CREB por núcleo de pinealocito a diferentes ZTs. Se compararon las medias de pixeles de CREB \pm el EEM para cada ZT y se determinó que existía diferencia estadística significativa entre los grupos. Se analizaron entre 119-233 núcleos de pinealocitos de 3-4 GPs diferentes por ZT. Se realizó análisis de ANOVA de una vía, $p=0,0001$. Las letras diferentes (A, B y C) representan medias significativamente diferentes entre sí por el método de Tukey.

El estudio de la dinámica espaciotemporal de CREB mediante IHQ complementó los datos mostrados vía WB, a partir de los cuales se corroboró que la abundancia de la proteína CREB durante el día (ZT6) y la noche (ZT14 y ZT18) no mostró diferencias estadísticas significativas ($p=0,23$) (Figura 15). Sin embargo, la técnica de IHQ seguida de microscopia confocal y análisis

morfométrico, permitió un abordaje más sensible para diferencias en la distribución espaciotemporal de CREB en los pinealocitos productores de melatonina. Los datos encontrados permitirían inferir que existe una relación entre la distribución espacial del FT y su actividad transcripcional.

Análisis de la disrupción simpática sobre la dinámica espaciotemporal de CREB en los pinealocitos, vía GCSx

Con el fin de determinar si la privación del pulso nocturno de NE modifica la abundancia y dinámica espaciotemporal de CREB en la GP, se estudió la proteína en animales ganglionectomizados (GCSx) y falsamente operados (FO), a ZT14. Se evidenció dispersión espacial del FT en los núcleos de pinealocitos en ambas condiciones (Figuras 32-35). En la condición GCSx, se observó que CREB presentaba mayor dispersión espacial que en animales FO.

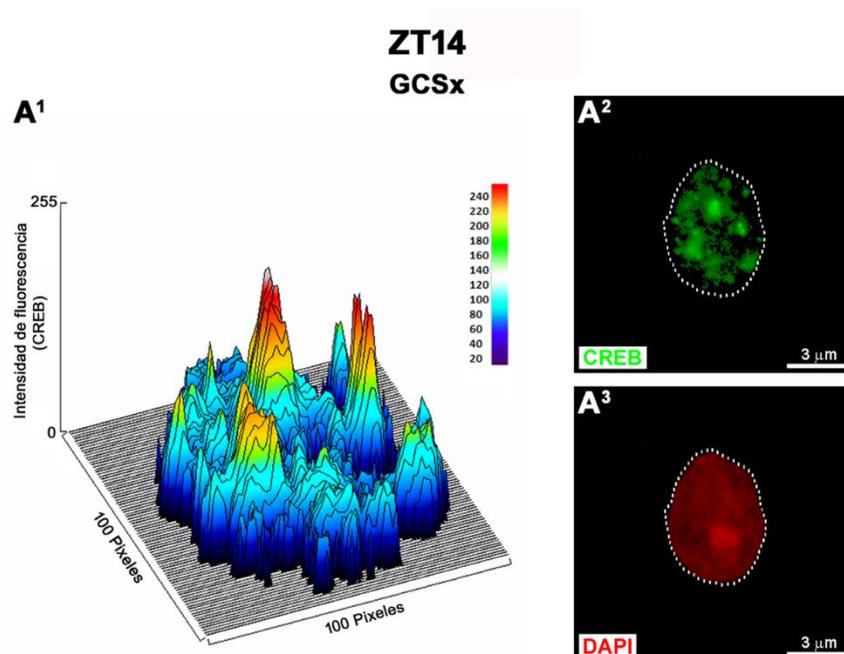


Figura 32. Representación de la distribución espacial de CREB en el núcleo de un pinealocito a ZT14 luego de la ganglionectomía bilateral crónica (GCSx).

A¹- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área (en pixeles) que ocupa dicho factor de transcripción para un núcleo individual de pinealocito a ZT14, proveniente de la GP de un animal luego de la remoción bilateral de los GCS (GCSx). El rango de intensidades varía de 0 a 255. A²-A³- La línea punteada blanca delimita el núcleo del pinealocito evidenciado mediante DAPI (rojo), mientras que la marca de CREB se denota en

verde. El núcleo representativo aquí mostrado fue aislado de una imagen de IHQ, seguida de microscopía confocal, tomada con objetivo 60X, aumento 2X. Escala 3 μ m. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d* © (NIH, USA) y la herramienta *Surface plot* para realizar estas reconstrucciones. GCS: ganglios cervicales superiores.

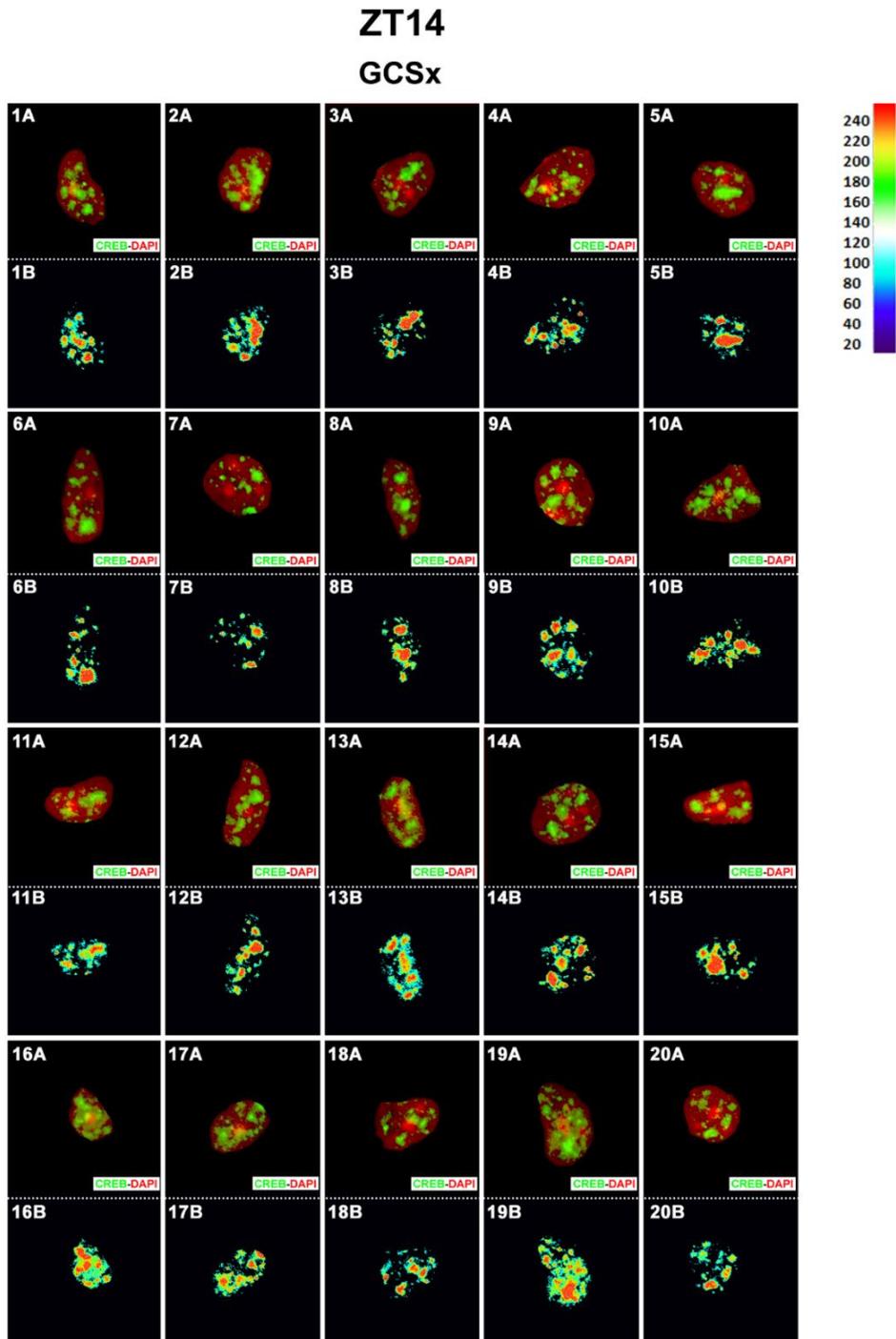


Figura 33. Análisis de la distribución espacial de CREB en núcleos de pinealocitos individuales a ZT14 luego de la ganglionectomía bilateral crónica (GCSx).

Núcleos de pinealocitos aislados de imágenes obtenidas por IHQ, seguida por microscopía confocal, proveniente de GPs de animales luego de la remoción bilateral de los GCS (GCSx). A¹-A²⁰- Los núcleos son identificados mediante DAPI (rojo) mientras que la marca de CREB se denota en verde. B¹-B²⁰- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área de cada núcleo de pinealocito. El rango de intensidades varía de 0 a 255. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d* ® (NIH, USA) para realizar estas reconstrucciones. GCS: ganglios cervicales superiores. Núcleos obtenidos de 4 GPs diferentes.

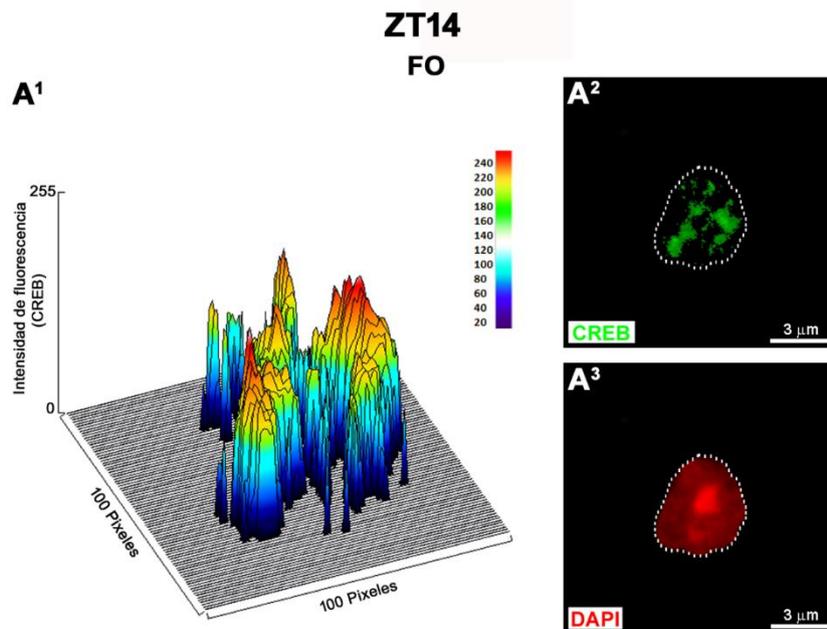


Figura 34. Representación de la distribución espacial de CREB en el núcleo de un pinealocito a ZT14 luego de la falsa cirugía (FO).

A¹- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área (en pixeles) que ocupa dicho factor de transcripción para un núcleo individual de pinealocito a ZT14, proveniente de la GP de un animal falsamente operado (FO). El rango de intensidades varía de 0 a 255. A²-A³- La línea punteada blanca delimita el núcleo del pinealocito evidenciado mediante DAPI (rojo), mientras que la marca de CREB se denota en verde. El núcleo representativo aquí mostrado fue aislado de una imagen de IHQ, seguida de microscopía confocal, tomada con objetivo 60X, aumento 2X. Escala 3 µm. Se utilizó el programa *ImageJ 1.52d* ® (NIH, USA) y la herramienta *Surface plot* para realizar estas reconstrucciones.

ZT14
FO

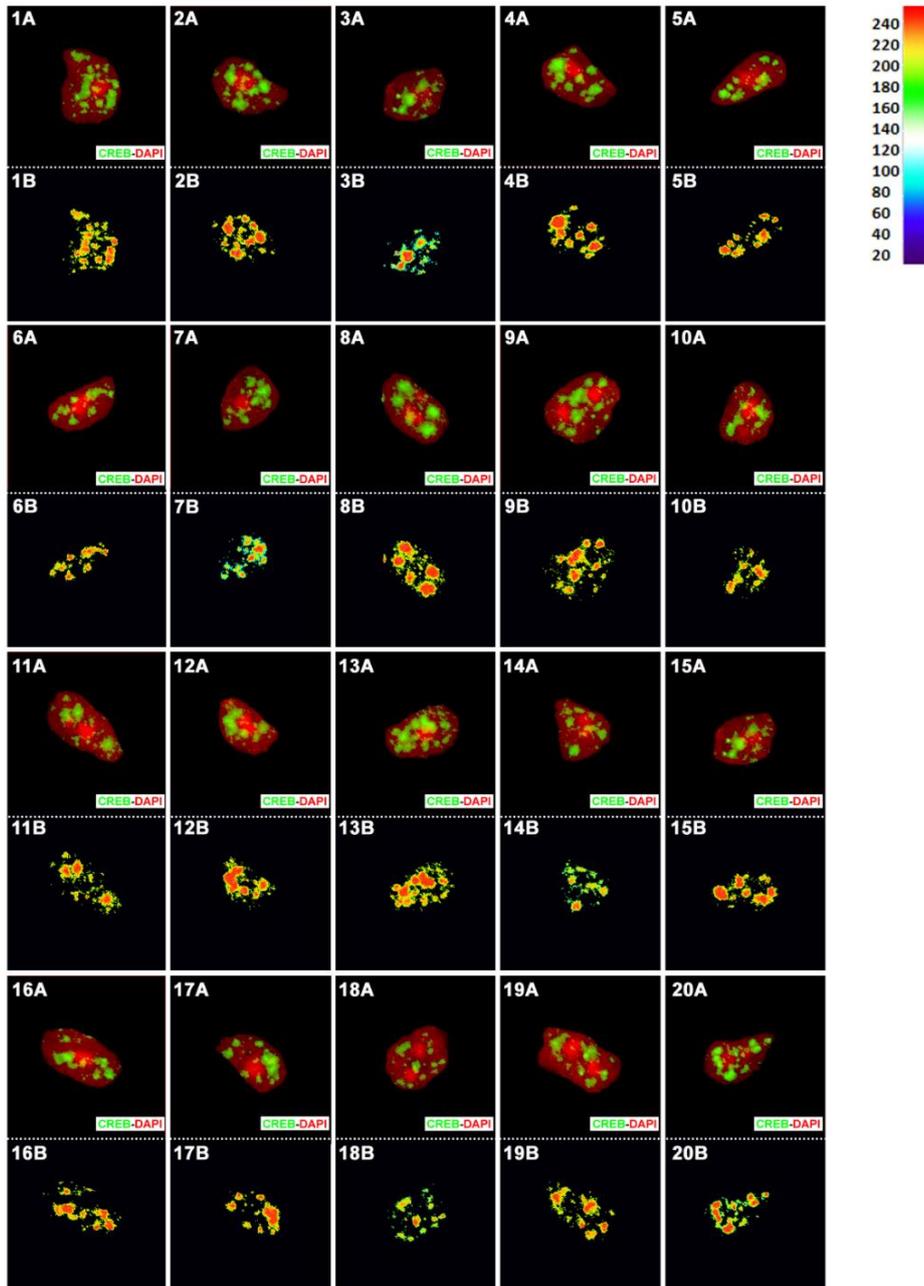


Figura 35. Análisis de la distribución espacial de CREB en núcleos de pinealocitos individuales a ZT14 luego de la falsa cirugía (FO).

Núcleos de pinealocitos aislados de imágenes obtenidas por IHQ, seguida por microscopía confocal, proveniente de GPs de animales falsamente operados (FO). A¹-A²⁰- Los núcleos son identificados mediante DAPI (rojo), mientras que la marca de CREB se denota en verde. B¹-B²⁰- Representación gráfica de las intensidades de fluorescencia de CREB en relación con el área de cada núcleo de pinealocito. El rango de intensidades varía de 0 a 255. Se utilizó el programa

ImageJ 1.52d ® (NIH, USA) para realizar estas reconstrucciones. Núcleos obtenidos de 4 GPs diferentes.

Por lo tanto, se decidió comprobar si esta tendencia que mostraba mayor dispersión de CREB en la condición GCSx, presentaba significancia estadística respecto a los animales FO y controles (sin intervención quirúrgica). Para cuantificar la dispersión espacial de CREB en animales GCSx y FO a ZT14, se calculó el número de píxeles totales de CREB en núcleos individuales de pinealocitos en las diferentes condiciones. Se observó, al igual que en el análisis de la dispersión espaciotemporal de CREB en los diferentes ZTs (Figura 30), la existencia de núcleos con bajo, medio y alto contenido de píxeles y gran dispersión entre los datos obtenidos, consecuencia de la variabilidad en la dispersión espacial de CREB dentro del linaje pinealocítico (Figura 36).

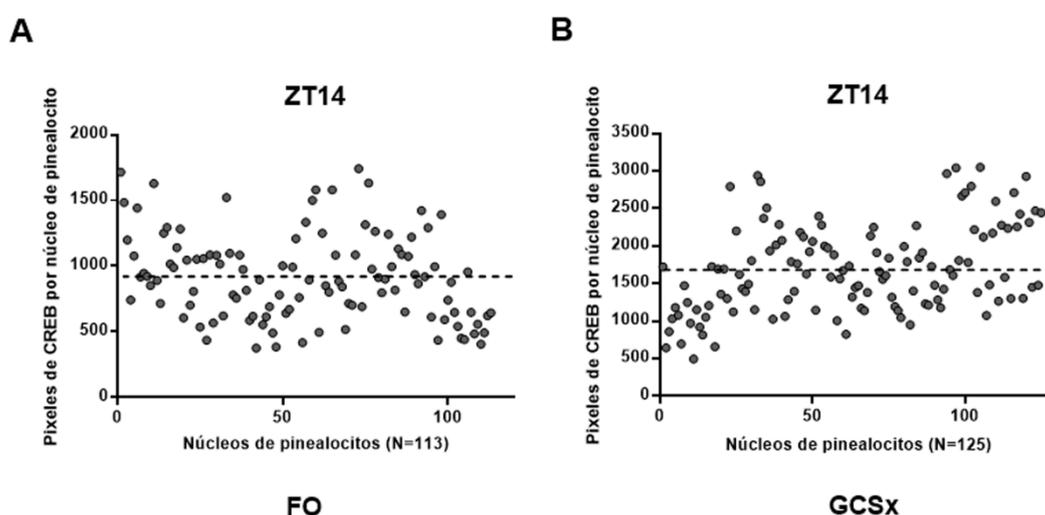


Figura 36. Representación gráfica del número de píxeles totales de CREB por núcleo de pinealocito a ZT14, luego de las cirugías GCSx y FO.

Cada círculo representa los píxeles totales encontrados en cada núcleo de pinealocito analizado. A- En animales falsamente operados (FO), sacrificados a ZT14, el total de núcleos analizados fue 113. B- En animales luego de la remoción bilateral de los GCS (GCSx), sacrificados a ZT14, el total de núcleos analizados fue 125. Se puede observar la gran heterogeneidad respecto a la cantidad de píxeles totales de CREB por núcleo entre los pinealocitos en cada condición. La línea punteada negra, representa la media de píxeles de CREB en cada condición. Los núcleos fueron tomados de imágenes obtenidas por IHQ, seguida de microscopía confocal. Se utilizó el programa

ImageJ 1.52d ® (NIH, USA) para aislar núcleos individuales y cuantificar los pixeles totales de CREB en cada uno de ellos. Se utilizaron 4 GPs por ZT. GCS: ganglios cervicales superiores.

Además, el análisis comparativo entre los diferentes grupos (control, FO y GCSx) por ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($p=0,0001$), siendo mayores los pixeles promedio encontrados en el grupo GCSx con respecto al control y FO (Figura 37).

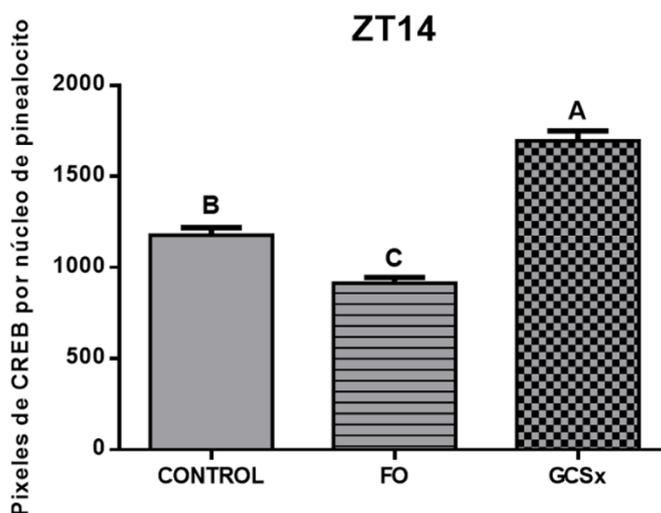


Figura 37. Cuantificación y análisis estadístico de los pixeles promedio de CREB a ZT14, luego de las cirugías GCSx y FO vs. la condición control.

Se compararon los promedios de pixeles de CREB \pm el error estándar, a ZT14, en animales sin intervención quirúrgica (CONTROL), falsamente operados (FO) y animales luego de la remoción bilateral de los GCS (GCSx). Se analizaron 113-125 núcleos de pinealocitos provenientes de 4 GPs para cada condición. Se realizó análisis de ANOVA de una vía, $p=0,0001$. Las letras diferentes (A, B y C) representan medias significativamente diferentes entre sí por el método de Tukey. GCS: ganglios cervicales superiores.

Los resultados observados sugieren que el fenómeno de la dinámica espaciotemporal de CREB mostrado anteriormente entre los ZTs (Figura 29), podría no ser un evento circadiano, o que la dependencia del reloj circadiano podría haber sido enmascarada después de la interrupción adrenérgica vía GCSx por cambios en la homeostasis de la GP. La remoción de los GCS provoca la degeneración Walleriana de las fibras nerviosas simpáticas que inervan a la GP y genera un proceso inflamatorio [192, 193]. Este fenómeno ha sido estudiado en nuestro laboratorio y existen evidencias de que durante el mismo ocurre un aumento en el número y activación de las células microgliales, como así también

un incremento en los eventos de contacto y/o fagocitosis de células intersticiales por parte de la microglía [69, 83]. Dicha microgliosis impactaría en la biología del pinealocito, afectando inclusive la dinámica del CREB nuclear.

De lo dicho anteriormente podemos concluir que los pinealocitos deberían ser considerados como una población celular dinámica, plástica y heterogénea, capaz de detectar diferentes estímulos y responder de manera diferente según el desafío y en el contexto en el que se encuentren [69, 76, 83, 120].

Estudio de la enzima ARN polimerasa II fosforilada como medida de la actividad transcripcional de la glándula pineal

La ARN polimerasa II fosforilada (pPOLII) es otra molécula cuyo comportamiento espaciotemporal fue estudiado en la GP. Esta enzima, implicada en la síntesis de ARN mensajeros, sirvió de parámetro para estudiar la actividad transcripcional de la GP en función de los ZTs. Mediante IHQ seguida de microscopía confocal se observó que la marca de pPOLII es nuclear y con un puntillado fino y homogéneo. La inmunomarcación se observó tanto en pinealocitos como células intersticiales a ZT6 (Figura 38) y ZT14 (Figura 39).

Por otro lado, no se encontraron diferencias que pudieran vincularse con una funcionalidad diferencial entre los tiempos analizados. Esto fue alentador porque refuerza el concepto de que la GP es un órgano activo tanto durante el día (ZT6) como a la noche (ZT14) [76, 114, 194]. Además de la biosíntesis nocturna de melatonina, otros procesos fisiológicos estarían tomando relevancia durante la fase de luz. El análisis del transcriptoma de células individuales [76] indicó que existe un aumento en la expresión en algunos genes en la fase de luz. Entre los transcritos aumentados se pueden mencionar Pax4 (del inglés, *Paired box 4*) y Cacna2d1 (del inglés, *Calcium voltage gated channel auxiliary subunit alpha 2 delta 1*) en pinealocitos α , y Mt-nd3 (del inglés, *Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3*), Rpl32.1 (del inglés, *60S ribosomal protein l32*) y Rps29 (del inglés, *40S ribosomal protein s29*) en pinealocitos β . Cdh2 (del inglés, *Cadherin 2*), Cdhr1 (del inglés, *Cadherin-related family member 1*), Cnga1 (del inglés, *Cyclic nucleotide gated channel alpha 1*) y Vldlr (del inglés, *Very low density lipoprotein receptor*) se expresaron en ambas poblaciones pinealocíticas. En astrocitos se encuentran aumentados los transcritos Nr1d1 (del inglés,

Nuclear receptor subfamily 1 group d member 1), BMAL1 y CLOCK. De esta forma la caracterización de los distintos linajes dentro de la GP podría complementarse en base al conjunto de genes que expresan en un tiempo dado.

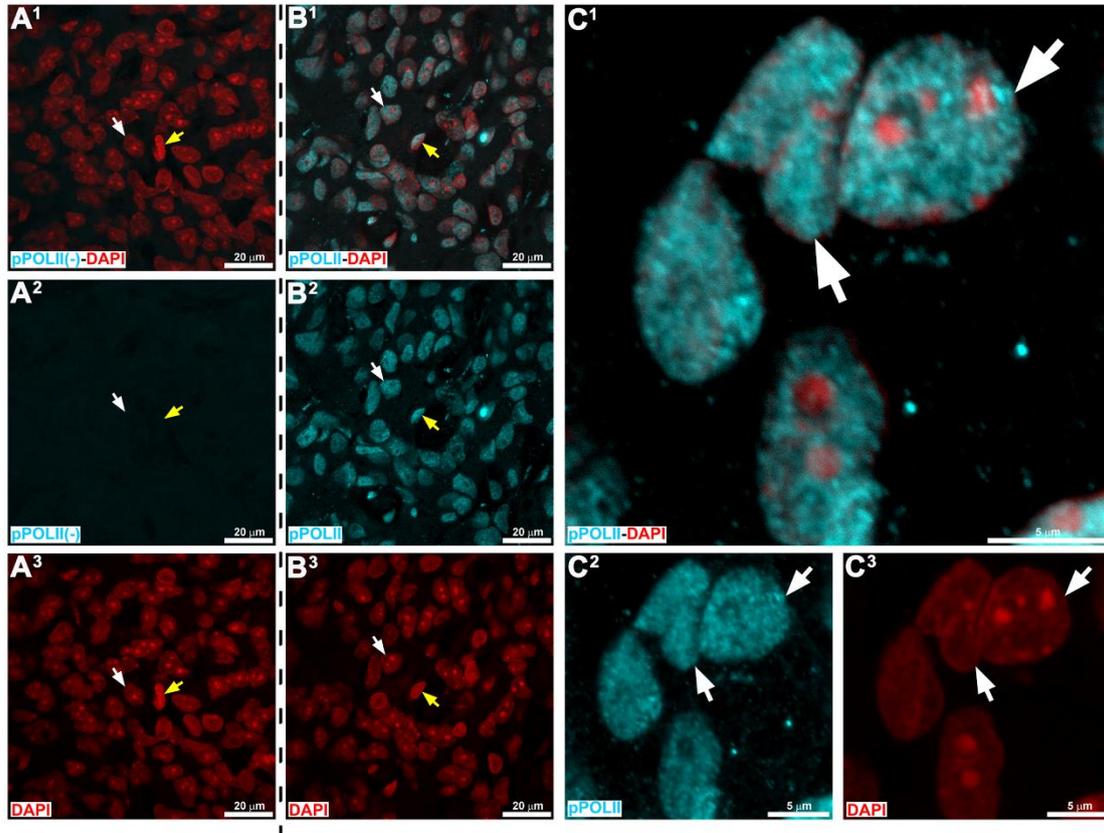


Figura 38. Análisis de la distribución de pPOLII en la glándula pineal a ZT6 mediante IHQ. pPOLII: cian. Núcleos visualizados con DAPI: rojo. A¹-A³- Sin anticuerpo anti pPOLII, control negativo. B¹-B³, C¹-C³- Con anticuerpo anti-pPOLII. A¹-A³, B¹-B³- Imágenes capturadas con objetivo 60X, escala 20 μm. C¹-C³- Imágenes tomadas con objetivo 60X, con aumento de 10X, escala 5 μm. Los núcleos de pinealocitos positivos para pPOLII son indicados con flechas blancas. Los núcleos de las células intersticiales son indicados con flechas amarillas.

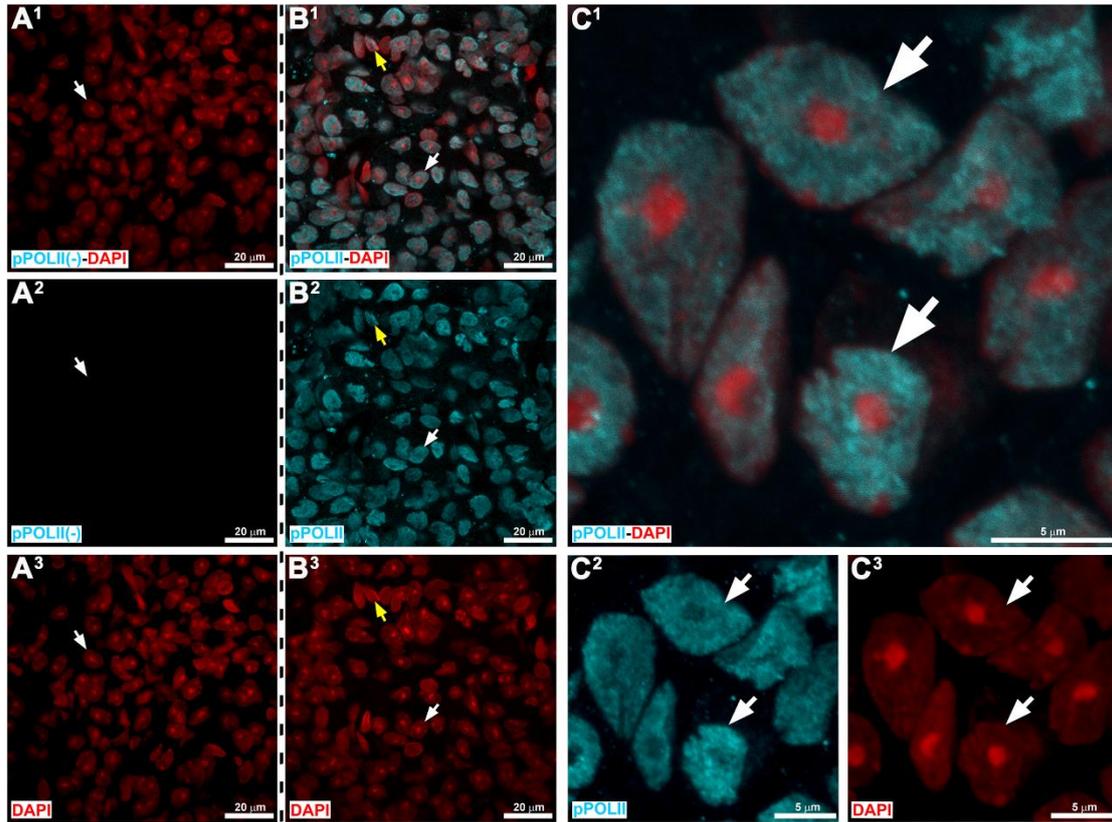


Figura 39. Análisis de la distribución de pPOLII en la glándula pineal a ZT14 mediante IHQ. pPOLII: cian. Núcleos visualizados con DAPI: rojo. A¹-A³- Sin anticuerpo anti pPOLII, control negativo. B¹-B³, C¹-C³- Con anticuerpo anti-pPOLII. A¹-A³, B¹-B³- Imágenes capturadas con objetivo 60X, escala 20 μm. (C¹-C³)- Imágenes tomadas con objetivo 60X, con aumento de 10X, escala 5 μm. Los núcleos de pinealocitos positivos para pPOLII son indicados con flechas blancas. Los núcleos de las células intersticiales son indicados con flechas amarillas.

Capítulo II

Estudio de la interacción proteica entre NeuroD1 y CREB

El estudio de NeuroD1 y CREB de manera independiente fue fundamental para conocer el dinamismo de ambas moléculas en nuestro modelo experimental. Por lo tanto, seguidamente y en concordancia con propuesto en los objetivos del plan de tesis, se planteó analizar la posible interacción entre los dos FTs. Para abordar esta premisa, se utilizó la técnica de Coimmunoprecipitación (CoIP), seguida de Western blot (WB).

Los resultados obtenidos a partir de extractos proteicos de cerebelo (Ce; Figura 40) y GP (Figura 41) muestran que estos FTs interaccionarían. NeuroD1 ya había sido previamente identificado y caracterizado en Ce [138, 195] y, en este trabajo se pudo demostrar por primera vez que interaccionaría con CREB.

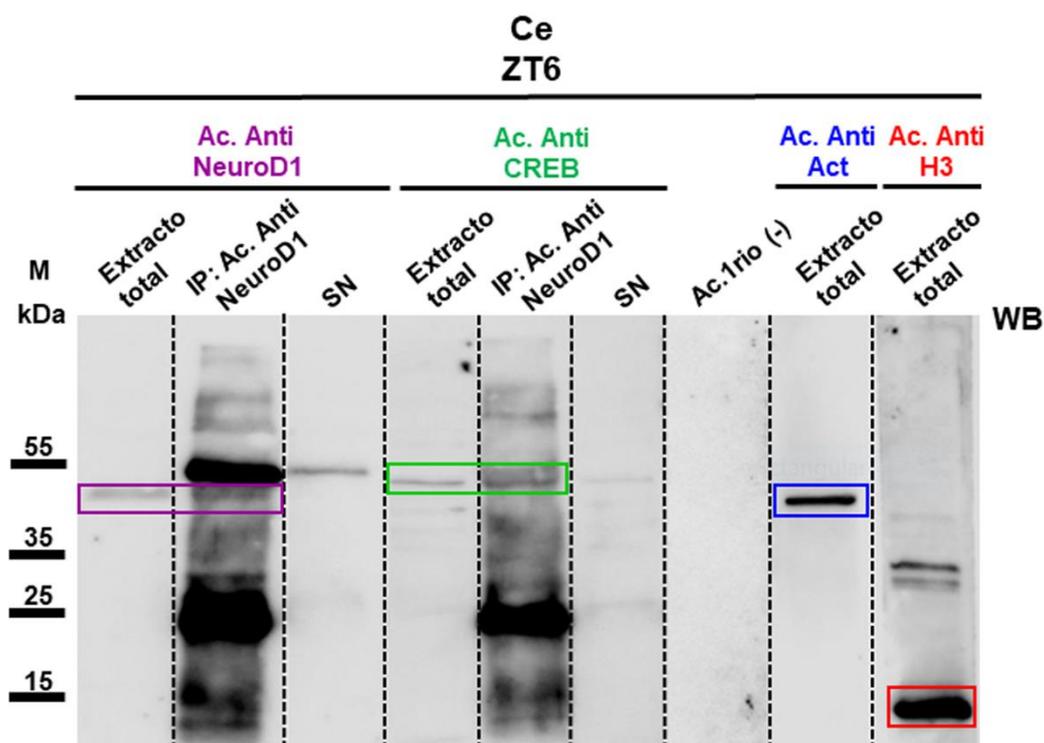


Figura 40. Coimmunoprecipitación seguida de Western blot para NeuroD1 y CREB en extracto totales de cerebelo.

Extractos proteicos totales de cerebelo (Ce) recolectados a ZT6 fueron usados para estudiar la posible interacción entre NeuroD1 y CREB. Luego de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-NeuroD1 se analizó la presencia de NeuroD1 y CREB, vía Western blot (WB). Para NeuroD1, bandas específicas de aproximadamente 49 kDa son indicadas en el extracto total e inmunoprecipitado (IP) (recuadro violeta). Las bandas específicas para CREB, de aproximadamente 43 kDa, son indicadas en el extracto total e IP (recuadro verde). Se pudieron

identificar también la cadena pesada, de ~50 kDa, y la cadena liviana, de ~25 kDa, del anticuerpo primario utilizado para inmunoprecipitar (segunda y quinta columna, respectivamente). Como control de carga se muestran actina (Act), de aproximadamente 42 kDa, en el recuadro azul, e histona 3 (H3), de aproximadamente 17 kDa, en el recuadro rojo. Ésta última sirvió también como evidencia de que los núcleos de las células fueron disgregados correctamente durante la extracción proteica y, por ende, los FTs liberados. Se realizó el control en ausencia de anticuerpos primarios [Ac.1rio (-)], para evaluar la especificidad de los mismos. Se sembraron además los sobrenadantes (SN) recuperados del IP para corroborar la eficiencia de la precipitación proteica. Ce: Cerebelo. M: Marcador de peso molecular.

Con respecto a la GP, se demostró también que existiría interacción entre NeuroD1 y CREB (Figura 41) durante la fase de luz (ZT6). Resultó novedoso hallar dicha interacción durante el día ya que mientras CREB se encuentra continuamente recluido en el núcleo, NeuroD1 muestra una oscilación espacial (citoplasma:núcleo) diaria. Al comienzo de la noche (ZT14), NeuroD1 se encuentra mayoritariamente en los núcleos de los pinealocitos, probablemente como consecuencia de su fosforilación [71, 72]. Esto evidencia el dinamismo que presenta NeuroD1 en cuando a su distribución espaciotemporal [71, 72] (Figura 8). Sin embargo, lo encontrado aquí es justificable, ya que sabemos que la distribución subcelular de NeuroD1 varía aún entre pinealocitos. Ya se había documentado que este FT estaría disponible en el núcleo celular de una subpoblación pinealocítica durante el día, pudiendo interactuar con CREB [71, 72].

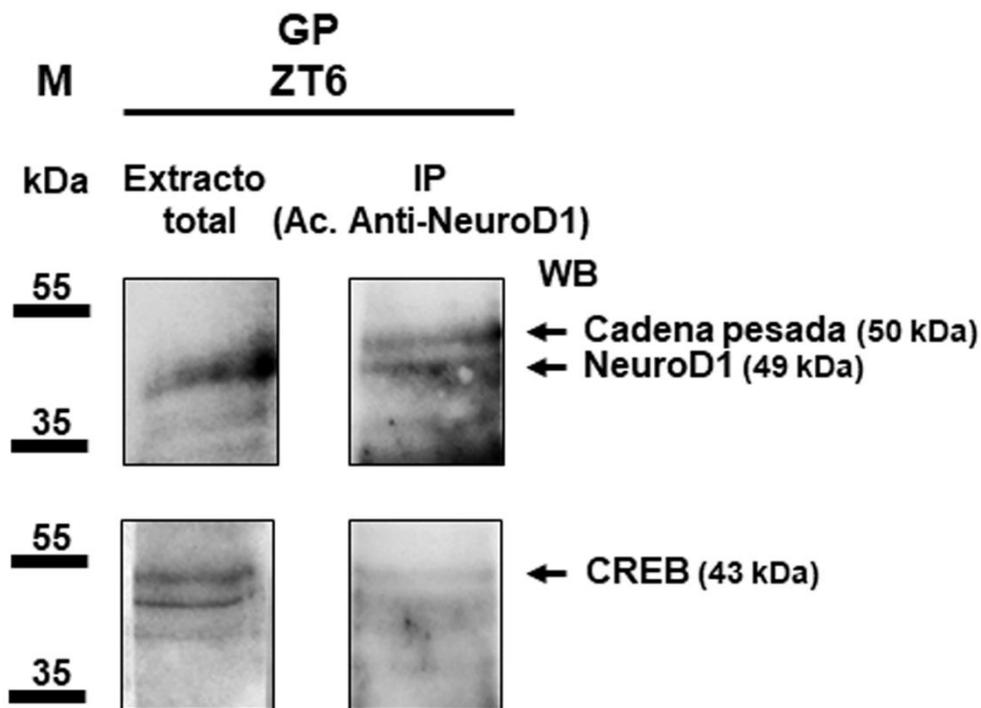


Figura 41. Coimmunoprecipitación seguida de Western blot para NeuroD1 y CREB en extracto total de glándula pineal.

Extractos proteicos totales de glándula pineal (GP) recolectados a ZT6 fueron usados para estudiar la posible interacción entre NeuroD1 y CREB. Luego de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-NeuroD1 se analizó la presencia de NeuroD1 y CREB, vía Western blot (WB). Para NeuroD1, bandas específicas de aproximadamente 49 kDa son indicadas en el extracto total e inmunoprecipitado (IP). Las bandas específicas para CREB, de aproximadamente 43 kDa, son indicadas en el extracto total e IP. Se puede identificar también la cadena pesada del anticuerpo primario utilizado para inmunoprecipitar, de ~50 kDa. M: Marcador de peso molecular.

Interacción de NeuroD1 y CREB con secuencias blanco específicas

Con el fin de abordar el objetivo específico 2 en el que se propuso estudiar el efecto de la interacción de CREB y NeuroD1 en la regulación del transcriptoma pineal de rata, se investigaron los genes *Aanat* e *Ins*. Éste último fue recientemente propuesto por Hanoudi y cols. como blanco de NeuroD1 en la GP de ratón [155].

Teniendo en cuenta esto, la técnica elegida para tal fin fue el ensayo de la luciferasa. Se clonaron los plásmidos de expresión para CREB y NeuroD1, como así también para E47, proteína capaz de heterodimerizar con NeuroD1, para unirse a cajas E en los promotores de los genes que activan [146] (Figura 7). Además de los plásmidos de expresión de las proteínas mencionadas, se clonó un fragmento de 1500 pb de la secuencia promotora del gen *Aanat* de rata, que contenía los sitios potenciales de unión para NeuroD1 y CREB, caja E y secuencia CRE, respectivamente. Dicho fragmento se clonó en un plásmido que contenía el gen de la luciferasa bajo el control del promotor mínimo prolactina (Prl) (Figura 11). Una vez obtenidos todos los constructos, se procedió a la transfección de células 293T (ver Materiales y Métodos, páginas 59-63). Se realizaron diferentes combinaciones de los plásmidos para comparar el efecto en la expresión de luciferasa de cada uno de ellos por separado y en conjunto. El experimento se llevó a cabo en condiciones basales y con NE, a fin de simular la noche (Tabla 8). Se midió la actividad de la luciferasa en cada una de las combinaciones de plásmidos planteadas, los resultados se relativizaron en función de la concentración de proteínas totales en cada muestra y luego se normalizaron a los valores del plásmido vacío pbat12, seguidamente, se realizaron los análisis estadísticos pertinentes (ver Materiales y Métodos, páginas 63 y 64).

Los resultados encontrados mostraron que las proteínas y sus diferentes combinaciones produjeron, en general, efectos moduladores sobre el promotor del gen de AANAT. La mayor modulación positiva se detectó con las combinaciones de promotor del gen *Aanat* y E47 o NeuroD1+E47 (con y sin NE), seguido de la combinación con NeuroD1 (con NE). El plásmido para E47 generó los mayores valores, siendo éste el que más contribuyó a la modulación positiva de *Aanat*. Un dato interesante fue que sin la presencia de NE, tanto NeuroD1 como CREB produjeron, de manera individual, una modulación negativa sobre el gen reportero en comparación con el plásmido de expresión vacío. Ante la presencia de NE, NeuroD1 mostró un efecto de modulación positiva sobre la activación del gen *Aanat*, mientras CREB evidenció un aumento con respecto a la condición sin NE pero siguió mostrando una modulación negativa si se compara con lo encontrado para el plásmido vacío. El fenómeno de modulación

negativa también se observó al utilizar la combinación NeuroD1+E47+CREB (con y sin NE) y NeuroD1+CREB (sin NE). El estímulo de NE no mostró efectos sobre la actividad del gen reportero para la combinación NeuroD1+CREB (Figura 42).

La modulación negativa observada en este experimento fue inesperada, ya que la hipótesis planteada proponía que NeuroD1 y CREB interactuarían sinérgicamente sobre las secuencias, cajas E y sitio CRE, presentes en el promotor del gen *Aanat* (Figura 11). Sin embargo, lo encontrado puede deberse en parte a que estos ensayos se realizaron *in vitro* en células de naturaleza diferente a los pinealocitos. Además, la línea celular 293T podría mostrar respuestas diferentes ante los mismos estímulos. Por ejemplo, la adición de NE no provocó la activación del promotor del gen *Aanat* por parte de la combinación NeuroD1+E47+CREB como se proponía, a pesar de que se comprobó que esta línea celular posee RAD α y β [196]. Otra probable explicación sería que el estímulo adrenérgico no fue suficiente para provocar la activación de la vía de señalización mediada por AMPc, fundamental para la fosforilación y activación de CREB y NeuroD1. Adicionalmente, la interacción de NeuroD1 con CREB demostrada mediante la CoIP (Figura 41), podría requerir de otras moléculas accesorias para formar el complejo transcripcional. Por último, es posible que la unión entre los FTs y las secuencias blanco sea transitoria, en dicho caso, la estimulación con NE por 3 h ensayada en los experimentos aquí mostrados podría escapar de la ventana temporal en la que se visualizaría la potencial activación sinérgica entre NeuroD1 y CREB sobre el promotor del gen *Aanat*.

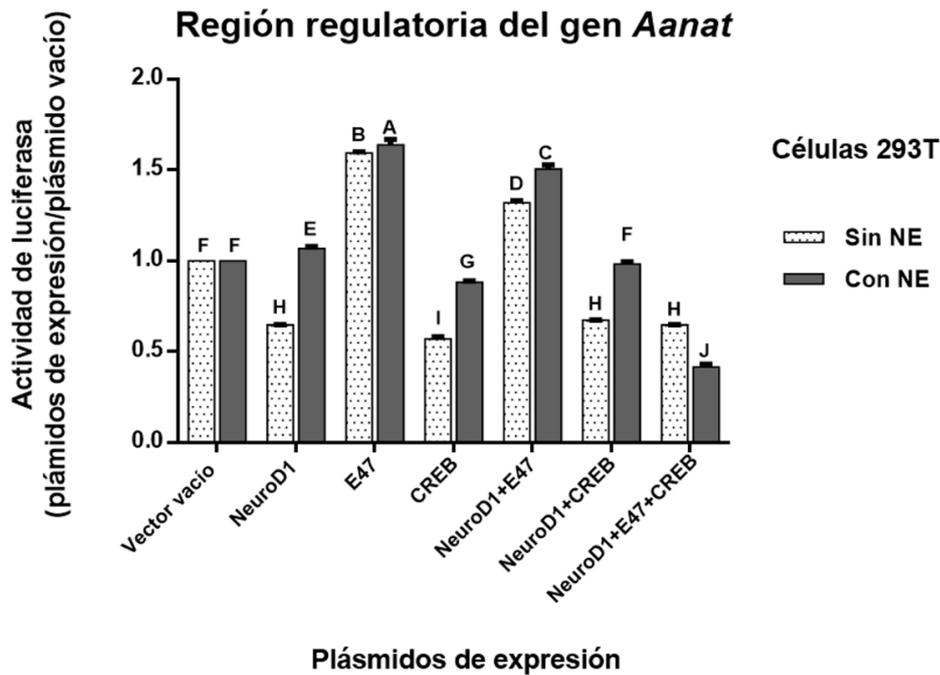


Figura 42. Ensayo de luciferasa con el promotor del gen *Aanat*.

Para este ensayo se utilizó un plásmido reportero conteniendo un fragmento del promotor del gen *Aanat* de rata, junto con el gen de luciferasa bajo el control de un promotor mínimo. Este constructo fue cotransfectado en células 293T, junto con diferentes combinaciones de plásmidos de expresión. NeuroD1, E47 y CREB fueron previamente clonados en el plásmido de expresión pbat12 (vector vacío). El experimento fue realizado en presencia y ausencia de norepinefrina (NE, 1 μ M, durante 3 h de tratamiento). La actividad de luciferasa fue calculada en relación con la obtenida con el plásmido vacío (vector vacío), teniendo en cuenta la concentración proteica en cada muestra. Las barras representan la media de un experimento con transfecciones realizadas por duplicado. Para determinar si existía diferencia estadística significativa entre las diferentes combinaciones de plásmidos y entre las condiciones con y sin norepinefrina, se realizó análisis de ANOVA de dos vías, $p=0,0001$. Las letras (A-J) indican si los grupos se asemejan o no entre sí por el método de Tukey.

A modo de control del ensayo de la luciferasa, se trabajó en paralelo con un plásmido conteniendo el gen de la luciferasa bajo el promotor mínimo Prl y cinco copias del potenciador E2/A3 (5FF) del promotor del gen *Ins* de rata que contiene 5 cajas E (Figura 11). Con anterioridad se había demostrado que las combinaciones NeuroD1+E47 o NeuroD1+E47+Pdx1 actuaban de manera sinérgica en la activación de la luciferasa en dicho constructo reportero en células mPAC L20 [166]. Estos autores pudieron confirmar que NeuroD1 y Pdx1 (del inglés, *Pancreatic and duodenal homeobox 1*) interactúan y forman un complejo

transcripcional regulando al gen *Ins*. Los resultados obtenidos en la experiencia con el potenciador del gen de *Ins* distaron levemente de lo previsto, ya que si bien, se pudo observar un incremento en la actividad de luciferasa con las combinaciones NeuroD1+E47 y NeuroD1+E47+Pdx1 respecto al plásmido vacío; dicho incremento en la actividad del reportero fue menor a la documentada anteriormente por Babu y cols. [166]. En cuanto a la inducción de luciferasa con el plásmido NeuroD1 fue mayor de la publicada por los autores y significativa respecto al plásmido vacío (Figura 43). Una vez más, las diferencias encontradas pueden ser explicadas, en parte, por la elección de la línea celular utilizada para realizar las experiencias. Pese a las diferencias obtenidas respecto a lo documentado anteriormente en la bibliografía, los datos son prometedores ya que muestran la influencia positiva de NeuroD1 y de éste en combinación con sus compañeros E47 y Pdx1, sobre la transcripción del gen *Ins*. Al mismo tiempo, nos permitió comparar la acción de NeuroD1 en dos genes blanco diferentes.

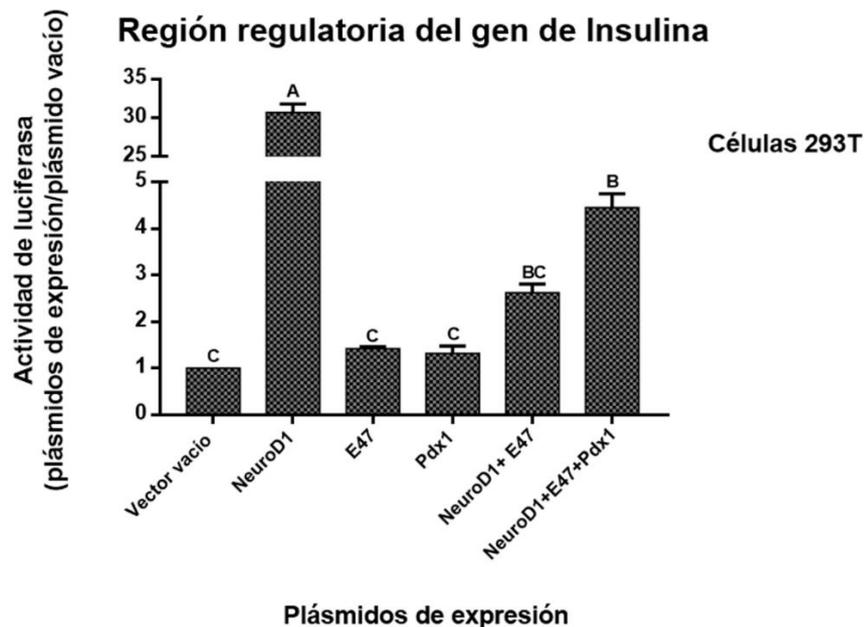


Figura 43. Ensayo de luciferasa con el potenciador del gen *Ins*.

Para este ensayo se utilizó un plásmido reportero conteniendo el gen de la luciferasa bajo el promotor mínimo de prolactina y cinco copias del potenciador E2/A3 (5FF) del promotor de *Ins* de rata. Éste fue cotransfectado en células 293T junto con diferentes combinaciones de plásmidos de expresión. NeuroD1, E47 y Pdx1 fueron previamente clonados en el plásmido de expresión pbat12 (vector vacío), teniendo en cuenta la concentración proteica en cada muestra.

Las barras representan la media de tres experimentos diferentes con transfecciones realizadas por duplicado. Para determinar si existía diferencia estadística significativa entre las diferentes combinaciones de plásmidos se realizó análisis de ANOVA de una vía, $p=0,0001$. Las letras (A-C) indican si los grupos se asemejan o no entre sí por el método de Tukey.

Capítulo III

En esta sección se muestran los resultados obtenidos del estudio de la identificación de genes blanco que pudieran ser potencialmente regulados por NeuroD1 en la GP.

Análisis de la expresión diaria de las enzimas de la síntesis de melatonina en la glándula pineal

En primer lugar se realizó la identificación temporal de los transcritos de AANAT y otras enzimas involucradas en la vía de síntesis de la melatonina, Tph1 e HIOMT (Figura 4). Por medio de la técnica RT-PCR se evidenció que la expresión del gen *Aanat* es meramente nocturna. Este resultado es concordante con la literatura [101], y refuerza la idea de que la enzima AANAT es de gran importancia en la síntesis de melatonina en rata. En cuanto a *Tph1* e *Hiomt*, estos genes mostraron diferencias sutiles en expresión durante el día y la noche (Figura 44). El análisis permitió corroborar la presencia de los transcritos de las enzimas y verificar la variación diaria del transcripto de AANAT en nuestro modelo de estudio.

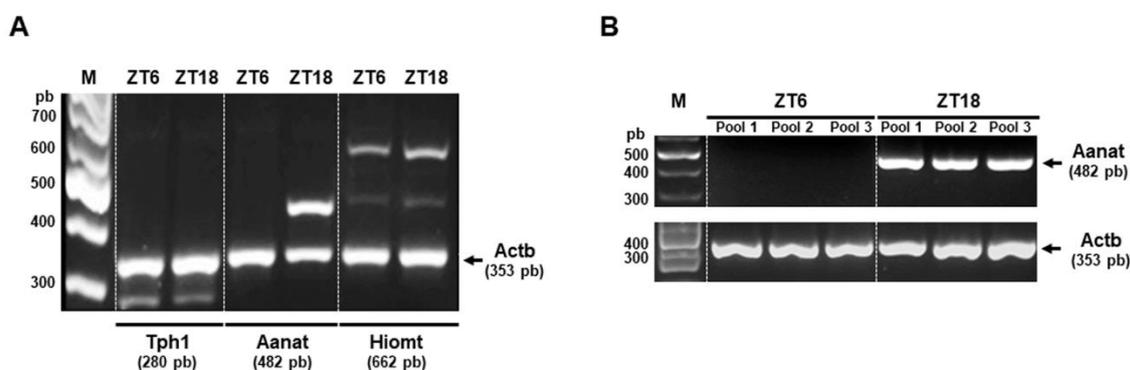


Figura 44. Análisis de la expresión de *Tph1*, *Aanat* e *Hiomt* a ZT6 y ZT18 en la glándula pineal mediante RT-PCR.

A-La expresión de los genes de las enzimas Tph1 (Triptófano hidroxilasa), AANAT (Arilalquilamina-N-acetiltransferasa) e HIOMT (Hidroxindol-O-metiltransferasa) fue analizada en las fases de luz (ZT6) y oscuridad (ZT18). Se visualizaron los fragmentos esperados de los transcritos de Tph1: 280pb; AANAT: 482pb; HIOMT: 662 pb. Actb: control de carga; fragmento de 353 pb. B- Se realizó el análisis de la expresión de *Aanat* en diferentes pools a ZT6 y ZT18. Se identificaron los fragmentos esperados para *Aanat* únicamente durante la noche, mientras

que Actb se visualizó en ambos ZTs. Cada pool contuvo 5 GPs. Se corrió paralelamente un marcador (M) de fragmentos de 100 a 1000 pb.

Análisis comparativo de la expresión génica de insulina y moléculas de señalización de insulina en la glándula pineal y otros sitios del SNC

Conforme a lo sugerido por Hanoudi y cols. [155], y ante la posibilidad de que NeuroD1 pudiera influenciar la expresión de los genes *Ins* y otros relacionados con la vía de señalización de Ins en la GP, se decidió explorar la expresión de estos genes.

Para determinar con mayor sensibilidad la localización espaciotemporal de los transcritos de *Ins*, *Insr*, *Cpe* (del inglés, *Carboxypeptidase E*), *Iapp* (del inglés, *Islet amyloid polypeptide*) y de *Gck* (del inglés, *Glucokinase*), en cortes de cerebro de rata a ZT6 y ZT18, se usó la técnica HIS. Luego de la exposición de la placa radiográfica por 12 días, se observó la expresión de *Cpe* e *Insr* en la GP, en los dos tiempos mencionados (Figura 45). Otros sitios en los cuales se observó una gran expresión de *Cpe* fueron: la capa de las células granulares del Ce, el Hi y la corteza cerebral. La *Cpe* es una enzima que tiene funciones de clivaje de proteínas no solo en el páncreas, sino también en el cerebro, como quedó comprobado aquí. *Insr* fue encontrado en GP, Ce e Hi, con una expresión marcada en Ce, y en menor medida en la GP, para ambos tiempos analizados (ZTs) (Figura 45). La presencia *Insr* se ha documentado anteriormente en el cerebro [159-161, 197], y según lo documentado se esperaba encontrarlo con una mayor distribución. Lo interesante fue que, mediante HIS, se pudo detectar al *Insr* en la GP de nuestro modelo de trabajo. Los transcritos de *Ins* y *Iapp*, cuya expresión podría estar influenciada por NeuroD1, no pudieron ser cuantificados en esta experiencia debido al bajo nivel de expresión que presentan estos genes. Alternativamente, los tejidos fueron expuestos a la placa radiográfica por más tiempo (40 días), sin embargo, los niveles de expresión de dichos genes fueron mínimos.

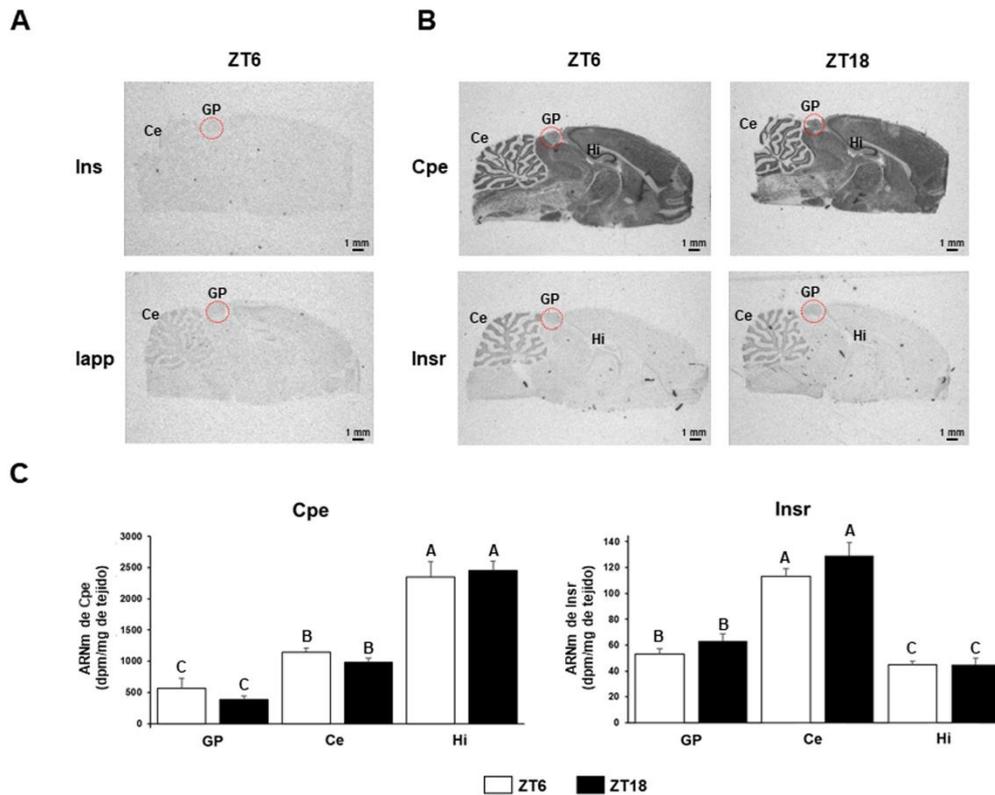


Figura 45. Análisis de la expresión de *insulina*, *péptido amiloide de los islotes*, *enzima carboxipeptidasa E* y *receptor de insulina* a ZT6 y ZT18 en cerebro mediante hibridación *in situ* radiactiva (S^{35}).

Se utilizaron cortes sagitales de cerebro de ratas machos adultos (P60) de la cepa Sprague Dawley para evidenciar la presencia y abundancia de los transcritos de A- la *Insulina* (*Ins*) y *péptido amiloide de los islotes* (*lapp*) en la fase de luz (ZT6), y B- la *Carboxipeptidasa E* (*Cpe*) y *receptor de insulina* (*Insr*) en la fase de luz (ZT6) y oscuridad (ZT18). Se emplearon 4 cerebros diferentes para cada ZT, y 2 cortes por cerebro. Se realizaron dos exposiciones: la primera exposición (12 días) permitió la identificación de los transcritos de *Cpe* y *Insr*, y la segunda exposición (40 días) la de los transcritos de *Ins* e *laap*. Escala 1 mm. C- Luego se comparó la abundancia relativa de algunos de los transcritos en GP (Glándula pineal), Ce (capa de las células granulares del Cerebelo) e Hi (Hipocampo) a ZT6 y ZT18. Para ello se analizó la densidad óptica (D.O.) de las hibridaciones *in situ* para *Cpe* e *Insr* y se transformaron los datos a dpm (desintegraciones por min)/mg de tejido utilizando un estándar calibrado de C^{14} . En la gráfica de representan los valores de las medias en dpm/mg tejido \pm el EEM. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías seguido por el método de Tukey. Letras diferentes letras (A, B, C) representan medias significativamente diferentes entre sí, $p=0,0001$.

Para complementar los ensayos de HIS, se decidió usar la técnica RT-PCR. Se estudió la expresión de *Ins1* y *Cpe* a ZT6 y ZT18 en GPs, y se pudo observar la presencia de los transcritos buscados en ambos ZTs (Figura 46A).

Luego se analizó la densidad óptica (D.O.) de las bandas producto de la RT-PCR para Ins1 y Cpe y se determinó la abundancia relativa respecto al de Actb. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student y no se encontraron diferencias estadísticas significativas para Cpe o Ins1, $p=0,50$ y $p=0,39$, respectivamente (Figura 46B).

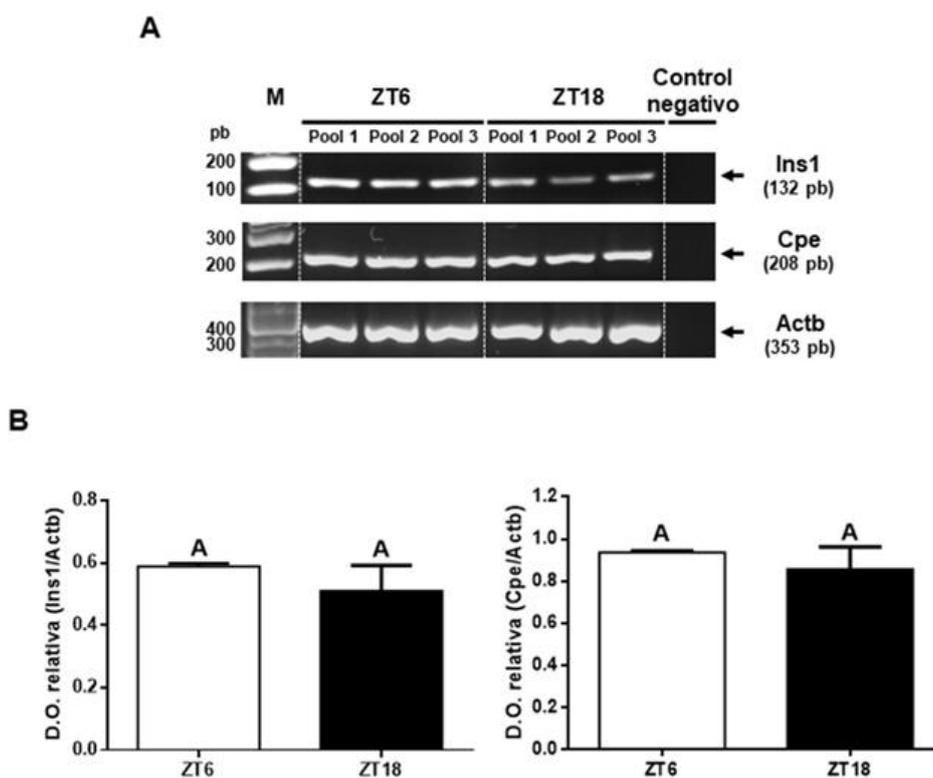


Figura 46. Análisis de la expresión de insulina y carboxipeptidasa E a ZT6 y ZT18 en la glándula pineal mediante RT-PCR.

A- La expresión de los genes de la hormona insulina (Ins1) y la enzima carboxipeptidasa E (Cpe), fue analizada en las fases de luz (ZT6) y oscuridad (ZT18). Se visualizaron los fragmentos esperados en ambos ZTs. Ins1: 132 pb, Cpe: 208 pb. Como control de carga se utilizó Actb; fragmento de 353 pb. Cada pool contuvo 5 GPs. Se utilizó un marcador (M) con fragmentos de longitudes conocidas. Los controles negativos se realizaron por omisión de los cebadores. B- Se analizó la densidad óptica (D.O.) de las bandas producto de RT-PCR para Ins1 y Cpe a ZT6 y ZT18, y se determinó la abundancia relativa de los transcritos respecto al de Actb. En la gráfica representan los valores de las medias de las D.O. \pm el EEM. Los datos fueron analizados utilizando la prueba t de Student. Cpe $p=0,50$, Ins1 $p=0,39$.

A continuación, y con el objetivo de cuantificar el transcritto de *Ins1*, se empleó la *Real time* PCR en células Min 6 (línea celular de insulinoma de ratón), GP y Ce, a ZT6. Los resultados de esta experiencia fueron muy interesantes ya que se identificó la presencia de *Ins1* en GP y Ce, a parte de la clásica presencia en células Min 6 (Figura 47).

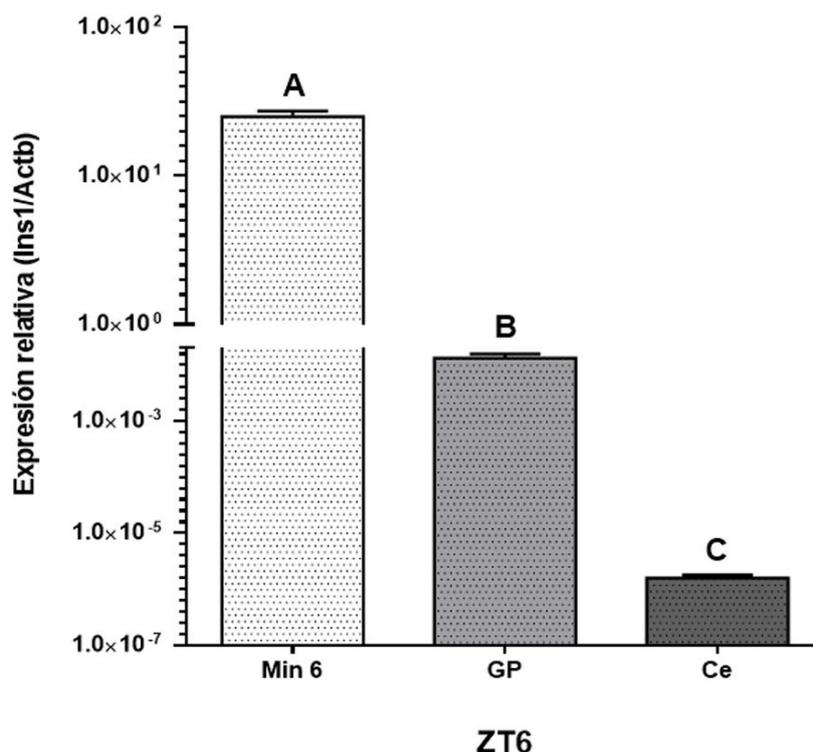


Figura 47. Análisis de la expresión de *Ins1* en células β pancreáticas, en glándula pineal y cerebelo, mediante *Real Time* PCR.

La expresión del gen *Ins1* fue analizada en células Min 6, GP, Ce durante el día (ZT6). La expresión se relativizó a los valores de *Actb* encontrados en cada muestra. Las barras representan la media \pm el EEM de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una vía seguido por el método de Tukey, $p=0,0001$. Letras diferentes (A, B, C) representan medias significativamente diferentes entre sí. Ce: Cerebelo, GP: Glándula Pineal, Min 6: células productoras de insulina.

A pesar de que la expresión en la GP y Ce fue menor que en las células Min 6, $p=0,0001$, cabe destacar que estos hallazgos apoyan la hipótesis de la presencia del transcritto de *Ins* en la GP, el cual podría estar bajo la regulación de *NeuroD1* [155]. Estos descubrimientos traen a discusión un tema recurrente

en la literatura: la producción local de Ins en pequeñas cantidades dentro del sistema nervioso central (SNC) [156, 163-165, 198]. No solo Ins ha sido buscada con anterioridad en el cerebro, sino también otras moléculas que participan en su vía de señalización [156]. Esta es la primera vez que se evidencia la expresión *Ins1* en la GP, aunque a niveles muy bajos.

Análisis comparativo del estudio de insulina en el páncreas y la glándula pineal

En paralelo al estudio de la expresión del mensajero de Ins, se realizó el análisis de la proteína en páncreas para evaluar su comportamiento, disponibilidad y distribución, y luego abordar el estudio en GP. Mediante la técnica de IHQ seguida de microscopía confocal se localizó la proteína Ins exclusivamente en las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans a ZT6 (Figura 48).

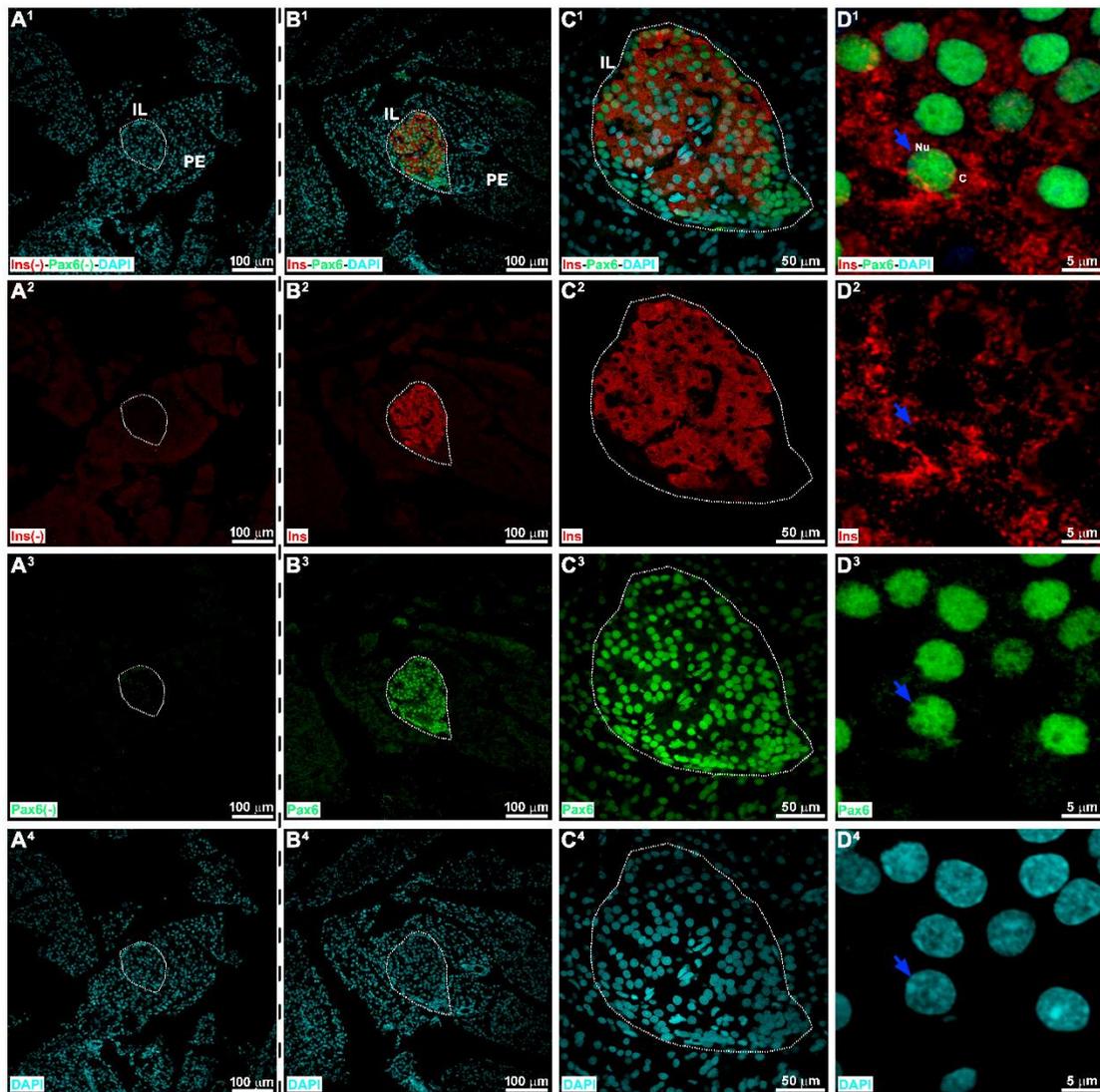


Figura 48. Análisis de la distribución de Ins y Pax6 en el páncreas a ZT6 mediante IHQ.

Ins: rojo. Pax6: verde. Núcleos visualizados con DAPI: cian. A¹-A⁴- Sin anticuerpo anti-Ins (control negativo) y sin anticuerpo anti-Pax6. B¹-B⁴, C¹-C⁴, D¹-D⁴- Con anticuerpos anti-Ins y anti-Pax6. A¹-A⁴, B¹-B⁴-Imágenes capturadas con objetivo 20X, escala 100 μm. C¹-C⁴- Imagen capturada con objetivo 60X, escala 50 μm. Las líneas punteadas blancas delimitan un islote de Langerhans. D¹-D⁴- Imagen capturada con objetivo 60X, con aumento 5X, escala 5 μm. La flecha azul indica una célula positiva para Pax6 e Ins. Nu: Núcleo. C: Citoplasma.

La marca para Ins se visualizó en el citoplasma de las células β con un patrón de distribución granular. También se analizó al factor de transcripción Pax6, el cual se confinó al núcleo de células que conforman los islotes con un patrón de distribución homogéneo y de puntillado muy fino. Pax6 es un FT esencial para el funcionamiento de las células de los islotes pancreáticos en

desarrollo y maduros [199-203], y nuestro grupo ha demostrado su presencia en una subpoblación de células de la GP de rata adulta [69, 70, 83].

Análisis comparativo de la proteína NeuroD1 en páncreas y glándula pineal

Como se mencionó anteriormente, la participación de NeuroD1 es esencial para la sobrevivencia de las células β productoras de Ins [141]. Mediante la técnica IHQ se estudió la disponibilidad y distribución espacial de la proteína NeuroD1 en el páncreas a ZT6. Se evidenció la marca del FT como un puntillado fino y uniforme en los núcleos de las células que componen los islotes de Langerhans (Figura 49).

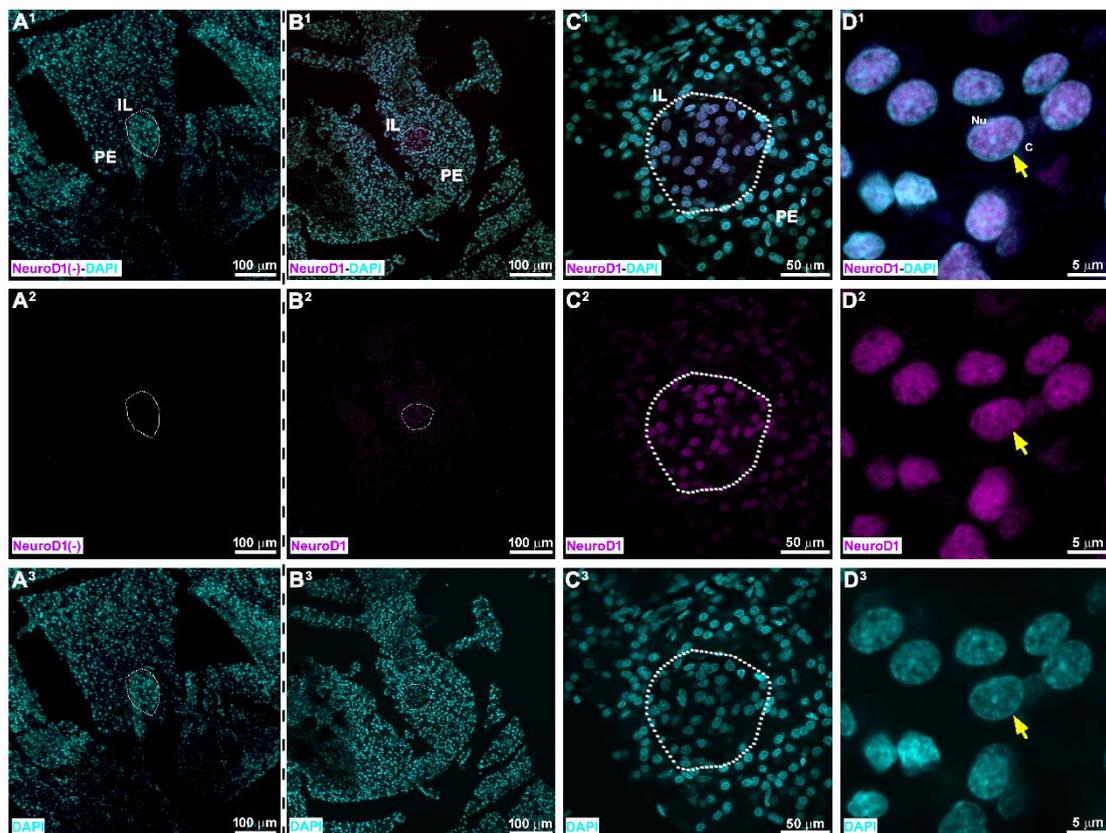


Figura 49. Análisis de la distribución de NeuroD1 en el páncreas a ZT6 mediante IHQ. NeuroD1: magenta. Núcleos visualizados con DAPI: cian. A⁵-A⁷- Sin anticuerpo anti-NeuroD1 (control negativo). B⁵-B⁷, C⁵-C⁷, D⁵-D⁷- Con anticuerpos anti-NeuroD1. A⁵-A⁷, B⁵-B⁷- Imágenes capturadas con objetivo 20X, escala 100 μ m. C⁵-C⁷- Imagen capturada con objetivo 60X, escala 50 μ m. Las líneas punteadas blancas delimitan un islote de Langerhans. D⁵-D⁷- Imagen capturada con objetivo 60X con aumento 5X, escala 5 μ m. La flecha amarilla indica un núcleo positivo para NeuroD1. Nu: Núcleo. C: Citoplasma.

Las proteínas Ins, NeuroD1 y Pax6 habían sido previamente caracterizadas en el páncreas. La estrategia de utilizar este órgano tuvo como objetivo principal conocer el comportamiento de la proteína Ins en un órgano especializado para finalmente realizar una búsqueda guiada en la GP.

Una vez determinado el patrón espacial de estas proteínas en el tejido pancreático, se realizó la búsqueda de Ins en la GP, y a pesar de varios intentos no se logró identificarla. Esto podría deberse a: los niveles de la proteína se hallarían bajo límites no detectables mediante la metodología empleada (IHQ y microscopía confocal), la proteína se sintetiza en la GP y posteriormente ocurre una rápida liberación de la misma, la velocidad de síntesis y secreción sería altamente dependiente de los niveles de glucosa local y no del ciclo L:O, o el gen se transcribe pero no se traduce en proteína, entre otros.

Discusión

El objetivo primordial de este trabajo de tesis doctoral ha sido esclarecer algunos aspectos que dictan la biología de la glándula pineal (GP). Principalmente, nos propusimos indagar sobre el impacto de dos factores de transcripción (FT), NeuroD1 y CREB, sobre la fisiología del órgano pineal.

Con respecto a NeuroD1, identificamos al FT a lo largo de todo el ciclo luz:oscuridad (L:O). La comparación entre muestras de GPs durante las fases de luz (ZT6) y oscuridad (ZT14 y ZT18) mostró que la proteína total se presenta sin variaciones diarias (Figura 13). En cuanto a la expresión del transcripto, tampoco se observaron cambios diarios (Figura 14). Los estudios a nivel de transcripto y proteína indican que la abundancia de la molécula es estable durante el ciclo L:O. Sin embargo, formas fosforiladas de NeuroD1 (Ser³³⁶ y Ser²⁷⁴) presentarían oscilaciones circadianas (Figura 8) [71, 72]. Estos hallazgos contribuyen a la hipótesis de que modificaciones postraduccionales oscilatorias modulan la dinámica del FT. Adicionalmente, estudios previos mostraron que NeuroD1 se encuentra presente durante toda la ontogenia de la GP de rata. El FT fue visto desde los primeros estadios embrionarios (E16) y se mantiene en la adultez [71, 72, 89]. La presencia de NeuroD1 durante todo el desarrollo de la glándula sugiere su implicancia en la definición y maduración de los pinealocitos. En la adultez, el rol de este FT estaría relacionado con el mantenimiento del fenotipo pinealocítico. NeuroD1 fue identificado mayoritariamente en los pinealocitos, y algunas células intersticiales vimentina positivas [71, 72]. Este último marcador evidencia astrocitos inmaduros y/o precursores pluripotente [204, 205]. La distribución de NeuroD1 en al menos dos linajes celulares diferentes fue confirmada por Mays y cols mediante *scRNA-Seq* (del inglés, *single cell RNA sequencing*) (Mays et al. 2018).

Estudios de nuestro grupo sugieren que existe una dinámica en cuanto a la localización subcelular de la proteína. Durante el desarrollo embrionario y en la primera semana posnatal, NeuroD1 se localiza en los núcleos de los pinealocitos durante todo el ciclo L:O, y a partir de la segunda semana, comienza a oscilar entre el núcleo y citoplasma. Durante la adultez, se ubica mayoritariamente en el compartimento nuclear bajo las formas fosforiladas Ser³³⁶ y Ser²⁷⁴, durante la noche temprana (ZT14) [71, 72]. Aparentemente, la fosforilación de NeuroD1 induciría su ingreso al núcleo celular. Este ritmo entre

compartimentos subcelulares se mantiene durante la adultez y su inicio pareciera coincidir con la descarga de norepinefrina (NE) a partir de los nervios conarios simpáticos [71, 72].

A partir de técnicas de silenciamiento génico se han dilucidado otras potenciales funciones de NeuroD1. La privación del FT afectaría el transcriptoma de la GP de roedores, sin alteraciones aparentes en la organogénesis [89, 92]. Se encontraron modificaciones en la expresión de los genes *En2* (del inglés, *Engrailed 2*), *Kif5c* (del inglés, *Kinesin family member 5C*), *Gad1* (del inglés, *Glutamic acid decarboxylase 1*), *Rnd3* (del inglés, *Rho family GTPase 3*), *Per3* (del inglés, *Period 3*) y *Aanat* (Arilalquilamina-N-acetiltransferasa) en modelos murinos KO global y condicional para el FT [89, 92]. Por el contrario, la carencia de NeuroD1 tendría un impacto más drástico sobre la ontogenia en la retina, afectando la correcta diferenciación y supervivencia de los fotorreceptores [92, 154]. Mientras que en el páncreas endocrino, la ausencia de NeuroD1 altera el desarrollo normal de los islotes de Langerhans (IL), imposibilitando la especialización de precursores a células β pancreáticas [135, 144, 166, 167, 206].

NeuroD1 ha sido también propuesto como un FT pionero en precursores neuronales de la corteza murina [150, 207]. En estas células, NeuroD1 se une de manera directa a elementos regulatorios de genes neuronales que se encuentran silenciados durante el desarrollo por mecanismos epigenéticos y, luego recluta a otras moléculas de la maquinaria para activar la transcripción. A pesar de la desaparición del pionero, la inducción de genes proneuronales persistiría por más tiempo a través de la memoria epigenética. [150, 207]. Los modelos mostrados en la Figura 50 proponen mecanismos potenciales de la regulación transcripcional de NeuroD1 en la GP [75]. Contribuyendo con la importancia de NeuroD1 en la activación génica, otros trabajos mostraron que podría promover la reprogramación celular. Mediante la técnica de expresión retroviral se sobreexpresó NeuroD1 en un modelo murino de Alzheimer y cultivos de células humanas [151]. Estos investigadores pudieron comprobar que células gliales de la corteza cerebral pueden reprogramarse directamente en neuronas funcionales e integrarse en los circuitos neuronales locales. Un estudio más reciente, usando expresión retroviral, mostró que NeuroD1 también sería capaz

de reprogramar células gliales a células madres neurales y neuronas inmaduras tras una injuria en la médula espinal [152]. Este novedoso rol ha sido investigado en otros sitios fuera del sistema nervioso central (SNC) como en páncreas adulto [153]. Se encontró que mediante la reexpresión de los FTs Pdx1 (del inglés, *Pancreatic and duodenal homeobox 1*), Ngn3 (del inglés, *Neurogenin-3*), MafA (del inglés, *MAF BZIP Transcription Factor A*) y NeuroD1, células exocrinas diferenciadas podrían transformarse en células β , pertenecientes a la población endocrina. La elección de estos FTs se fundamentó en que son necesarios durante el desarrollo embrionario del páncreas, especialmente para el establecimiento del linaje β pancreático [129, 208, 209].

En conjunto, estos hallazgos nos permiten demostrar la versatilidad de NeuroD1 como FT, y su implicancia en la ontogenia y mantenimiento de la homeostasis en distintas zonas del SNC y órganos endócrinos. Su potencial rol como estimulador de la diferenciación celular permitiría establecer estrategias terapéuticas en el área de reparación de tejidos, por ejemplo.

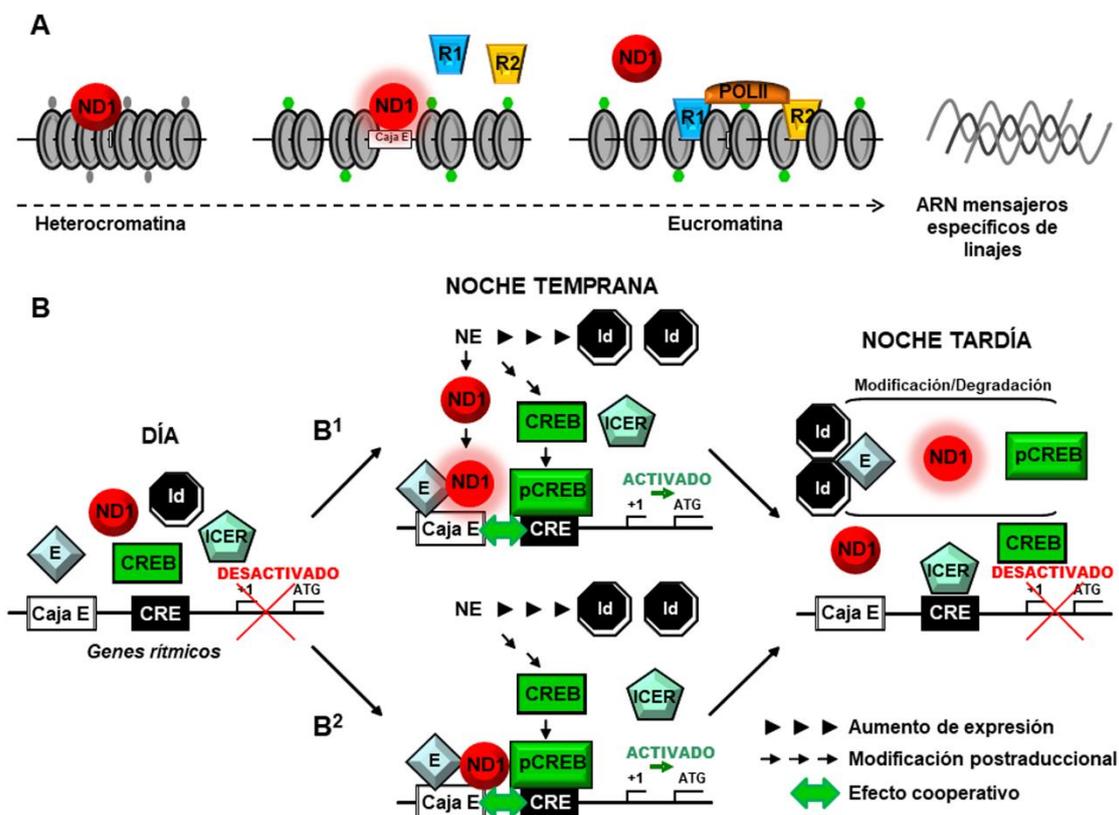


Figura 50. Mecanismos potenciales de la regulación de la expresión génica mediada por NeuroD1 en la glándula pineal.

A- NeuroD1 (ND1) desempeñaría un rol clave en la expresión de genes específicos de la GP, utilizando como blanco cajas E localizadas en regiones regulatorias escondidas en la heterocromatina (cromatina facultativa). La unión de NeuroD1 a estas secuencias, induciría la relajación de la cromatina (eucromatina), lo que facilitaría el reclutamiento de reguladores de la transcripción específicos del linaje celular (R) y de la enzima polimerasa II (POLII), y por lo tanto, la progresión de la diferenciación celular. La memoria epigenética inducida por NeuroD1 se mantendría en ausencia del mismo. B- NeuroD1 cooperaría directa o indirectamente con la expresión rítmica de los genes dependientes de CREB/pCREB/ICER. B¹- La influencia directa de NeuroD1 en la expresión génica rítmica se debería a modificaciones postraduccionales oscilatorias. B²- Contribución indirecta de NeuroD1 a la ritmicidad de los genes debido a la represión dependiente del tiempo ejecutada por los competidores de NeuroD1, las proteínas Id. ATG: codón de iniciación de la traducción; CRE: elemento de respuesta a AMP cíclico; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico; E: proteína E; ICER: represor temprano inducible por el AMPc; Id: inhibidor de la unión/diferenciación al ADN; ARNm: ácido ribonucleico mensajero; pCREB: fosfoCREB; NE: norepinefrina; R1 y R2: reguladores de transcripción; +1: punto de inicio de la transcripción. Tomado de Farias Altamirano y cols. [75].

Otra molécula con actividad transcripcional que se decidió estudiar y caracterizar en este trabajo fue CREB. Se determinó su abundancia y distribución espaciotemporal en la GP. En primer lugar, se encontró que la proteína total (con y sin fosforilación en el residuo Ser¹³³) se presentó sin variaciones durante las fases de luz (ZT6) y oscuridad (ZT14 y ZT18) (Figura 15). Según los datos mostrados, la presencia del FT se mantiene constante durante el ciclo L:O, lo que respaldaría que cambios postraduccionales, incluida su fosforilación en Ser¹³³, serían responsables de su activación [107, 108, 111]. La fosforilación que experimenta CREB durante la noche es dependiente de NE y regula, en gran parte, la producción de melatonina (Figuras 6 y 51) [75, 107, 108].

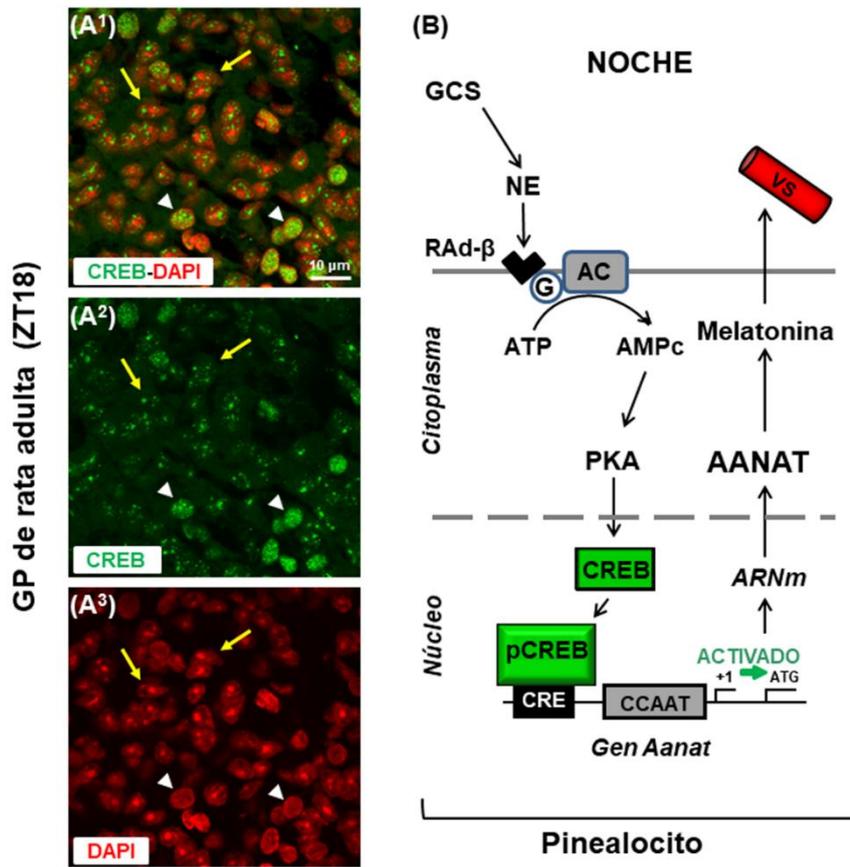


Figura 51. La vía de señalización mediada por CREB es fundamental para la biología pineal.

A¹-A³- Sección de glándula pineal (GP) de un macho adulto de rata Wistar inmunomarcado para el factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico; verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; rojo). Flechas amarillas representan pinealocitos maduros o células tipo 1. Puntas de flecha blancas señalan células de tipo 2. Barra de escala 10 µm. B- Esquema de la vía de síntesis de melatonina. *Aanat*/*AANAT*: Arilalquilamina-N-Acetiltransferasa, gen y proteína respectivamente; AC: adenilato ciclasa; ATG: codón de iniciación de la traducción; ATP: adenosin trifosfato; RAAd-β: receptor adrenérgico-β; VS: vaso sanguíneo; AMPc: adenosin monofosfato cíclico; CRE: elemento de respuesta a AMP cíclico; G: proteína G; ARNm: ácido ribonucleico mensajero; NE: norepinefrina; pCREB: fosfoCREB; PKA: proteína quinasa A; GCS: ganglios cervicales superiores; ZT: *Zeitgeber time* para un ciclo de luz-oscuridad (L:O) de 12:12; +1: punto de inicio de la transcripción. Tomado de Farias Altamirano y cols. [75].

Considerando que estos datos son el resultado de examinar extractos proteicos totales, vía WB, en los que no se logra hacer distinción entre los diferentes linajes celulares de la GP, se decidió estudiar la dinámica de la proteína CREB por IHQ. La inmunomarcación seguida de microscopía confocal de fluorescencia permitió identificar al FT en el núcleo de todas las poblaciones

celulares. Sin embargo, se observaron diferencias en los patrones de distribución entre los distintos linajes. En los pinealocitos, por ejemplo, CREB se presentó en forma de grumos discretos, de tamaño y distribución variables. Con respecto a las células intersticiales: microglía, astrocitos y células endoteliales, CREB se mostró como un puntillado fino y de distribución homogénea (Figuras 16-19 y 53). Estos patrones de distribución diferenciales no son exclusivos de la GP, sino que fueron encontrados también en cerebelo (Figura 20). CREB se encuentra de manera destacada en los núcleos de las células de Purkinje y granulares, células GABAérgicas y glutamatérgicas, respectivamente. Particularmente, CREB se mostró en forma de grumos de tamaño y distribución variable en las células de Purkinje de naturaleza GABAérgica, semejante a lo visto aquí en los pinealocitos glutamatérgicos [210-212]. Mientras, en las células granulares glutamatérgicas del Ce CREB mostró un patrón de puntillado fino y homogéneo, como en las células intersticiales de la GP. Es decir que el patrón de distribución de CREB sería, en principio, independiente del principal neurotransmisor que generaría cada linaje.

En conclusión podemos indicar que, a pesar de la ubicuidad de CREB nuclear en la GP, existen diferencias llamativas en su patrón de distribución entre distintos tipos celulares, lo que lo presenta como un FT cuyo comportamiento sería dependiente de linajes. Si bien astrocitos y pinealocitos derivan de precursores neuroepiteliales comunes positivos para Pax6 (del inglés, *Paired box 6*) y vimentina [70], presentan diferencias en cuanto a la organización espacial de CREB en sus núcleos celulares (Figuras 16 y 19). Por el contrario, la microglía, que invade el esbozo pineal en estadios embrionarios tempranos desde el saco vitelino [69], muestra una distribución de CREB similar a la observada en astrocitos (Figuras 17 y 18). Aún se desconoce cuáles son las implicancias de CREB en el establecimiento de los distintos linajes celulares, y en qué momento del desarrollo los precursores celulares adquieren las características que distinguen a las diferentes estirpes.

El análisis de CREB por IHQ se realizó a diferentes momentos del ciclo L:O, a fin de conocer la dinámica espaciotemporal del FT (Figuras 21 y 53). En las células del intersticio no se detectaron cambios aparentes entre las fases de luz (ZT6 y ZT10) y oscuridad (ZT14 y ZT18). El FT se presentó como un

puntillado fino y homogéneo sobre toda la superficie nuclear. Al analizar los pinealocitos, en cambio, se pudo identificar ciertas diferencias en cuanto al tamaño de los grumos y la dispersión espacial de CREB en relación con los ZTs. Decidimos focalizar el análisis en los pinealocitos ya que esta población mostró un patrón accesible al análisis a lo largo del ciclo L:O. Los resultados mostraron que la proteína presenta mayor dispersión a ZT14 y ZT18 con respecto a ZT6 y ZT10 (Figuras 21-31), sugiriendo un mayor número de genes regulados en la fase de oscuridad [76, 114, 120]. Se pudo observar que existe además una gran variabilidad de la distribución espacial de CREB, aún en un mismo ZT (Figura 30). Esta heterogeneidad observada con respecto al FT podría ser reflejo de la diversidad de la población pinealocítica; diversidad que ya fue mostrada mediante el seguimiento de diversos marcadores y vía *scRNA-Seq* [72, 73, 76]. Entonces, el efecto de CREB sobre la vía sintética de melatonina podría estar condicionado a los distintos subtipos de pinealocitos. Por ejemplo, Rath y cols. describieron dos poblaciones de pinealocitos que muestran variaciones en la abundancia de la enzima HIOMT (Hidroxindol-O-metiltransferasa) [73]. El grupo de Mays y cols. demostró además la existencia de dos subtipos de pinealocitos que expresan HIOMT de manera diferencial. Los pinealocitos β representan aproximadamente el 95% de la población pinealocítica, mientras la subpoblación α es más escasa. Sin embargo, lo interesante es que los pinealocitos α mostraron tres veces más expresión de HIOMT que los β . La subpoblación α podría entonces orquestar la síntesis de la melatonina, convirtiendo la N-acetilserotonina (NAS) liberada por los β , y maximizando de esta manera la productividad de la GP [76] (Figura 52).

en los α . C- Modelo esquemático de la síntesis de melatonina (M) en pinealocitos α y β a partir de NAS. La NAS que no es convertida en melatonina en los pinealocitos β , ingresa a los pinealocitos α por difusión pasiva a través de las membranas y por medio de uniones GAP (en azul). Posteriormente, NAS es convertida en melatonina mediante el sistema de alta eficiencia HIOMT/ASMT, presente en pinealocitos α , maximizando así la producción neta de melatonina.

Como se expuso anteriormente, el pulso nocturno de norepinefrina (NE) desencadena la fosforilación de CREB, con su consecuente activación [107-109, 111, 121]. Los experimentos en los que se ejecutó la disrupción simpática, vía ganglionectomía cervical superior (GCSx), revelaron que la distribución espacial de CREB aumenta en los pinealocitos a ZT14. Mientras que para el caso de las células intersticiales no se visualizaron diferencias aparentes en el ZT analizado (Figuras 32-37 y 53). Estos hallazgos insinuarían que la dinámica espacial de CREB estaría siendo regulada por mecanismos independientes de la NE nocturna. O en su defecto, dependería de NE pero en la SCGx dicha relación estaría enmascarada por otros procesos que serían desencadenados tras la extirpación de los ganglios. Por ejemplo, sabemos que la SCGx provoca degeneración Walleriana de las fibras nerviosas simpáticas que inervan a la GP, generando un cuadro inflamatorio [83, 192, 193]. En nuestro laboratorio se mostró que la GCSx genera microgliosis y además se ha visto que estas células reactivas aumentan su afinidad y potencialmente, la fagocitosis de otras células de la GP, incluidas las inmunoreactivas para Pax6 [69, 83]. Se debe tener en cuenta que los pinealocitos representan una población celular muy dinámica y plástica, que podrían detectar diferentes estímulos y responder según el desafío y el contexto en el que se encuentren [83, 120]. En vista de que la GCSx altera el microambiente pineal e influye potencialmente la fisiología de los pinealocitos, otras metodologías deberían ser empleadas para estudiar la dependencia de la dinámica de CREB al reloj circadiano central (Figura 1). Entre ellas, podemos mencionar estrategias menos severas como el empleo de antagonistas para los receptores adrenérgicos (RAd) β y α , y la descentralización (GCSd) [72, 83, 120]. Ésta última cirugía implica la disrupción del tronco simpático, manteniendo los GCS *in situ* y los nervios que inervan a la GP intactos. Mediante estas dos estrategias alternativas se evitaría generar focos inflamatorios locales en la GP.

Distribución de CREB nuclear en la GP de rata adulta

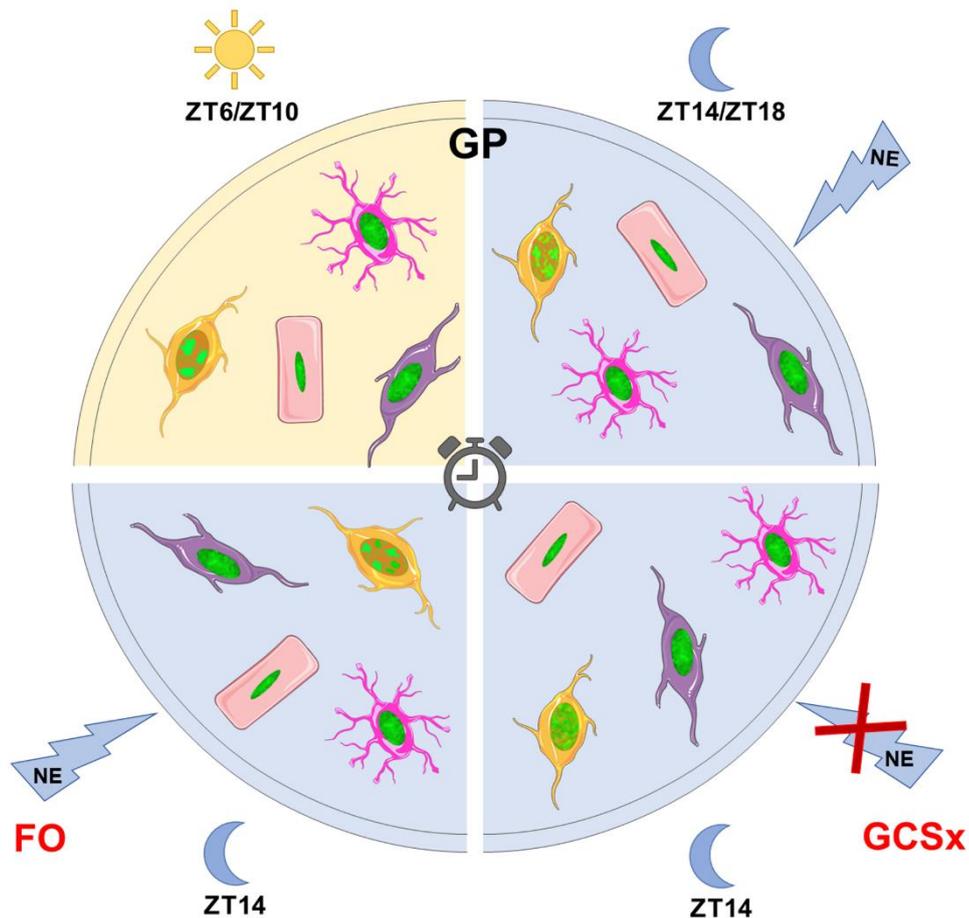


Figura 53. Modelo esquemático de la distribución espaciotemporal de CREB en la GP.

El modelo ejemplifica la heterogeneidad de la distribución nuclear de la proteína CREB (verde) en pinealocitos (naranja) y células intersticiales: astrocitos (fucsia), microglía (violeta) y células endoteliales (rosa). En la mitad superior de la imagen se esquematizan GPs de animales en condiciones normales durante las fases de luz (ZT6 y ZT10) y oscuridad (ZT14 y ZT18). En la mitad inferior de la imagen se esquematizan GPs de animales falsamente operados (FO) y ganglionectomizados (GCSx) a ZT14. La distribución espaciotemporal de CREB presenta patrones diferentes para las distintas poblaciones celulares de la glándula pineal (GP). El dinamismo espacial de CREB durante el ciclo L:O se evidencia únicamente en los pinealocitos. En la fase de luz, el FT se encuentra concentrado en pocos grumos bien definidos, mientras que durante la fase de oscuridad aumenta la dispersión de la proteína. La disrupción simpática crónica, a través de la GCSx, genera una mayor dispersión. La condición FO mostró un patrón de dispersión menor en comparación al control. La dinámica espacial de CREB en las células intersticiales no sería afectada por cambios temporales o injuria quirúrgica. NE: norepinefrina.

Nos preguntamos entonces si los cambios en de la distribución espacial de CREB podrían estar vinculados a la transcripción de genes específicos mediado por este FT. Más aún, nos cuestionamos cuál es el momento de la ontogenia de la GP en el que se produciría el cambio en los patrones de distribución de CREB que distingue a los pinealocitos de las células intersticiales, aún cuando deriven de las mismas células progenitoras. Surge el interrogante si en estadios tempranos de la ontogenia, donde la definición de los linajes aún no se ha establecido, la distribución del FT sería del tipo puntillado fino y homogéneo, y luego, cambiaría por un patrón de grumos más definidos como los observados en los pinealocitos. Además, cabe preguntarnos como varia la cromatina en general a lo largo del desarrollo y en función del ciclo L:O en la GP. En un estudio realizado por el grupo de Solovei y cols. [213] se utilizaron proteínas histonas modificadas para diferenciar cambios estructurales de la cromatina en células fotorreceptores de roedores. Para identificar la eucromatina (transcripcionalmente activa) utilizaron H3K4me3 (Histona 3 trimetilada en la lisina 4), mientras que para la heterocromatina emplearon H3K9me3 (Histona 3 trimetilada en la lisina 9) y H4K20me3 (Histona 4 trimetilada en lisina 20). Estas proteínas les permitieron documentar la organización espacial de la cromatina, a fin de poder inferir la actividad transcripcional de las células. Se encontró que en los fotorreceptores tipo bastones, encargados de la visión nocturna, la eucromatina se ubicó como un fino puntillado en la periferia nuclear, próxima a la membrana nuclear, mientras que la heterocromatina se encontró como grumos definidos concentrados en el centro del núcleo. Además, los autores lograron determinar que este dinamismo cromatínico se establece durante el desarrollo. En estadios posnatales tempranos, la organización de la cromatina es clásica, con la eucromatina en el centro y la heterocromatina en la periferia nuclear, y luego del primer mes de vida esta organización se invierte en dichos fotorreceptores. Solovei y cols. propusieron que esta disposición espacial invertida de la cromatina podría haber otorgado ventajas adaptativas a los roedores en cuanto a la visión nocturna [213]. El uso de marcadores de eucromatina y heterocromatina, como los mencionados en el trabajo de Solovei y cols. [213], junto con CREB, podrían contribuir a dilucidar la relación entre la dispersión espacial del FT y sus funciones transcripcionales en la GP.

Otros autores han colaborado con el esclarecimiento de las funciones transcripcionales de CREB, ya que si bien el rol que desempeña el FT en la GP ha sido bastante indagado, su distribución espaciotemporal e interacción con la cromatina siguen siendo desconocidos. Por ejemplo, por Sugo y cols. [122] describieron la dinámica de unión y disociación de moléculas individuales de CREB a sus sitios CREs. Mediante ensayos *in vitro* en la línea celular neuronal Neuro2a, comprobaron que la unión de CREB a las secuencias CREs es el tipo transitoria y repetitiva [122]. Más recientemente el mismo grupo documento que en neuronas corticales de ratón la frecuencia de unión de CREB a secuencias genómicas está influenciada por la actividad neuronal [123]. Una de las razones que empoderan este tipo de ensayos tiene relación con el hecho de que alteraciones en CREB se han relacionado con diferentes enfermedades neuropatológicas, entre las que podemos mencionar a la enfermedad de Huntington [121, 124, 125]. Dependiendo de cada etapa de la enfermedad se encuentra que la regulación transcripcional vía CREB se encuentra aumentada o disminuida [124, 125].

Luego, para comprender si el aumento de la dispersión de CREB en los pinealocitos durante la fase de oscuridad (Figuras 31 y 53) estaría relacionado con un incremento de la actividad transcripcional de la GP, se analizó a la enzima pPOLII (ARN polimerasa II fosforilada) durante el ciclo L:O. Esta polimerasa se presentó como un puntillado fino y homogéneo en los núcleos de todas las poblaciones celulares, sin variaciones entre las fases de luz (ZT6) y oscuridad (ZT14) (Figuras 38 y 39). Por lo tanto, este abordaje no nos permitió justificar el patrón diferencial de CREB en pinealocitos mediante un marcador global de transcripción. De todas formas estos resultados permitieron diagnosticar a la GP como un órgano transcripcionalmente activo durante el día y la noche. Con respecto a lo nocturno, fase donde transcurre la síntesis de la hormona melatonina, era de esperar activación transcripcional. Recientemente, Mays y cols. encontraron, durante el periodo diurno, un aumento en la expresión de un grupo heterogéneo de genes en ambas subpoblaciones de pinealocitos de roedores, incluyendo *Cdh2* (del inglés, *Cadherin 2*), *Cdhr1* (del inglés, *Cadherin-related family member 1*), *Cnga1* (del inglés, *Cyclic nucleotide gated channel alpha 1*) y *Vldlr* (del inglés, *Very low density lipoprotein receptor*), *Nr1d1* (del

inglés, *Nuclear receptor subfamily 1 group d member 1*), BMAL1 y CLOCK, entre los cuales hay FTs claves en la conformación del reloj circadiano [50-52, 76]. En conclusión, la GP se encontraría siempre activa, siendo la identidad de los genes expresados variable a lo largo del ciclo L:O [76, 114, 120, 194].

El estudio minucioso de la disponibilidad y dinámica espaciotemporal de CREB y NeuroD1 sentó los cimientos necesarios para comprender el modelo experimental planteado e investigar a continuación la potencial interacción entre ambos FTs, y la función de estos en la activación de secuencias génicas específicas en la GP. En primera instancia, los resultados obtenidos mediante CoIP (Coimmunoprecipitación), demostraron que existe interacción entre NeuroD1 y CREB en extractos proteicos totales de Ce y GP durante la fase de luz (ZT6) (Figuras 40 y 41). Como mencionamos anteriormente, en la GP, CREB se encuentra limitado al compartimiento nuclear durante todo el ciclo L:O, mientras que NeuroD1 presentaría una dinámica circadiana entre el núcleo y el citoplasma. La movilización entre compartimientos estaría relacionada con la fosforilación del FT (Figuras 8 y 50). NeuroD1 fosforilado se ubicaría mayoritariamente en el núcleo durante la noche temprana (ZT14) [71, 72]. Este fenómeno de desplazamiento del FT entre compartimientos no sería absoluto, por esta razón inferimos que se pudo observar la interacción de NeuroD1 y CREB a ZT6. Queda por determinar si lo mismo ocurriría durante la fase nocturna (ZT14 y/o ZT18) donde hipotetizamos que estos FTs activarían genes blanco involucrados en la vía de síntesis de melatonina, incluido el gen *Aanat*. Además, queda por responder si existen proteínas adicionales involucradas en el complejo, si NeuroD1 y CREB interaccionan de forma directa o indirecta, y cuál es la relevancia de la interacción de los FTs durante la fase de luz.

Luego de identificar la interacción entre NeuroD1 y CREB, se estudió la influencia de estos FTs sobre la regulación génica. Para lograr el objetivo, las secuencias blanco utilizadas fueron las de los genes *Aanat* e *Ins*. El gen de *Ins* ha sido recientemente propuesto como potencial blanco de NeuroD1 en la GP de ratón [155]. Las secuencias regulatorias de estos genes, como se señaló en Introducción y Materiales y Métodos (Figuras 5,7 y 11), presentan sitios de unión para NeuroD1 y CREB. Con el previo conocimiento de que estos FTs afectan la transcripción del gen *Ins* en el páncreas, propusimos que además *Ins* podría ser

regulado en la GP [104, 126, 127, 144, 166, 167]. En general, los resultados de los ensayos de luciferasa en la línea celular 293T revelaron un efecto modulador de NeuroD1 y CREB sobre los fragmentos de los promotores ensayados para los genes *Aanat* e *Ins*. La dirección de dicha modulación (positiva o negativa) varió según la combinación de plásmidos de expresión usada (Figuras 42 y 43). Los resultados obtenidos podrían ser a futuro complementados con otros ensayos que nos permitan estudiar la interacción de los FTs en mayor profundidad. Lo mostrado en el Capítulo II fue realizado en un sistema *in vitro*, en la línea celular 293T (células embrionarias de riñón) diferente al linaje pinealocítico, por lo que sería de esperar diferentes respuestas a NeuroD1 y CREB en los pinealocitos. Otra diferencia respecto de lo que podría suceder en modelos *in vivo* es que en los experimentos de este trabajo de tesis se ensayaron fragmentos de los promotores, pudiendo no ser suficientes para producir la inducción de la expresión génica por interacción de ambos FTs. Por ejemplo, evidencia encontrada por otros investigadores propone que NeuroD1 y Pdx1 interactúan para formar un complejo multiproteico sobre el gen de *Ins*, mediante la formación de un bucle corto de ADN que une secuencias alejadas entre sí [166]. Los mismos autores sugirieron que la formación del bucle podría ser un mecanismo que facilitaría interacciones entre los FTs y el resto de la maquinaria transcripcional. Queda por comprender el efecto de modulación negativa encontrado con CREB. En la línea celular aquí usada, si bien tiene RAdS (α y β) [196], en presencia o ausencia de NE se encontró un efecto de modulación negativo de CREB solo y en combinación con NeuroD1 y E47 sobre el promotor del gen *Aanat* (Figura 42). Una posible hipótesis explicativa puede ser la falta de activación del mismo. Según lo documentado en la literatura, la fosforilación de CREB en el residuo Ser¹³³ es un evento esencial para inducir la transcripción del gen *Aanat* [108, 111]. Es posible que la unión entre los FTs y las secuencias blanco requiera de otras moléculas accesorias para formar el complejo transcripcional o que la misma sea transitoria. En el caso de que la interacción sea momentánea existe la posibilidad de que la estimulación con NE por 3 h que se utilizó en estos ensayos escape de la ventana temporal en la que se visualizaría la potencial activación sinérgica entre NeuroD1 y CREB sobre el promotor del gen *Aanat*.

En conclusión, en los ensayos de luciferasa se encontró que existe un efecto, en general, modulador positivo de NeuroD1 sobre los genes *Aanat* e *Ins* en el sistema de trabajo elegido y una posible interacción con CREB. Lo encontrado sugiere que deberían realizarse estudios complementarios que permitan lograr un mejor entendimiento de la regulación de NeuroD1 y CREB sobre secuencias específicas. Evidencia que contribuye a lo dicho es, por ejemplo, que los transcritos del gen *Aanat* se mostraron disminuidos en el modelo de ratón KO global para NeuroD1 [89].

El análisis transcripcional de las enzimas participantes de la vía de síntesis de la melatonina permitió identificar la maquinaria biosintética en nuestro modelo de trabajo (Figuras 4 y 44). En el caso de AANAT, su transcripto se halló únicamente en la fase de oscuridad (ZT18). Esto fue coincidente con lo mostrado por otros autores para la GP de rata [76, 114, 120]. Los transcritos de Tph1 (triptófano hidroxilasa) e HIOMT, en cambio, se encontraron a ZT6 y ZT18, presentando diferencias sutiles en su expresión temporal. Asimismo se examinaron otras moléculas, en la GP, que son conocidas por su participación en la vía de señalización de *Ins* en el páncreas endocrino. Este análisis se realizó considerando a los genes que serían potencialmente modulados por NeuroD1 en la GP según nuevas investigaciones [155], y que no habían sido considerados en el estudio original [89]. Los transcritos de *Ins* (insulina), *Iapp* (del inglés, *Isllet amyloid polypeptide*), *Cpe* (del inglés, *Carboxypeptidase E*) y del *Insr* (del inglés, *Insulin receptor*) se identificaron en la GP de rata, por hibridación *in situ* radiactiva (HIS). Mediante esta técnica se pudo, además, revelar que no habría variaciones en la expresión de los genes *Cpe* e *Insr* entre las fases de luz (ZT6) y oscuridad (ZT18) en GP, Ce e Hi (Figura 45). Además, se determinó la expresión de *Ins* y *Cpe* en GP mediante RT-PCR, sin cambios aparentes entre día y noche (Figura 46). La técnica *Real Time* PCR nos permitió cuantificar la abundancia del transcripto de *Ins* en GP, Ce (cerebelo) y células Min 6 a ZT6 (Figura 47). Las células Min 6, productoras de insulina, revelaron, obviamente, la mayor expresión del transcripto, seguidas por GP y luego Ce.

La vía tradicional de entrada de *Ins* al SNC indica que la hormona producida en los IL del páncreas puede entrar en las regiones circunventriculares, que carecen de una barrera hematoencefálica, y puede atravesar la barrera

hematoencefálica, mediante transporte activo mediado por receptores [158, 214]. En el cerebro participa en la regulación del metabolismo glucídico, el rendimiento cognitivo y reducción de la ingesta de alimentos [158]. Por contraste, la producción local de Ins en el SNC continúa siendo un interrogante, y ahora también lo es en la GP. La identificación de Ins e IAPP (péptido liberado junto con Ins) señalada por Hanoudi y cols., en ratones [155] y mostrada en esta tesis en rata, nos invita a pensar posibles funciones para estas moléculas en la homeostasis de la GP y la posibilidad de que sean sintetizadas *de novo* en la glándula y en otros sitios del SNC inmunoreactivos para NeuroD1, al igual que las células β pancreáticas. Algunos trabajos han señalado que la Ins se produce no solo en el páncreas de los mamíferos, sino también en células neuronales adultas. Uno de ellos indicó la presencia del transcripto en neuronas de conejos y la secreción extracelular del péptido [163]. Mientras que otro demostró que existen subpoblaciones de neuronas del hipocampo y bulbo olfatorio de rata que expresan Ins. El proceso, en este último caso, requeriría de la activación del factor de transcripción NeuroD1 a través de la señalización Wnt3 (del inglés, *Wingless type MMTV integration site family, member 3*) [164]. Existen también evidencias que indican que células gliales de la corteza cerebral de rata expresan Ins [165]. La presencia del Insr ha sido descrita anteriormente en el cerebro [159-161, 197, 214] y aunque, en este trabajo de tesis se esperaba encontrarlo con una mayor distribución en el SNC, lo interesante fue que pudo constatar su expresión en la GP en nuestro modelo de estudio. Como se mencionó anteriormente, (ver Introducción, Páginas 35) existe un delicado diálogo entre la GP y el páncreas, mediado por Ins y melatonina, respectivamente. Por ejemplo, se han documentado niveles disminuidos de melatonina en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) [215] y el ARNm del Insr se ha encontrado disminuido en la GP de ratas diabéticas Goto Kakizaki [185]. Esto podría implicar una interrelación funcional entre Ins y melatonina de la que aún queda mucho por comprender.

Respecto a la Cpe (del inglés, *Carboxypeptidase E*), que fue encontrada abundantemente en la GP y otros sitios del cerebro (Figura 45), ésta funciona en la biosíntesis de un gran número de neuropéptidos en el SNC. La Cpe se encuentra en el cerebro y en todo el sistema neuroendocrino. Dentro de las

células, esta enzima está presente en los gránulos secretores junto con sus sustratos y productos peptídicos. La enzima actúa como una exopeptidasa y entre sus productos se encuentran a la Ins, las encefalinas, la vasopresina, la oxitocina, y la mayoría de las hormonas neuroendocrinas y neuropéptidos [216]. En la GP, sin embargo, su rol no sería claro. En conjunto, lo encontrado apoyaría en parte lo sugerido por Hanoudi y cols. [155] quienes reanalizaron el transcriptoma de la GP de ratones KO y KO condicional para NeuroD1 [89, 92], y propusieron que regula genes de la vía insulínica *Ins1*, *Ins2*, *lapp* y *Gck* (del inglés, *Glucokinase*). Según nuestros resultados se pudo concluir que los genes *Ins*, *Insr*, *lapp* y *Cpe* serían expresados en la GP, mientras que no pudimos confirmar la expresión del gen *Gck*. Queda aún mucho por entender, ya que la presencia de estas moléculas en la GP podría implicar funciones que aún no han sido dilucidadas. Las implicancias para la salud de la Ins son variadas, por ejemplo, se sabe que los niveles de Ins en el cerebro se encuentran alterados en el envejecimiento, la obesidad, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer [217, 218]. En cuanto a la importancia de la Ins en la GP de roedores, estudios mostraron que en cultivos de GPs enteras estimulados con NE, dicha hormona influye en la síntesis de melatonina y se sugirió que este aumento estaría vinculado con un incremento en la actividad de TPH1 y/o AANAT a través de mecanismos postranscripcionales. Uno de ellos, según los autores podría ser a través de la formación del complejo 14-3-3/pAANAT [157, 186].

Como se mencionó anteriormente, la participación de NeuroD1 es esencial para la activación del gen de Ins en el páncreas [135, 141, 144]. Por el contrario, la relación NeuroD1 y gen *Ins* en GP es aún desconocida. Este trabajo demostró que el mensajero de la Ins se encontraría presente en la GP, por ello se decidió además indagar sobre la presencia de la proteína. Como primera medida, se realizó el análisis de las proteínas Ins, NeuroD1 y Pax6 en el páncreas, para caracterizar la distribución espacial y disponibilidad de las mismas en un órgano especializado en la producción de Ins. Los resultados obtenidos mediante la técnica de IHQ seguida de microscopía confocal, mostraron la presencia y distribución espacial de las tres proteínas en los IL del páncreas a ZT6 (Figuras 48 y 49). Ins se identificó en el citoplasma de las células β , como un patrón de distribución granular, mientras que NeuroD1 y Pax6 están presentes en los

núcleos celulares, como un puntillado muy fino y uniforme. El uso de Pax6 deriva de conocer que este FT cumple funciones críticas en la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario [90, 203, 219, 220]. Los miembros de la familia de genes *Pax* también son importantes para mantener la función normal de ciertas células después del nacimiento [130, 200, 202, 203, 221]. Pax6 es un FT esencial para el funcionamiento de las células de los islotes pancreáticos [199, 201-203], y nuestro grupo lo ha identificado a lo largo de la ontogenia de la GP, incluso en una subpoblación de células intersticiales de la GP adulta de rata susceptibles a la regulación por parte de la microglía local [69, 70, 75]. El análisis de NeuroD1 permitió estudiar y comparar su comportamiento en el páncreas con lo que ocurre en la GP, otro órgano de naturaleza endócrina. Luego se procedió a buscar a Ins en la GP, se ensayaron diferentes condiciones sin lograr la identificación de la proteína. Los resultados negativos se podrían atribuir a que los niveles de la proteína se encontrarían por debajo del límite de detección de la microscopia confocal, que la Ins se sintetiza en la GP pero que la abandone rápidamente, que la velocidad de síntesis y secreción sea altamente dependiente de los niveles de glucosa local y no del ciclo L:O, o que el gen se transcriba pero no se traduzca en proteína, entre otros.

En resumen, el desarrollo de esta tesis pretendió aportar al conocimiento básico de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de fenotipos endócrinos, específicamente aquellos relacionados a la producción de melatonina e Ins en la glándula pineal (GP) y utilizando páncreas como órgano control. A través del análisis del transcriptoma y del proteoma de la pineal se describió el comportamiento de los FTs NeuroD1 y CREB y su influencia sobre genes blanco específicos. Según los objetivos planteados (ver Introducción, página 37) podemos afirmar que los FTs mencionados están presentes en la GP y que participarían de la modulación de genes blanco específicos como el de *Aanat* e *Ins*, por lo deberíamos confirmar lo encontrado en cultivos de pinealocitos primarios o *in vivo*.

Además se pudo identificar genes potencialmente blanco para NeuroD1 como el de *Ins* e *Iapp*, y otros que son participes de la vía de señalización de *Ins*, *Insr* y *Cpe* en la GP. Esperamos que lo obtenido sea aplicado al campo de la salud como lo son el estudio de enfermedades neurodegenerativas, como el

Alzheimer, y metabólicas como la diabetes, ambas relacionadas al envejecimiento.

Conclusiones

Las conclusiones aquí presentadas derivan del análisis de los resultados obtenidos luego del desarrollo de ésta tesis doctoral y, resumen los principales hallazgos encontrados:

1. La abundancia del transcripto y la proteína NeuroD1 no muestra variaciones diarias en la GP. La proteína total se encontró durante las fases de luz (ZT6) y oscuridad (ZT14 y ZT18), sin diferencias en cuanto a su abundancia en los ZTs analizados. El transcripto no presentó variaciones aparentes durante el día (ZT6) y la noche (ZT18).
2. La abundancia de la proteína CREB no presentó variaciones diarias en la GP. La proteína total se puede identificar durante el día (ZT6) y la noche (ZT14 y ZT18), sin diferencia en los ZTs analizados.
3. CREB presentó un patrón de distribución espacial diferencial entre las poblaciones celulares que conforman la GP. La marca del FT se presentó como grumos discretos, de tamaño y distribución variable en los núcleos de los pinealocitos, células glutamatérgicas de la GP. En cambio, la marca de CREB se visualizó como un puntillado fino y de distribución homogénea en los núcleos de las células intersticiales: astrocitos, microglía y endoteliales.
4. Los pinealocitos constituyeron la única población celular donde se evidenciaron diferencias en la disposición espacial de CREB a través del ciclo L:O, con la metodología aquí aplicada. El FT se presentó en los núcleos durante los diferentes momentos del día (ZT6 y ZT10) y de la noche (ZT14 y ZT18) estudiados. La mayoría de las células pinealocíticas mostró mayor dispersión espacial del FT durante la fase nocturna (ZT14 y ZT18).
5. CREB mostró heterogeneidad en cuanto a su dispersión espacial en los núcleos de los pinealocitos, aún dentro de un mismo ZT.
6. La disrupción simpática mediante GCSx aumentó la distribución espacial de CREB en los pinealocitos durante la noche (ZT14). Se observó un aumento en la distribución espacial de la proteína en el grupo GCSx con respecto al control y FO.

7. CREB se presentó como un puntillado homogéneo y fino en núcleos de células granulares glutamatérgicas, y en forma de grumos de tamaño y distribución variable en células de Purkinje GABAérgicas de la corteza cerebelar.
8. Los patrones de distribución espacial de CREB en GP y Ce serían dependientes del linaje celular e independientes de los transmisores liberados.
9. La GP se encontró transcripcionalmente activa durante el día y la noche. La enzima ARN polimerasa II fosforilada (pPOLII) estuvo presente en los núcleos de todas las poblaciones celulares que conforman la GP en forma de un puntillado fino durante los ZTs analizados (ZT6 y ZT14).
10. NeuroD1 y CREB fueron capaces de interaccionar entre sí durante la fase de luz (ZT6), tanto en GP y como en Ce. La interacción podría ser directa o indirecta.
11. En una línea celular no pinealocítica, NeuroD1 moduló positivamente al promotor del gen *Aanat*. NeuroD1 o la combinación NeuroD1+E47 promoverían la expresión de AANAT en condición basal y bajo el efecto de NE. En el caso de CREB, solo o en las combinaciones NeuroD1+CREB y NeuroD1+CREB+E47, tuvo un efecto modulador negativo sobre el promotor del gen *Aanat*, y el tratamiento con NE no produciría la activación del promotor por parte de CREB como ocurriría en la GP.
12. En una línea celular no pancreática, NeuroD1 o la combinación NeuroD1+E47+Pdx1 modularon positivamente al promotor del gen de *Ins*.
13. La expresión del gen *Aanat* se evidenció únicamente durante la noche (ZT18), mientras que las enzimas Tph1 e HIOMT mostraron diferencias sutiles en su expresión durante el día (ZT6) y la noche (ZT18) en la GP de rata.
14. Utilizando HIS radiactiva, los transcritos de los componentes de la vía de señalización de *Ins*, *Cpe*, *Insr* e *Ins1*, se expresaron durante el día y la noche, sin variaciones diarias en la GP. El transcrito del *Insr* se encontró además en cerebelo e hipocampo, sin diferencias diarias. Mientras que

con el uso de *Real Time* PCR, el transcripto de *Ins1* se encontró presente en GP, Ce y células Min 6 a ZT6. La GP mostró valores mayores para los niveles del transcripto en comparación con cerebelo.

15. Las proteínas *Ins*, *Pax6* y *NeuroD1* se encontraron en los islotes pancreáticos de Langerhans, específicamente en las células β , a ZT6. *Ins* se encontró en el citoplasma de las células β , con un patrón de distribución granular, mientras que *NeuroD1* y *Pax6* mostró una localización nuclear, como un puntillado muy fino y uniforme.
16. No se identificó a la proteína *Ins* en la GP.

PROYECCIONES FUTURAS

A modo de proyección, a continuación se proponen diversas estrategias para comprender y profundizar lo expuesto en esta tesis. Se espera que estos lineamientos contribuyan al entendimiento de diversos aspectos de la biología circadiana, en general, y en particular de la GP y otros órganos endocrinos. Se incluyen propuestas que nos permitirán ahondar sobre el rol de NeuroD1, CREB y moléculas de la vía de señalización de Ins en el SNC, entre otros.

1. Investigar la dinámica espaciotemporal de CREB a lo largo de la ontogenia de la GP, a fin de identificar el estadio en el cual el FT adquiere un dinamismo espaciotemporal diferencial solo en el linaje pinealocito con respecto a otros tipos celulares originados a partir de precursores comunes.
2. Implementar el uso de marcadores de cromatina. Por ejemplo, la utilización de H3K4me3, marcador de eucromatina, y H3K9me3 y/o H4K20me3, marcadores de heterocromatina. Estos junto con CREB, permitirán investigar la relación entre el estado de la cromatina y la actividad transcripcional de CREB.
3. Analizar la abundancia y dinámica espaciotemporal de la forma fosforilada de CREB en Ser¹³³ en la GP postnatal, es decir cuando se vuelve capaz a ser regulada por la inervación simpática proveniente de los GCS.
4. Indagar la dinámica de CREB en modelos de injuria quirúrgica sin degeneración Walleriana (GCSd) y farmacológica: administración de LPS y el uso de antagonistas de los receptores adrenérgicos (α 1 y β 1).
5. Investigar la interacción entre NeuroD1 y CREB en la GP en la fase de oscuridad (ZT14 y ZT18).
6. Estudiar de la interacción NeuroD1/CREB con secuencias específicas mediante el ensayo de la luciferasa en diferentes condiciones usando líneas celulares más cercanas a los pinealocitos o cultivo de pinealocitos primarios.
7. Continuar con el análisis de la expresión diaria y/o en relación al metabolismo de glucosa de las moléculas participantes de la vía de señalización de la Ins en la GP y el SNC.

8. Profundizar el análisis de las vías intracelulares de señalización que controlan las modificaciones de NeuroD1, en particular, las quinasas y fosfatasas, que intervienen en los procesos de fosforilación y desfosforilación de dicho FT.
9. Mediante estudios comparativos entre retina y GP, evaluar el valor ontogenético y evolutivo de CREB y/o NeuroD1 en la definición y mantenimiento de linajes celulares específicos.
10. Evaluar el impacto de CREB y NeuroD1 sobre la fisiología pineal en modelos de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, y metabólicas, como la diabetes que se presentan durante el envejecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. de Mairan, J.d., *Observation botanique*. Histoire de l'Académie Royale des Sciences Paris, 1729.
2. Roenneberg, T. and M. Merrow, *The Circadian Clock and Human Health*. *Curr Biol*, 2016. **26**(10): p. R432-43.
3. Asher, G. and P. Sassone-Corsi, *Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock*. *Cell*, 2015. **161**(1): p. 84-92.
4. Fedele, M., et al., *alterations in Metabolism and Diurnal rhythms following Bilateral surgical removal of the superior cervical ganglia in rats*. *Frontiers in endocrinology*, 2018. **8**: p. 370.
5. Paschos, G.K. and G.A. FitzGerald, *Circadian clocks and metabolism: implications for microbiome and aging*. *Trends in Genetics*, 2017. **33**(10): p. 760-769.
6. Albrecht, U. and J.A. Ripperger, *Circadian Clocks and Sleep: Impact of Rhythmic Metabolism and Waste Clearance on the Brain*. *Trends in neurosciences*, 2018. **41**(10): p. 677-688.
7. Karasek, M., *Melatonin, human aging, and age-related diseases*. *Experimental gerontology*, 2004. **39**(11-12): p. 1723-1729.
8. Wu, Y.H. and D.F. Swaab, *The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease*. *Journal of pineal research*, 2005. **38**(3): p. 145-152.
9. Takahashi, J.S., et al., *The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease*. *Nature Reviews Genetics*, 2008. **9**(10): p. 764.
10. Tengattini, S., et al., *Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin*. *Journal of pineal research*, 2008. **44**(1): p. 16-25.
11. Blask, D.E., *Melatonin, sleep disturbance and cancer risk*. *Sleep medicine reviews*, 2009. **13**(4): p. 257-264.
12. Reiter, R.J., D.-X. Tan, and A. Korkmaz, *The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension*. *Journal of Hypertension*, 2009. **27**: p. S17-S20.
13. Scheer, F.A., et al., *Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(11): p. 4453-4458.
14. Wulff, K., et al., *Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010. **11**(8): p. 589.
15. Saini, C., et al., *A functional circadian clock is required for proper insulin secretion by human pancreatic islet cells*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2016. **18**(4): p. 355-365.
16. Takahashi, J.S., *Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock*. *Nature Reviews Genetics*, 2017. **18**(3): p. 164.
17. Pilonis, V., C. Helfrich-Förster, and H. Oster, *The role of the circadian clock system in physiology*. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2018: p. 1-13.
18. Klein, D.C., Moore, R. Y., Reppert, M., *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. 1991, New York: Oxford University Press.
19. Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht, *The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks*. *Annual review of physiology*, 2010. **72**: p. 517-549.

20. Mohawk, J.A., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Central and peripheral circadian clocks in mammals*. Annual review of neuroscience, 2012. **35**: p. 445-462.
21. Albrecht, U., *Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks*. Neuron, 2012. **74**(2): p. 246-260.
22. Schibler, U., et al., *Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2015. **80**: p. 223-32.
23. Maronde, E. and J.H. Stehle, *The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets*. Trends Endocrinol Metab, 2007. **18**(4): p. 142-9.
24. Korf, H.W., C. Schomerus, and J.H. Stehle, *The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 1998. **146**: p. 1-100.
25. Klein, D.C., *The 2004 Aschoff/Pittendrigh lecture: Theory of the origin of the pineal gland--a tale of conflict and resolution*. J Biol Rhythms, 2004. **19**(4): p. 264-79.
26. Guido, M.E., et al., *Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system*. Prog Neurobiol, 2010. **92**(4): p. 484-504.
27. Klein, D.C., *Photoneural regulation of the mammalian pineal gland*. Photoperiodism, melatonin and the pineal, 1985. **117**: p. 38-56.
28. von Schantz, M., I. Provencio, and R.G. Foster, *Recent developments in circadian photoreception: more than meets the eye*. Investigative ophthalmology & visual science, 2000. **41**(7): p. 1605-1607.
29. Berson, D.M., F.A. Dunn, and M. Takao, *Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1070-1073.
30. Ganguly, S., S.L. Coon, and D.C. Klein, *Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation*. Cell and tissue research, 2002. **309**(1): p. 127-137.
31. Simonneaux, V. and C. Ribelayga, *Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(2): p. 325-95.
32. Klein, D.C., et al., *Pineal function: impact of microarray analysis*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(2): p. 170-83.
33. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 935-41.
34. Webb, A.B., et al., *Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(38): p. 16493-16498.
35. Buhr, E.D. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the Mammalian circadian clock*, in *Circadian clocks*. 2013, Springer. p. 3-27.
36. Reddy, P., et al., *Molecular analysis of the period locus in Drosophila melanogaster and identification of a transcript involved in biological rhythms*. Cell, 1984. **38**(3): p. 701-710.
37. Rosbash, M. and J.C. Hall, *The molecular biology of circadian rhythms*. Neuron, 1989. **3**(4): p. 387-398.

38. Hardin, P.E., J.C. Hall, and M. Rosbash, *Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels*. Nature, 1990. **343**(6258): p. 536.
39. Sehgal, A., J. Price, and M.W. Young, *Ontogeny of a biological clock in Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(4): p. 1423-1427.
40. Hardin, P.E., *The circadian timekeeping system of Drosophila*. Current Biology, 2005. **15**(17): p. R714-R722.
41. Price, J.L., et al., *double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation*. Cell, 1998. **94**(1): p. 83-95.
42. Shearman, L.P., et al., *Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1013-9.
43. Okamura, H., S. Yamaguchi, and K. Yagita, *Molecular machinery of the circadian clock in mammals*. Cell and tissue research, 2002. **309**(1): p. 47-56.
44. Gekakis, N., et al., *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1564-1569.
45. Sangoram, A.M., et al., *Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription*. Neuron, 1998. **21**(5): p. 1101-1113.
46. Steeves, T.D., et al., *Molecular Cloning and Characterization of the HumanCLOCKGene: Expression in the Suprachiasmatic Nuclei*. Genomics, 1999. **57**(2): p. 189-200.
47. Ko, C.H. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the mammalian circadian clock*. Human molecular genetics, 2006. **15**(suppl_2): p. R271-R277.
48. Jones, S., *An overview of the basic helix-loop-helix proteins*. Genome biology, 2004. **5**(6): p. 226.
49. Hida, A., et al., *The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription*. Genomics, 2000. **65**(3): p. 224-233.
50. Muñoz, E., M. Brewer, and R. Baler, *Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36009-17.
51. Muñoz, E. and R. Baler, *The circadian E-box: when perfect is not good enough*. Chronobiol Int, 2003. **20**(3): p. 371-88.
52. Muñoz, E., M. Brewer, and R. Baler, *Modulation of BMAL/CLOCK/E-Box complex activity by a CT-rich cis-acting element*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **252**(1-2): p. 74-81.
53. Van Der Horst, G.T., et al., *Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms*. Nature, 1999. **398**(6728): p. 627.
54. Yu, W., M. Nomura, and M. Ikeda, *Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **290**(3): p. 933-941.
55. Sato, T.K., et al., *Feedback repression is required for mammalian circadian clock function*. Nature genetics, 2006. **38**(3): p. 312.
56. Mermet, J., J. Yeung, and F. Naef, *Systems chronobiology: global analysis of gene regulation in a 24-hour periodic world*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2017. **9**(3): p. a028720.

57. Koike, N., et al., *Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals*. Science, 2012. **338**(6105): p. 349-54.
58. Aryal, R.P., et al., *Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock*. Molecular cell, 2017. **67**(5): p. 770-782. e6.
59. Minegishi, S., et al., *Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 11996.
60. Cipolla-Neto, J. and F.G. do Amaral, *Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights*. Endocrine reviews, 2018.
61. Reiter, R.J., *Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions*. Endocrine reviews, 1991. **12**(2): p. 151-180.
62. Møller, M. and F.M. Baeres, *The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland*. Cell and tissue research, 2002. **309**(1): p. 139-150.
63. Black, E.A., N.M. Cancelliere, and A.V. Ferguson, *Regulation of Nervous System Function by Circumventricular Organs*, in *Neuroimmune Pharmacology*. 2017, Springer. p. 25-37.
64. Duvernoy, H.M. and P.-Y. Risold, *The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization*. Brain research reviews, 2007. **56**(1): p. 119-147.
65. Kiecker, C., *The origins of the circumventricular organs*. Journal of anatomy, 2018.
66. McKinley, M.J., *The sensory circumventricular organs of the mammalian brain: subfornical organ, OVLT and area postrema*. Vol. 172. 2003: Springer Science & Business Media.
67. Calvo, J. and J. Boya, *Ultrastructure of the pineal gland in the adult rat*. Journal of anatomy, 1984. **138**(Pt 3): p. 405.
68. Pevet, P., *On the presence of different populations of pinealocytes in the mammalian pineal gland*. Journal of neural transmission, 1977. **40**(4): p. 289-304.
69. Ibañez, M.P., *Bases celulares de la ontogenia de la glándula pineal: rol emergente de la microglía como determinante de fenotipo*, in *Tesis de doctorado en ciencias biológicas*. 2016.
70. Rodríguez, M.P.I., S.C. Noctor, and E.M. Muñoz, *Cellular basis of pineal gland development: emerging role of microglia as phenotype regulator*. PloS one, 2016. **11**(11): p. e0167063.
71. Castro, A.E., *Caracterización del factor de transcripción NeuroD1 en la ontogenia de la glándula pineal de rata*. 2014.
72. Castro, A.E., et al., *Expression and cellular localization of the transcription factor NeuroD1 in the developing and adult rat pineal gland*. J Pineal Res, 2015. **58**(4): p. 439-51.
73. Rath, M.F., et al., *Melatonin synthesis: Acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT) is strongly expressed in a subpopulation of pinealocytes in the male rat pineal gland*. Endocrinology, 2016: p. en20151888.
74. Yu, H., et al., *GABAergic signaling in the rat pineal gland*. J Pineal Res, 2016. **61**(1): p. 69-81.
75. Farias Altamirano, L.E., et al., *Signaling within the pineal gland: A parallelism with the central nervous system*. Semin Cell Dev Biol, 2018.

76. Mays, J.C., et al., *Single-cell RNA sequencing of the mammalian pineal gland identifies two pinealocyte subtypes and cell type-specific daily patterns of gene expression*. PLOS ONE, 2018. **13**(10): p. e0205883.
77. Klein, D.C., *Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme"*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4233-7.
78. Nakagomi, T. and T. Matsuyama, *Leptomeninges: a novel stem cell niche with neurogenic potential*. Stem cell investigation, 2017. **4**.
79. Bifari, F., et al., *Novel stem/progenitor cells with neuronal differentiation potential reside in the leptomeningeal niche*. Journal of cellular and molecular medicine, 2009. **13**(9b): p. 3195-3208.
80. Villela, D., et al., *Modulation of pineal melatonin synthesis by glutamate involves paracrine interactions between pinealocytes and astrocytes through NF-B activation*. BioMed research international, 2013. **2013**.
81. da Silveira Cruz-Machado, S., et al., *Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF)*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40142.
82. Muñoz, E., *Microglia-precursor cell interactions in health and in pathology*. BIOCELL, 2018. **42**: p. 41-45.
83. Ibañez Rodriguez, M.P., et al., *Differential response of pineal microglia to surgical versus pharmacological stimuli*. Journal of Comparative Neurology, 2018.
84. Nishida, A., et al., *Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development*. Nat Neurosci, 2003. **6**(12): p. 1255-63.
85. Karolczak, M., H.-W. Korf, and J.H. Stehle, *The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland*. Endocrine, 2005. **27**(2): p. 89-100.
86. Maronde, E., et al., *Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (Mesocricetus auratus) adapts to prevailing photoperiod*. J Pineal Res, 2007. **43**(1): p. 16-24.
87. Rath, M.F., et al., *Homeobox genes in the rodent pineal gland: roles in development and phenotype maintenance*. Neurochem Res, 2013. **38**(6): p. 1100-12.
88. Yamazaki, F., et al., *The Lhx9 homeobox gene controls pineal gland development and prevents postnatal hydrocephalus*. Brain Structure and Function, 2015. **220**(3): p. 1497-1509.
89. Muñoz, E.M., et al., *NeuroD1: developmental expression and regulated genes in the rodent pineal gland*. J Neurochem, 2007. **102**(3): p. 887-99.
90. Mitchell, T.N., et al., *Polymicrogyria and absence of pineal gland due to PAX6 mutation*. Ann Neurol, 2003. **53**(5): p. 658-63.
91. Rath, M.F., et al., *Expression of the Otx2 homeobox gene in the developing mammalian brain: embryonic and adult expression in the pineal gland*. J Neurochem, 2006. **97**(2): p. 556-66.
92. Ochocinska, M.J., et al., *NeuroD1 is required for survival of photoreceptors but not pinealocytes: results from targeted gene deletion studies*. J Neurochem, 2012. **123**(1): p. 44-59.
93. Jan, J.E., H. Espezel, and R. Appleion, *The treatment of sleep disorders with melatonin*. Developmental Medicine & Child Neurology, 1994. **36**(2): p. 97-107.
94. Wyatt, J.K., et al., *Circadian temperature and melatonin rhythms, sleep, and neurobehavioral function in humans living on a 20-h day*. American

- Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 1999. **277**(4): p. R1152-R1163.
95. Grossman, E., et al., *Melatonin reduces night blood pressure in patients with nocturnal hypertension*. The American journal of medicine, 2006. **119**(10): p. 898-902.
 96. Reiter, R.J., D.X. Tan, and A. Galano, *Melatonin: exceeding expectations*. Physiology, 2014. **29**(5): p. 325-333.
 97. Cipolla-Neto, J., et al., *Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review*. Journal of pineal research, 2014. **56**(4): p. 371-381.
 98. McHill, A.W., et al., *Later circadian timing of food intake is associated with increased body fat*. The American journal of clinical nutrition, 2017. **106**(5): p. 1213-1219.
 99. Reiter, R.J., et al., *Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers*. Journal of pineal research, 2016. **61**(3): p. 253-278.
 100. Ribelayga, C., et al., *Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis*. Journal of biological rhythms, 1999. **14**(2): p. 105-115.
 101. Roseboom, P.H., et al., *Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland*. Endocrinology, 1996. **137**(7): p. 3033-45.
 102. Roseboom, P.H., et al., *Natural melatonin knockdown in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase1*. Molecular Brain Research, 1998. **63**(1): p. 189-197.
 103. Ganguly, S. and D.C. Klein, *The Timezyme and Melatonin: Essential Elements of Vertebrate Timekeeping*, in *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour*. 2017, Springer. p. 503-520.
 104. Baler, R., S. Covington, and D.C. Klein, *The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 6979-85.
 105. Shaywitz, A.J. and M.E. Greenberg, *CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 821-61.
 106. Schumacher, M.A., R.H. Goodman, and R.G. Brennan, *The crystal structure of a CREB bZIP-SSCRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding*. Journal of Biological Chemistry, 2000.
 107. Maronde, E., et al., *Control of CREB phosphorylation and its role for induction of melatonin synthesis in rat pinealocytes*. Biology of the Cell, 1997. **89**(8): p. 505-511.
 108. Maronde, E., et al., *Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis*. J Neurosci, 1999. **19**(9): p. 3326-36.
 109. Koch, M., et al., *Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland*. J Neurochem, 2003. **85**(1): p. 170-9.
 110. Roseboom, P.H. and D.C. Klein, *Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary*

- role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol*, 1995. **47**(3): p. 439-49.
111. Maronde, E., et al., *CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II*. *J Pineal Res*, 1999. **27**(3): p. 170-82.
 112. Tamotsu, S., et al., *Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study*. *Cell and tissue research*, 1995. **282**(2): p. 219-226.
 113. Rodriguez, I.R., et al., *Structural analysis of the human hydroxyindole-O-methyltransferase gene. Presence of two distinct promoters*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(50): p. 31969-31977.
 114. Bailey, M.J., et al., *Night/day changes in pineal expression of >600 genes: central role of adrenergic/cAMP signaling*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(12): p. 7606-22.
 115. Pfeffer, M., et al., *Rhythmic variation in beta1-adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation*. *Eur J Neurosci*, 1998. **10**(9): p. 2896-904.
 116. Stehle, J.H., et al., *Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms*. *Journal of Biological Rhythms*, 2001. **16**(4): p. 312-325.
 117. Stehle, J.H., et al., *Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland*. *Nature*, 1993. **365**(6444): p. 314.
 118. Foulkes, N.S., D. Whitmore, and P. Sassone-Corsi, *Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis*. *Biology of the Cell*, 1997. **89**(8): p. 487-494.
 119. Pfeffer, M., et al., *Antisense experiments reveal molecular details on mechanisms of ICER suppressing cAMP-inducible genes in rat pinealocytes*. *Journal of pineal research*, 2000. **29**(1): p. 24-33.
 120. Hartley, S.W., et al., *Neurotranscriptomics: The Effects of Neonatal Stimulus Deprivation on the Rat Pineal Transcriptome*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0137548.
 121. Lonze, B.E. and D.D. Ginty, *Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system*. *Neuron*, 2002. **35**(4): p. 605-23.
 122. Sugo, N., et al., *Single-molecule imaging reveals dynamics of CREB transcription factor bound to its target sequence*. *Scientific reports*, 2015. **5**: p. 10662.
 123. Kitagawa, H., et al., *Activity-dependent dynamics of the transcription factor of cAMP-response element binding protein in cortical neurons revealed by single-molecule imaging*. *Journal of Neuroscience*, 2017. **37**(1): p. 1-10.
 124. Sakamoto, K., K. Karelina, and K. Obrietan, *CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection*. *J Neurochem*, 2011. **116**(1): p. 1-9.
 125. Xiao, X., et al., *The cAMP responsive element-binding (CREB)-1 gene increases risk of major psychiatric disorders*. *Molecular psychiatry*, 2017.
 126. Dalle, S., et al., *Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic β -cells*. *Current molecular pharmacology*, 2011. **4**(3): p. 187-195.

127. Inada, A., et al., *The cyclic AMP response element modulator family regulates the insulin gene transcription by interacting with transcription factor IID*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(30): p. 21095-21103.
128. Jhala, U.S., et al., *cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2*. Genes & development, 2003. **17**(13): p. 1575-1580.
129. Babu, D.A., T.G. Deering, and R.G. Mirmira, *A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis*. Mol Genet Metab, 2007. **92**(1-2): p. 43-55.
130. Bernardo, A.S., C.W. Hay, and K. Docherty, *Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **294**(1-2): p. 1-9.
131. Han, S.I., K. Yasuda, and K. Kataoka, *ATF2 interacts with beta-cell-enriched transcription factors, MafA, Pdx1, and beta2, and activates insulin gene transcription*. J Biol Chem, 2011. **286**(12): p. 10449-56.
132. Blanchet, E., et al., *Feedback inhibition of CREB signaling promotes beta cell dysfunction in insulin resistance*. Cell reports, 2015. **10**(7): p. 1149-1157.
133. White, M.F., *Insulin signaling in health and disease*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1710-1711.
134. Rohde, K., M. Moller, and M.F. Rath, *Homeobox genes and melatonin synthesis: regulatory roles of the cone-rod homeobox transcription factor in the rodent pineal gland*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 946075.
135. Naya, F.J., C.M. Stellrecht, and M.J. Tsai, *Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor*. Genes Dev, 1995. **9**(8): p. 1009-19.
136. Lee, J.E., et al., *Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein*. Science, 1995. **268**(5212): p. 836-44.
137. Lee, J.K., et al., *Expression of neuroD/BETA2 in mitotic and postmitotic neuronal cells during the development of nervous system*. Developmental Dynamics, 2000. **217**(4): p. 361-367.
138. Cho, J.H. and M.J. Tsai, *The role of BETA2/NeuroD1 in the development of the nervous system*. Mol Neurobiol, 2004. **30**(1): p. 35-47.
139. Cho, J.-H., W.H. Klein, and M.-J. Tsai, *Compensational regulation of bHLH transcription factors in the postnatal development of BETA2/NeuroD1-null retina*. Mechanisms of development, 2007. **124**(7): p. 543-550.
140. Chae, J.H., G.H. Stein, and J.E. Lee, *NeuroD: the predicted and the surprising*. Mol Cells, 2004. **18**(3): p. 271-88.
141. Chu, K., E. Nemoz-Gaillard, and M.-J. Tsai, *BETA2 and pancreatic islet development*. Recent progress in hormone research, 2001. **56**: p. 23-46.
142. Fedele, V., et al., *Neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is impaired at the level of NeuroD1*. Neuroscience, 2011. **173**: p. 76-81.
143. Orosz, O., et al., *Ophthalmological phenotype associated with homozygous null mutation in the NEUROD1 gene*. Molecular vision, 2015. **21**: p. 124.
144. Naya, F.J., et al., *Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice*. Genes Dev, 1997. **11**(18): p. 2323-34.

145. Ellenberger, T., et al., *Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer*. Genes & development, 1994. **8**(8): p. 970-980.
146. Longo, A., G.P. Guanga, and R.B. Rose, *Crystal structure of E47-NeuroD1/beta2 bHLH domain-DNA complex: heterodimer selectivity and DNA recognition*. Biochemistry, 2008. **47**(1): p. 218-29.
147. Amoutzias, G.D., et al., *Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors*. Trends in biochemical sciences, 2008. **33**(5): p. 220-229.
148. Mehmood, R., et al., *Cross-talk between distinct nuclear import pathways enables efficient nuclear import of E47 in conjunction with its partner transcription factors*. Molecular biology of the cell, 2011. **22**(19): p. 3715-3724.
149. Yokoyama, M., et al., *Molecular cloning of a human neuroD from a neuroblastoma cell line specifically expressed in the fetal brain and adult cerebellum*. Molecular brain research, 1996. **42**(1): p. 135-139.
150. Pataskar, A., et al., *NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program*. EMBO J, 2016. **35**(1): p. 24-45.
151. Guo, Z., et al., *In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model*. Cell stem cell, 2014. **14**(2): p. 188-202.
152. Chen, W., et al., *Lentivirus carrying the NeuroD1 gene promotes the conversion from glial cells into neurons in a spinal cord injury model*. Brain research bulletin, 2017. **135**: p. 143-148.
153. Zhou, Q., et al., *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells*. nature, 2008. **455**(7213): p. 627.
154. Pennesi, M.E., et al., *BETA2/NeuroD1 null mice: a new model for transcription factor-dependent photoreceptor degeneration*. J Neurosci, 2003. **23**(2): p. 453-61.
155. Hanoudi, S., M. Donato, and S. Draghici, *Identifying biologically relevant putative mechanisms in a given phenotype comparison*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0176950.
156. Csajbók, É.A. and G. Tamás, *Cerebral cortex: a target and source of insulin?* Diabetologia, 2016. **59**(8): p. 1609-1615.
157. Garcia, R.A.P., et al., *Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland*. Life sciences, 2008. **82**(1): p. 108-114.
158. Gerozissis, K., *Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies*. European journal of pharmacology, 2008. **585**(1): p. 38-49.
159. Havrankova, J., J. Roth, and M. BROWNSTEIN, *Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat*. Nature, 1978. **272**(5656): p. 827.
160. Marks, J.L., et al., *Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization*. Endocrinology, 1990. **127**(6): p. 3234-3236.
161. Simon, J. and J.C. Joshuashemer, *Insulin Receptors in the Brain*. Neural and Endocrine Peptides and Receptors, 2013: p. 289.
162. Banks, W.A., *The source of cerebral insulin*. European journal of pharmacology, 2004. **490**(1-3): p. 5-12.

163. Devaskar, S.U., et al., *Insulin II gene expression in rat central nervous system*. Regulatory peptides, 1993. **48**(1-2): p. 55-63.
164. Kuwabara, T., et al., *Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb*. EMBO molecular medicine, 2011. **3**(12): p. 742-754.
165. Molnár, G., et al., *GABAergic neurogliaform cells represent local sources of insulin in the cerebral cortex*. Journal of Neuroscience, 2014. **34**(4): p. 1133-1137.
166. Babu, D.A., et al., *Pdx1 and BETA2/NeuroD1 participate in a transcriptional complex that mediates short-range DNA looping at the insulin gene*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8164-72.
167. Glick, E., D. Leshkowitz, and M.D. Walker, *Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(3): p. 2199-2204.
168. Malecki, M.T., et al., *Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus*. Nature genetics, 1999. **23**(3): p. 323.
169. Iwata, I., et al., *Association of polymorphism in the NeuroD/BETA2 gene with type 1 diabetes in the Japanese*. Diabetes, 1999. **48**(2): p. 416-419.
170. Almind, K., A. Doria, and C.R. Kahn, *Putting the genes for type II diabetes on the map*. Nature medicine, 2001. **7**(3): p. 277.
171. Han, X., et al., *Evaluation of variant A45T in NEUROD1/BETA2 for its association with type 2 diabetes mellitus*. Endocrine, 2013. **44**(1): p. 99-106.
172. Bass, J. and J.S. Takahashi, *Circadian integration of metabolism and energetics*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1349-1354.
173. Allaman-Pillet, N., et al., *Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion*. Molecular and cellular endocrinology, 2004. **226**(1-2): p. 59-66.
174. Sadacca, L.A., et al., *An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice*. Diabetologia, 2011. **54**(1): p. 120-124.
175. Shi, S.-q., et al., *Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity*. Current Biology, 2013. **23**(5): p. 372-381.
176. Qian, J. and F.A. Scheer, *Circadian system and glucose metabolism: implications for physiology and disease*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2016. **27**(5): p. 282-293.
177. Peschke, E., *Melatonin, endocrine pancreas and diabetes*. Journal of pineal research, 2008. **44**(1): p. 26-40.
178. Peschke, E. and E. Mühlbauer, *New evidence for a role of melatonin in glucose regulation*. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 2010. **24**(5): p. 829-841.
179. Slominski, R.M., et al., *Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions*. Molecular and cellular endocrinology, 2012. **351**(2): p. 152-166.
180. Zibolka, J., et al., *Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types*. Journal of pineal research, 2018: p. e12480.

181. Peschke, E., I. Bähr, and E. Mühlbauer, *Experimental and clinical aspects of melatonin and clock genes in diabetes*. Journal of pineal research, 2015. **59**(1): p. 1-23.
182. Wolden-Hanson, T., et al., *Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat*. Endocrinology, 2000. **141**(2): p. 487-497.
183. Nishida, S., et al., *Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Δ -5 desaturase activity*. Journal of pineal research, 2002. **32**(1): p. 26-33.
184. Prunet-Marcassus, B., et al., *Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5347-5352.
185. Peschke, E., et al., *Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status*. Journal of pineal research, 2006. **40**(2): p. 135-143.
186. Peliciari-Garcia, R.A., et al., *Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland*. Life sciences, 2010. **87**(5-6): p. 169-174.
187. Savastano, L.E., et al., *A standardized surgical technique for rat superior cervical ganglionectomy*. J Neurosci Methods, 2010. **192**(1): p. 22-33.
188. Smith, P.e., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
189. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
190. Wisden, W. and B.J. Morris, *In situ hybridization protocols for the brain*. Vol. 47. 2002: Gulf Professional Publishing.
191. Sassone-Corsi, P., *Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM*. The international journal of biochemistry & cell biology, 1998. **30**(1): p. 27-38.
192. Vargas, M.E. and B.A. Barres, *Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow?* Annu. Rev. Neurosci., 2007. **30**: p. 153-179.
193. Coleman, M.P. and M.R. Freeman, *Wallerian degeneration, wlds, and nmnat*. Annual review of neuroscience, 2010. **33**: p. 245-267.
194. Bustos, D.M., et al., *Global daily dynamics of the pineal transcriptome*. Cell and tissue research, 2011. **344**(1): p. 1-11.
195. Miyata, T., T. Maeda, and J.E. Lee, *NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus*. Genes & development, 1999. **13**(13): p. 1647-1652.
196. Sumi, Y., et al., *Adrenergic receptor activation involves ATP release and feedback through purinergic receptors*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2010. **299**(5): p. C1118-C1126.
197. Plum, L., M. Schubert, and J.C. Brüning, *The role of insulin receptor signaling in the brain*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2005. **16**(2): p. 59-65.
198. Deltour, L., et al., *Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(2): p. 527-531.

199. Sander, M., et al., *Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development*. *Genes & development*, 1997. **11**(13): p. 1662-1673.
200. Gosmain, Y., et al., *Pax6 controls the expression of critical genes involved in pancreatic α cell differentiation and function*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(43): p. 33381-33393.
201. Hart, A.W., et al., *The developmental regulator Pax6 is essential for maintenance of islet cell function in the adult mouse pancreas*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54173.
202. Rutter, G., R. Mitchell, and D. Hodson, *Pax6 is required for the functional identity of the adult pancreatic beta cell*. 2016.
203. Buckle, A., et al., *Functional characteristics of novel pancreatic Pax6 regulatory elements*. *Human molecular genetics*, 2018. **27**(19): p. 3434-3448.
204. Gary, K.A., S.A. Sands, and B.M. Chronwall, *Glial-like cells of the rat pituitary intermediate lobe change morphology and shift from vimentin to GFAP expression during development*. *International journal of developmental neuroscience*, 1995. **13**(6): p. 555-565.
205. Kirik, O. and D. Korzhhevskii, *Vimentin in ependymal and subventricular proliferative zone cells of rat telencephalon*. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2013. **154**(4): p. 553-557.
206. Sander, M. and M.S. German, *The β cell transcription factors and development of the pancreas*. *Journal of Molecular Medicine*, 1997. **75**(5): p. 327-340.
207. Glaes, A. and R.P. Zinzen, *Putting chromatin in its place: the pioneer factor NeuroD1 modulates chromatin state to drive cell fate decisions*. *EMBO J*, 2016. **35**(1): p. 1-3.
208. Murtaugh, L.C. and D.A. Melton, *Genes, signals, and lineages in pancreas development*. *Annual review of cell and developmental biology*, 2003. **19**(1): p. 71-89.
209. Jensen, J., *Gene regulatory factors in pancreatic development*. *Developmental Dynamics*, 2004. **229**(1): p. 176-200.
210. Moriyama, Y., et al., *Intrinsic glutaminergic system negatively regulates melatonin synthesis in mammalian pineal gland*, in *Melatonin After Four Decades*. 2002, Springer. p. 83-90.
211. Yatsushiro, S., et al., *Ionotropic glutamate receptors trigger microvesicle-mediated exocytosis of l-glutamate in rat pinealocytes*. *Journal of neurochemistry*, 2000. **75**(1): p. 288-297.
212. Yamada, H., et al., *Metabotropic glutamate receptors negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes*. *Journal of Neuroscience*, 1998. **18**(6): p. 2056-2062.
213. Solovei, I., et al., *Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution*. *Cell*, 2009. **137**(2): p. 356-368.
214. Kleinridders, A., et al., *Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function*. *Diabetes*, 2014: p. DB_140568.
215. Tutuncu, N.B., et al., *Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy*. *Journal of pineal research*, 2005. **39**(1): p. 43-49.

216. Fricker, L.D., *Carboxypeptidase E and the Identification of Novel Neuropeptides as Potential Therapeutic Targets*, in *Advances in Pharmacology*. 2018, Elsevier. p. 85-102.
217. Gasparini, L., et al., *Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease?* Trends in Pharmacological Sciences, 2002. **23**(6): p. 288-293.
218. Porte, D., D.G. Baskin, and M.W. Schwartz, *Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from C. elegans to humans*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1264-1276.
219. Abouzeid, H., et al., *PAX6 aniridia and interhemispheric brain anomalies*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 2074-83.
220. Estivill-Torres, G., et al., *The transcription factor Pax6 is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that form the subcommissural organ*. Mech Dev, 2001. **109**(2): p. 215-24.
221. Rath, M.F., et al., *Developmental and diurnal dynamics of Pax4 expression in the mammalian pineal gland: nocturnal down-regulation is mediated by adrenergic-cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 803-11.