



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Tesis Doctoral

**“ESTUDIO DE LOS PATRONES
CIRCADIANOS DE EXPRESIÓN DE
Bdnf/TrkB Y DEL SISTEMA DE
REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE
BASES DEL ADN EN UN MODELO
DE ENVEJECIMIENTO SOMETIDO
A RESTRICCIÓN CALÓRICA”**

Doctorando: Lic. Ivanna Carla Castro Pascual

Directora de Tesis: Dra. Ana Cecilia Anzulovich

Co-Director de Tesis: Dr. Mauricio Martín

Córdoba, Argentina, 2021

A mis padres, hermanas y sobrinos,
y a esos amigos que dibujaron sonrisas y secaron lágrimas de mi rostro.

Filiaciones institucionales del Director y Co-Director:

Directora: Dra. Ana Cecilia Anzulovich, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO) con dependencia de CONICET y Universidad Nacional de San Luis.

Co-Director: Dr. Mauricio Martín, Universidad Nacional de Córdoba e Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

Filiaciones institucionales de los Miembros del Tribunal Evaluador:

Dra Alicia Degano, Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC) y CONICET

Dr. Dante Duero, Facultad de Psicología – Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Juan Chiesa, Laboratorio de Cronobiología – Departamento de Ciencia y Tecnología – Universidad Nacional de Quilmes y CONICET.

Defensa presidida por la Dra. Teresa N. Scimonelli, Directora de la carrera de Doctorado en Neurociencias.

Agradecimientos

Antes de presentar el resultado de este trabajo de investigación, quisiera recordar y agradecer el apoyo y la colaboración de todas aquellas personas hicieron posible concretar esta meta.

A las Instituciones: Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET-UNC; Universidad Nacional de San Luis, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas-San Luis (CONICET-UNSL), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET).

A mi directora, Dra. Ana Cecilia Anzulovich, por ser mi “mamá científica”, la mujer que me inicio en este hermoso camino, abrió las puertas de su laboratorio, confió en mí y me ayudó a transitar este camino, conteniéndome y enseñándome, además de ser el ejemplo de que las mujeres podemos hacer ciencia.

A mí codirector, Dr. Mauricio Martín, por aceptar este rol casi inmediatamente desde el momento que se lo pedí, permitiéndome poder realizar el Doctorado en Neurociencias en la UNC, por sus enriquecedores y constructivos aportes científicos y su excelente predisposición siempre.

Al Laboratorio de Cronobiología, porque es donde hice mis primeros pasos en la investigación científica, donde aprendí, y continúo aprendiendo, sobre cómo cuestionarme, plantear y realizar experimentos, analizar e interpretar resultados, y sobre construir conocimiento en forma colectiva; donde pasé casi la mayor parte de mis días, no sólo trabajando arduamente sino muchas veces disfrutando algo tan simple como un mate amargo; así como a las investigadoras de la línea de investigación de envejecimiento, Dras. Mariana Ferramola y Gabriela Lacoste, por su asesoramiento y seguimiento. A la Dra. Ethelina Cargnelutti por su formación y enseñanza de técnicas de biología molecular.

Al Dr. Matías Melendez, y compañeros del laboratorio del Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular del Hospital de Cáncer Barretos, Sao Paulo, Brasil, por su desinteresada disposición para brindarme la posibilidad de aprender tecnologías de punta de biología molecular, en su laboratorio y así, complementar mi formación como científica.

A la Dra. Gisela Melo, una amiga académica, que me alentó y ayudó a transitar este camino cuando más lo necesité, con la revisión del manuscrito.

A mis padres y hermanas, como sobrinos por su amor, cariño y apoyo.

A Tiago, Angela y Murilio, porque me mostraron una amistad pura y mucho amor y luz, aprendiendo así que el idioma no es una barrera.

A mi querida profe Mary por su acompañamiento y amistad.

A mi gran amigo Andrés por su cariño de siempre, sus apoyos y por ser muchas veces mi cable a tierra.

A todos los que han vivido de cerca este trabajo y supieron acompañarme.

A todos muchas gracias...

ÍNDICE

Agradecimientos.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
Prólogo.....	XI
Acrónimos.....	1
Introducción General.....	7
Las Neurociencias.....	7
1- RITMOS Y RELOJES BIOLÓGICOS.....	8
Ritmos circadianos.....	10
Parámetros circadianos.....	16
Análisis de los ritmos circadianos.....	17
Sistema circadiano en mamíferos.....	18
Maquinaria molecular del reloj circadiano en mamíferos.....	25
Regulación epigenética del reloj circadiano.....	28
Relojes circadianos cerebrales y periféricos en mamíferos.....	29
2- SISTEMAS EUCARIOTAS DE REPARACIÓN DEL ADN NUCLEAR.....	31
Reparación del ADN por escisión de base.....	34
Componentes del Sistema de Reparación por escisión de Bases.....	38
Reparación por escisión de bases y desmetilación activa.....	43
3- ENVEJECIMIENTO.....	46
Teorías del Envejecimiento.....	48
Teorías Evolutivas.....	49
Teorías Moleculares-Celulares.....	50
Teorías Sistémicas.....	54
4- RESTRICCIÓN CALÓRICA.....	56
Restricción Calórica y metabolismo.....	58
5- FUNCIÓN DEL CEREBELO.....	60
El cerebelo y su rol sobre las capacidades cognitivas.....	63
6- LOS RITMOS CIRCADIANOS Y SU RELACIÓN CON ENVEJECIMIENTO, METILACIÓN DEL ADN, BER, RC Y SU EFECTO EN CEREBELO.....	66
Ritmos circadianos y envejecimiento.....	66
Ritmos circadianos y metilación del ADN.....	69

Ritmos circadianos y BER.....	70
Ritmos circadianos y su relación con el cerebelo.....	71
Ritmos circadianos y RC.....	72
7- EL ENVEJECIMIENTO EN CEREBELO Y SU RELACIÓN CON METILACIÓN DEL ADN, EL SISTEMA BER Y LA RESTRICCIÓN CALÓRICA.	75
Envejecimiento y metilación del ADN	75
Envejecimiento y BER.....	77
Envejecimiento y cerebelo	78
Envejecimiento y RC.....	80
8- LA RESTRICCIÓN CALÓRICA, SU EFECTO EN CEREBELO, SOBRE METILACIÓN DEL ADN Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA BER.	81
RC y metilación del ADN	81
RC y BER.....	83
RC y cerebelo	84
Hipótesis y Objetivos.....	87
Objetivo General	87
Hipótesis Central.....	87
Objetivos Específicos	88
Materiales y Métodos.....	90
1- ANIMALES Y CONDICIONES DE ALOJAMIENTO	90
2- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	91
2- ESTUDIO PARA EVALUAR LA FUNCIÓN OLFATIVA.....	93
3- ESTUDIOS PARA EVALUAR LA NEOFOBIA.....	94
4- ESTUDIOS PARA EVALUAR LA HABITUACIÓN	95
5- ESTUDIO DE VARIACIÓN DIARIA DE LA COORDINACIÓN MOTORA	96
6- ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DIARIA DEL APRENDIZAJE MOTOR.....	98
7- ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES.....	101
Obtención de las muestras de cerebelo.....	101
Determinación de la concentración de proteínas.	101
Determinación de los niveles proteicos de BMAL1 por Western Blot.....	103
Análisis de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativa.....	106
Análisis de expresión de ADNc por RT-qPCR.	108
Análisis de las regiones regulatorias de los genes Dnmt1, Sirt1, Ogg1 y Ape1 en busca de sitios de respuesta al reloj.....	110
Análisis estadístico.....	111

Ensayos de metilación del ADN.....	112
8-ESTUDIOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	120
Ensayos celulares.....	120
Reacción de extracción de ADNg.....	121
Diseño de los cebadores y amplificación de los fragmentos.....	122
Clonado en el plásmido de clonación.....	123
Screening para la selección de clones.....	124
Screening para la confirmación de clones por Secuenciación de Sanger.....	125
Clonación en el plásmido reportero	127
MIDI PREP	129
Transfección	131
Ensayo de prueba de Luciferasa	133
Evaluación fisiológica y comportamental del modelo experimental	135
1- Estudio observacional de apariencia	137
2- Pesos corporales	137
3- Función Olfativa	138
4- Neofobia	139
5- Habituaación en respuesta al entorno.....	140
6- Coordinación motora y Equilibrio.....	141
7- Aprendizaje motor	142
8- Conclusiones.....	143
Análisis de los patrones temporales de los niveles de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, Bdnf, y de su receptor TrkB, en cerebelo y su posible regulación circadiana y epigenética.....	145
1- Ritmo circadiano de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (Bdnf), en cerebelo.....	147
2- Ritmo circadiano de expresión del receptor de tropomiosina quinasa B (TrkB), en cerebelo.....	149
3- Ritmo circadiano de los niveles proteicos de BMAL1, en cerebelo.....	151
4- Ritmo circadiano de expresión de la enzima ADN metiltransferasa 1 (Dnmt1), en cerebelo.....	153
5- Niveles de metilación en región regulatoria y exónica de los genes cognitivos, Bdnf y TrkB, en cerebelo.....	156
6- Conclusiones.....	157

Análisis de la expresión circadiana de enzimas que participan en la reparación del ADN por escisión de base y estudio de su regulación temporal, en cerebelo de rata	159
1- Variación temporal de la expresión de la enzima de reparación del ADN, 8-Oxoguanina ADN glicosilasa 1 (Ogg1).....	160
2- Variación temporal de la expresión de la enzima de reparación del ADN, endonucleasaapurínica/apirimidínica 1 (Ape1).	163
4- Control de la expresión circadiana de la enzima glicosilasa del sistema de reparación por escisión de bases, Ogg1, por parte del reloj celular.....	165
5- Control de la expresión temporal de la enzima endonucleasa del sistema de reparación por escisión de bases, Ape1, por parte del reloj celular.	168
6- Ritmo circadiano de expresión de la enzima modificadora de histonas, sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD (Sirt1).....	170
7- Conclusiones.....	172
Conclusión y Discusión.....	175
CONCLUSIÓN	175
DISCUSIÓN.....	177
Evaluación fisiológica y comportamental del modelo experimental.....	177
Análisis de los patrones temporales de los niveles de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, Bdnf, y de su receptor TrkB, en cerebelo y su posible regulación circadiana y epigenética.....	186
Análisis de la expresión circadiana de enzimas que participan en la reparación del ADN por escisión de base en cerebelo de rata y estudio de su regulación temporal.....	196
Referencias.....	209

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: <i>Entrainment</i> fótico de los ritmos de sueño-vigilia: Curva de Respuesta de Fase	15
Figura 1.2: Parámetros que caracterizan un ritmo biológico ajustado a una función sinusoidal.....	17
Figura 1.3: Localización de los núcleos supraquiasmáticos	19
Figura 1.4: Aferencias y Eferencias del Reloj Circadiano Central	24
Figura 1.5: Mecanismos moleculares del reloj circadiano en mamíferos	28
Figura 1.6: Sistemas eucariotas de Reparación del ADN.....	33
Figura 1.7: Mecanismo del sistema de reparación <i>BER</i>	37
Figura 1.8: Tipos de Metilaciones en el ADN.	45
Figura 1.9: Cascadas de modificaciones enzimáticas en citosina	46
Figura 1.10: Esquema sobre las Teorías del Envejecimiento	49
Figura 1.11: Restricción calórica y sus beneficios	58
Figura 1.12: Posición anatómica del cerebelo en ser humano y rata.....	61
Figura 1.13: Circuito cerebrocerebelar en ser humano.....	62
Figura 3.1: Esquema del diseño experimental empleado	93
Figura 3.2: Esquema de la estructura para desarrollo de <i>Buried Food Pellet Test</i> ..	94
Figura 3.3: Esquema de la estructura para desarrollo de <i>Corner Test</i>	95
Figura 3.4: Esquema de la estructura para desarrollo de <i>Beam Walking Test</i>	98
Figura 3.5: Esquema de la estructura para desarrollo de <i>Single Reaching Pellet Test</i>	101
Figura 3.6: Representación de la reacción de conversión por Bisulfito de Sodio	114
Figura 3.7: Estación de trabajo de vacío PyroMark Q96	118
Figura 3.8: Cascada enzimática durante la reacción de pirosecuenciamiento	120
Figura 3.9: Diseño <i>in silico</i> de los plásmidos reporteros [...]	129
Figura 4.1- Estudio observacional de apariencia.....	137
Figura 4.2- Estimación del Peso Corporal.....	138
Figura 4.3- Calidad de la función olfativa.....	139

Figura 4.4- Evaluación del estado ansiogénico.....	140
Figura 4.5- Habitación a ambientes novedosos	141
Figura 4.6- Evaluación de la coordinación motora y equilibrio	142
Figura 4.7- Evaluación del Aprendizaje Motor	143
Figura 5.1- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Bdnf en cerebelo[...]	148
Figura 5.2- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de TrkB en cerebelo[...]	150
Figura 5.3- Ritmo circadiano de la proteína BMAL1 en cerebelo[...]	152
Figura 5.4- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Dnmt1 en cerebelo[...]	155
Figura 5.5- Niveles de metilación en región regulatoria y exónica de Bdnf y su receptor TrkB en cerebelo[...]	157
Figura 6.1- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Ogg1 en cerebelo[...]	162
Figura 6.2- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Ape1 en cerebelo[...]	164
Figura 6.3- Arquitectura propuesta y análisis funcional de la región reguladora proximal de Ogg1 de rata.....	167
Figura 6.4- Arquitectura propuesta y análisis funcional de la región reguladora proximal de Ape1 de rata	169
Figura 6.5- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Sirt1 en cerebelo[...]	171
Figura 7.1- Mapa de Fases de la expresión circadiana de los diferentes genes estudiados	176

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1: Soluciones para preparar gel de corrida (15%)	104
Tabla 3.2: Soluciones para preparar gel de concentración (5%)	104
Tabla 3.3: Secuencia de los cebadores usados en RT-PCR semicuantitativa	108
Tabla 3.4: Secuencia de los cebadores usados en RT-qPCR	109
Tabla 3.5: Condiciones del termociclador para la conversión por Bisulfito	114
Tabla 3.6: Composición de la reacción utilizando PyroMark PCR Kit	116
Tabla 3.7: Secuencia de los cebadores utilizados [...]	116
Tabla 3.8: Componentes para inmovilización de ADN	117
Tabla 3.9: Secuencia de los cebadores utilizados en la Pirosecuenciación	119
Tabla 3.10: Secuencia de cebadores utilizados [...].....	122
Tabla 5.1: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Bdnf en cerebelo [...]	147
Tabla 5.2: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de TrkB en cerebelo[...]	151
Tabla 5.3: Parámetros característicos del ritmo circadiano de proteína de BMAL1 en cerebelo[...]	153
Tabla 5.4: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Dnmt1 en cerebelo[...]	154
Tabla 6.1: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Ogg1 en cerebelo[...]	161
Tabla 6.2: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Ape1 en cerebelo[...]	165
Tabla 6.3: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Sirt1 en cerebelo[...]	172

Prólogo

La presente tesis doctoral está dividida en cuatro (4) partes, en función del desarrollo del trabajo y éstas, a su vez, subdivididas en capítulos.

Parte I: Introducción, comprende el capítulo 1.

Capítulo 1 - *Introducción General*, apartado aclaratorio en el que se describe el marco conceptual de la investigación realizada y la motivación que llevó a la realización de los estudios y experimentos que dan cuerpo a esta Tesis Doctoral. El objetivo de esta parte es facilitar a los evaluadores y lectores del manuscrito de la Tesis, una adecuada ubicación teórica. Seguidamente, realizamos una versión resumida de la investigación bibliográfica y de los conocimientos alcanzados hasta la fecha, acerca del sistema de reparación por escisión de bases del ADN (BER), su relación con el reloj biológico, cómo se ve afectado durante el envejecimiento y los efectos de la restricción calórica durante ese estado fisiológico, particularmente, en el cerebelo de rata. Esta recopilación bibliográfica, da una visión global de los tópicos a los que actualmente se está prestando una mayor atención en el campo, y que, se cree, deberían abrir otras líneas de investigación durante los próximos años.

Parte II: Investigación, comprende los capítulos 2 y 3.

Capítulo 2 – *Hipótesis y Objetivos*, aquí se enuncian la hipótesis y los objetivos que nos propusimos en la presente Tesis Doctoral, poniendo de relieve los aspectos innovadores de esta investigación.

Capítulo 3 – *Materiales y métodos*, se describe la metodología empleada en los experimentos realizados. Incluye una descripción detallada del modelo animal, materiales, técnicas empleadas, análisis estadístico, programas informáticos usados.

Parte III: Resultados, comprende los capítulos 4, 5 y 6.

Capítulos 4- *Evaluación fisiológica y comportamental del modelo experimental*, describimos los resultados de las experiencias realizadas a fin de cumplimentar los objetivos propuestos y comprobar la hipótesis planteada.

Capítulos 5- *Análisis de los patrones temporales de los niveles de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, Bdnf, y de su receptor TrkB, en cerebelo y su posible regulación circadiana y epigenética*, describimos los resultados de las

experiencias realizadas a fin de cumplimentar los objetivos propuestos y comprobar la hipótesis planteada.

Capítulos 6- *Análisis de la expresión circadiana de enzimas que participan en la reparación del ADN por escisión de base y estudio de su regulación temporal, en cerebelo de rata*, describimos los resultados de las experiencias realizadas a fin de cumplimentar los objetivos propuestos y comprobar la hipótesis planteada.

Parte IV: Conclusión y Discusión, comprende el capítulo 7.

Capítulo 7 – Conclusión. En la conclusión hacemos una recopilación general de todas aquellas observaciones y hallazgos generales, que obtuvimos a lo largo del desarrollo de este trabajo. *Discusión.* Aquí realizamos el análisis e interpretación de los resultados, confrontándolos con los de otros autores y discutimos su impacto y aporte al conocimiento.

Referencias, incluye los artículos consultados y referenciados en la investigación realizada en la presente tesis doctoral.

Acrónimos

ω : velocidad angular

ϕ : acrofase

τ : periodo

A: amplitud

f: fase

M: mesor

5caC: 5-carboxilcitosina

5fC: 5-formilcitosina

5hmC: 5-hidroximetilcitosina

5mC: 5-metilcitosina

ACTH: adenocorticotrofina

EA: enfermedad de Alzheimer

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPK (del Inglés: *AMP-activated protein kinase*): proteína quinasa activada por AMP.

AP:apurínico/apirimidinico

AP1 (del Inglés: *activator protein 1*): proteína activadora 1

APE1 (del Inglés: *apurinic/apyrimidinic endonuclease*): endonucleasa apurínica/apirimidinica

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

BER (del Inglés: *base excision repair*): reparación por escisión de bases

bHLH (del Inglés: *basic-helix-loop-helix*): hélice- bucle-hélice básico

Bmal1 conocido como ARNTL1 (del Inglés: *Brain and muscle Arnt-like protein-1*): proteína tipo receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo 1

CBP (del Inglés: *CREB-binding protein*): proteína de unión a CREB

CCG (del Inglés: *clock-controlled gene*): gen controlado por el reloj

CK1 δ : caseína quinasa 1 delta

CK1ε43: caseína quinasa 1 epsilon 43

CLC: citocina tipo cardiotrofina

Clock (del Inglés: *circadian locomotor output cycles kaput*): factor de transcripción del reloj que heterodimeriza con Bmal1

CREB (del Inglés: *cAMP-response element binding protein*): proteína de unión a elementos respuesta a AMPc

Cry: criptocromo

CT (del Inglés: *circadian time*): tiempo circadiano

DBP (del Inglés: *D site of albumin promoter binding protein*): sitio D de la proteína de unión al promotor del gen de la albúmina

DBS (del Inglés: *double-strand breaks*): roturas doble cadena

Dbt (del Inglés: *doubletime*): doblatiempo

DCN (del Inglés: *deep cerebellar nuclei*): núcleo cerebelar profundo

DEC (del Inglés: *differentiated embryo chondrocyte*): condrocito embrionario diferenciado

DMH (del Inglés: *dorsomedial hypothalamic nucleus*): núcleo hipotalámico dorsomedial

DNMT (del Inglés: *DNA methyltransferase*): ADN metiltransferasa

DSBR (del Inglés: *double-strand break repair*): reparación de roturas doble cadena

E2F1 (del Inglés: *E2F transcription factor 1*): factor de transcripción E2F1

ERO: especies reactivas de oxígeno

FEN1 (del Inglés: *flap structure-specific endonuclease 1*): endonucleasa 1 específica de la estructura flap

FOXO1 (del Inglés: *forkhead box protein O1*): Proteína de caja de horquilla O1

FTs: factores de transcripción

GABA (del Inglés: *gamma-aminobutyric acid*): ácido gamma-aminobutírico

HAT: histona acetiltransferasa

HDAC: histona desacetilasa

HhH: hélice-horquilla-hélice

HLF: factor de leucemia hepático

HR (del Inglés: *homologous recombination*): recombinación homóloga

ICL (del Inglés: *interstrand cross-link*): entrecruzamiento entre cadenas

IGF-1: factor de crecimiento de insulina 1

- IR** (del Inglés: *ionic radiation*): radiación iónica
- KDAC**: lisina deacetilasa
- Ku70** (del Inglés: *lupus Ku autoantigen protein p70*): proteína p70 del autoantígeno del lupus Ku
- LD** (del Inglés: *light-darkness*): luz-oscuridad
- LIG1**: ADN ligasa 1
- LIG3**: ADN ligasa III
- LP** (del Inglés: *long-patch DNA repair*): reparación de ADN de parche largo
- MLL** (del Inglés: *mixed-lineage leukaemia*): leucemia de linaje mixto
- MMR** (del Inglés: *mismatch repair*): reparación de errores
- MPG** (del Inglés: *N-methylpurine-DNA glycosylase*): N-metilpurina-ADN glicosilasa
- mTOR** (del Inglés: *mammalian target of rapamycin*): blanco mamífero de rapamicina
- MUTYH** (del Inglés: *mutY DNA glycosylase*): mutY ADN glicosilasa
- NAC** (del Latín: *accumbens nucleus*): núcleo accumbens
- NAD⁺**: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
- NADH**: nicotinamida adenina dinucleótido reducido
- Nampt** (del Inglés: *nicotinamide phosphoribosyltransferase*): nicotinamida fosforribosiltransferasa
- NEIL1** (del Inglés: *nei like DNA glycosylase 1*): ADN glicosilasa tipo NEI 1
- NER** (del Inglés: *nucleotide excision repair*): reparación por escisión de nucleótidos
- NF-κB** (del Inglés: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B*): factor nuclear potenciador de cadena ligera kappa de linfocito B activado
- NFIL3** (del Inglés: *nuclear factor, interleukin 3 regulated*): factor nuclear, interleucina 3 regulada
- NHEJ** (del Inglés: *non-homologous DNA end joining*): unión de ADN no homóloga
- NPAS2** (del Inglés: *neuronal PAS domain protein 2*): proteína 2 del dominio PAS neuronal
- NPY**: neuropéptido Y
- NR** (del Inglés: *nuclear receptor*): receptor nuclear
- NR1D1** (del Inglés: *nuclear receptor subfamily 1 group D member 1*): receptor nuclear subfamilia 1 del grupo D miembro 1
- NSQ**: núcleos supraquiasmáticos

NTH1 (del Inglés: *endonuclease III-like protein 1*): proteína 1 similar a la endonucleasa III

OGG1: 8-oxoguanina glicosilasa

p53: proteína supresora de tumores p53

p75NTR (del Inglés: *p75 neurotrophin receptor*): receptor de neurotrofina p75

PAS: PER-ARNT-SIM

PCNA (del Inglés: *proliferating cell nuclear antigen*): antígeno nuclear de células en proliferación

PCR (del Inglés: *polymerase chain reaction*): reacción en cadena de la polimerasa

Per: período

PGC1 α (del Inglés: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*): coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas

PK-2: prokineticina-2

PNKP: fosfatasa polinucleótido quinasa

Pol β (del Inglés: *DNA polymerase beta*): ADN polimerasa beta

PPAR (del Inglés: *peroxisome proliferator activated receptor*): receptor activado por proliferador de peroxisoma

pRGC (del Inglés: *photosensitive retinal ganglion cells*): células ganglionares de la retina fotosensibles

PUA (del Inglés: *3'-phospho- α , β -unsaturated aldehyde*): aldehído 3'-fosfo- α , β -insaturado

PVN (del Latín: *paraventricular nucleus*): núcleos paraventriculares

RC: restricción calórica

REM (del Inglés: *rapid eye movement*): movimiento rápido de ojos

REV-ERB conocido como NR1D1 (del Inglés: *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*): Factor componente del circuito accesorio del reloj celular, represor de la transcripción de Bmal1.

RFC (del Inglés: *replication factor C*): factor de replicación C

ROR (del Inglés: *retinoic acid receptor-related orphan receptor*): receptor huérfano relacionado con el receptor del ácido retinoico

SIRT1: sirtuin 1

SNC: sistema nervioso central

SP (del Inglés: *short-patch DNA repair*): reparación de ADN de parche corto

SP1 (del Inglés: *specificity protein 1*): proteína de especificidad 1

SREBP-1c (del Inglés: *sterol regulatory element-binding protein*): proteína de unión al elemento regulador del estero

SSB (del Inglés: *single-strand break*): rotura de una sola hebra

STAT3 (del Inglés: *signal transducer and activator of transcription 3*): transductor de señal y activador de la transcripción 3

TDHA: trastorno por déficit de atención e hiperactividad

TEF: factor tirotrófico embrionario

TET (del Inglés: *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenases*): dioxigenasas de translocación diez-once que oxidan la 5-metilcitosina

TGF α (del Inglés: *transforming growth factor alpha*): factor de crecimiento transformante alfa

tim (del Inglés: *timeless*): sin tiempo

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TTFLs (del Inglés: *transcription-translation feedback loops*): bucles de retroalimentación de transcripción-traducción

UNG: uracil-ADN glicosilasa

UV: ultravioleta

WT (del Inglés: *wild type*): tipo salvaje

XRCC1 (del Inglés: *X-ray repair cross-complementing protein 1*): proteína complementaria cruzada de reparación de rayos X

ZT (del Alemán: *zeitgeber*, y del Inglés: *time*): dador de tiempo o sincronizador.

Parte I

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

Introducción General

Las Neurociencias

Desde hace tiempo que las neurociencias se encuentran entre uno de los principales campos de la investigación científica, motivando estudios que van desde la biología molecular y celular hasta la inmunología del sistema nervioso, desde el estudio de las conexiones y redes neurales hasta la medicina neurocognitiva, entre muchos otros. Se trata de un terreno de investigación absolutamente amplio que es posible gracias a la interrelación de diversas disciplinas, tales como la filosofía, la psicología, la biología, la medicina, la química y la ingeniería.

Ejemplos del impulso dado a las neurociencias en el mundo, lo constituyen: El Proyecto Cerebro Humano (*The Human Brain Project*, 2013) y la Iniciativa Cerebro (*The Brain Initiative*, 2013), proyectos científico-tecnológicos globales, financiados por la Unión Europea y los Estados Unidos, respectivamente, que tienen como fin estudiar las características del cerebro humano, y de esta forma conseguir avances en el campo de la medicina y las neurociencias.

Cada aspecto del funcionamiento cerebral implica el accionar coordinado de múltiples circuitos neuronales, y estas redes son plásticas, es decir, capaces de adaptarse estructural y funcionalmente a cambios en el ambiente interno y externo. Esta compleja maquinaria puede deteriorarse de muy diversas formas, dando lugar a una gran variedad de enfermedades neurológicas y psiquiátricas, que afectan a un número considerable de la población mundial.

Es por ello que uno de los desafíos más importantes que enfrentan hoy las Neurociencias es comprender cómo se articulan y modulan los diferentes niveles de complejidad biológica cerebral y sus alteraciones patológicas, para el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas. Aquí es dónde la Crononeurobiología aporta un mejor entendimiento de la organización espacial y temporal de la biología y comportamiento cerebral.

1- RITMOS Y RELOJES BIOLÓGICOS

Los organismos vivos han debido adaptarse y sobrevivir en un ambiente cambiante, regido principalmente por la alternancia luz-oscuridad, producto de la rotación terrestre, pero también en el que juegan otras variables ambientales como la temperatura, las mareas, los contactos sociales, entre otras. Tal adaptación a los cambios ambientales generó ritmos biológicos endógenos que permiten a los organismos vivos anticiparse y estar “mejor preparados” para enfrentar los desafíos periódicos que les presenta el ambiente. Se conoce como “ritmo biológico” a la recurrencia de un fenómeno dentro de un sistema biológico a intervalos regulares de tiempo [Monk y Kupfer, 2000; Saavedra Torres y col., 2013].

Las características de estos ritmos están determinadas genéticamente y, una vez establecidos, son generados por el propio organismo independientemente de las variables externas, es decir, son endógenos [García Fernández, 1998]. De hecho, en condiciones ambientales constantes, es decir, aislados de la influencia de variables ambientales, como la alternancia luz-oscuridad, o las diferencias de temperatura día-noche, los ritmos manifiestan su frecuencia intrínseca o frecuencia en libre curso, es decir, quedan bajo el control directo de un temporizador o reloj endógeno.

Según su frecuencia en libre curso, García Fernández [1998] y Saavedra Torres y col. [2013] clasifican los ritmos biológicos en:

a. Ritmos de ***alta frecuencia*** (periodo en libre curso < 30 minutos). Por ejemplo: latido cardíaco y ondas del electroencefalograma.

b. Ritmos de ***frecuencia media*** (periodo en libre curso entre 30 minutos y 6 días), entre los que se encuentran:

- Ritmos *ultradianos* (con un período entre 30 minutos y 20 horas).

Por ejemplo, etapas de sueño (90 minutos) como las fases del sueño de ondas lentas y sueño paradójico.

- Ritmos *circamareales* (aproximadamente de 12 horas). Presenta este tipo de ritmo, la actividad de las especies costeras.

- Ritmos *circadianos* (20-28 horas). Por ejemplo, el ciclo sueño-vigilia, el ciclo de actividad-reposo, la liberación de melatonina y cortisol, y la temperatura.

- Ritmos *infradianos* (28 horas y 6 días). Por ejemplo, el nivel de las hormonas de la glándula suprarrenal o ciclo estral en las ratas.

c. Ritmos de ***baja frecuencia*** (periodo en libre curso > 6 días), que incluyen:

- Ritmos *circalunares* (aproximadamente 29 días). Como presentan, el ciclo menstrual en la mujer y la reproducción en animales de zona intermareal.

- Ritmos *circanuales* (aproximadamente 365 días). Presentan un patrón de ritmicidad circanual la migración, la hibernación entre otros.

Una particularidad para mencionar es que muchos de estos ritmos coexisten dentro de un mismo organismo. La interacción entre ritmos de distintas frecuencias puede determinar la ocurrencia oscilante de ciertos eventos fisiológicos [Haus y col., 1997].

Ritmos circadianos

Los cambios a lo largo del día, ocurridos en la naturaleza y en diversos organismos, han sido estudiados de forma sostenida a lo largo de la historia. Así, en el siglo XVIII, el astrónomo francés d'Ortous de Mairan observó, en una planta de *Mimosa púdica*, el despliegue de las hojas durante el día y su envolvimiento durante el anochecer, lo sorprendente es que este comportamiento de las hojas continuó incluso en condiciones de oscuridad constante. Este descubrimiento despertó curiosidad en el ámbito científico.

Hallazgos posteriores involucraron investigaciones en *Drosophila*, realizadas por Seymour Benzer y Ronald Konopka a fines de la década de 1970. Ellos descubrieron que mutando al gen *Period* (Per), desconocido hasta ese momento, se producía la interrupción de los ritmos circadianos de comportamiento locomotor y el canto de cortejo de la mosca de la fruta macho. En la década de 1980 Michael Rosbash, Jeff Hall y Michael Young, aislaron y caracterizaron este gen y la proteína *PERIOD* que codifica (PER). Sus estudios revelaron una oscilación de 24 horas en los niveles de ARNm de Per, con elevada concentración en el período de oscuridad y una disminución durante el día. En 1995, el grupo de Michael Young descubrió otro componente del reloj molecular, codificado por el gen *Timeless* (tim) y demostró la existencia de una retroalimentación negativa, requerida para la

generación de ritmos en *Drosophila*. Además, demostró que la proteína de doble tiempo, DBT (del Inglés: *doubletime*), codificada por el gen *Dbt*, era necesaria para retrasar la acumulación de la proteína PER, y así, ajustar la oscilación de 24 horas. Estos hallazgos les valieron a Michael Rosbash, Jeff Hall y Michael Young el otorgamiento del Premio Nobel en Medicina del año 2017.

Nuevos descubrimientos continuaron con el tiempo generando una imagen más clara de la maquinaria del reloj y sus circuitos reguladores, así como las influencias ambientales que podrían sincronizar el reloj. Además, estos científicos nos proporcionaron información crucial y fundamental sobre los ritmos circadianos y permitieron la investigación futura que finalmente vincularía estos ritmos con la fisiología, el comportamiento, la homeostasis y cómo el desequilibrio de este engranaje conlleva a diversas enfermedades humanas [Crnko y col., 2019].

La palabra “**circadiano**” deriva del Latín *circa*, que significa “cerca de”, “alrededor de” y *dies*, que significa “día”, es decir, con duración de alrededor de un día. Los ritmos circadianos son, entonces, oscilaciones que se producen con una periodicidad de alrededor de 24 horas [Schibler y Sassone-Corsi, 2002]. Desde organismos unicelulares, plantas, babosas marinas, hasta humanos, muestran ritmos circadianos u oscilaciones de aproximadamente 24 horas, que ocurren en los organismos, independientemente de las señales ambientales [Reid y Abbott, 2015].

Como mencionamos más arriba, la vida en la tierra está bajo la influencia continua de un ciclo de luz-oscuridad, generado por la rotación de la tierra alrededor de su eje [Crnko y col., 2019]. Muchos organismos han internalizado el cambio cíclico de la luz y la oscuridad en un sistema temporizador interno que les permite predecir los distintos momentos del día, dándoles ventaja, por ejemplo, en

la competencia por el alimento y evitando los depredadores [Aschoff y col., 1984; Pittendrigh, 1993]. En algunos animales, como *Drosophila* y *Zebrafish*, incluso los osciladores periféricos pueden ser arrastrados directamente por la luz y la oscuridad; este escenario simple solo es posible en organismos en los que al menos algunos fotones alcanzan todos los órganos internos [Schibler y Sassone-Corsi, 2002].

En los mamíferos, el sistema circadiano ofrece una organización temporal dentro del organismo para modular y sincronizar las funciones biológicas a fin de prevenir, entre otros, la activación de vías bioquímicas que se contrarresten entre sí. Así, por ejemplo, en los individuos de hábitos diurnos, los procesos catabólicos proveen de la energía necesaria para las funciones motoras durante las horas del día, mientras que, en la noche, predominan las funciones anabólicas de crecimiento, reparación y consolidación [Hastings y col., 2003].

La periodicidad de aproximadamente 24 horas es un atributo de los ritmos circadianos. Una segunda característica es que estos ritmos se pueden sincronizar o restablecer por señales ambientales. Jurgen Aschoff utilizó el término *zeitgeber* (del Alemán, *zeit*: “tiempo” y *geber*: “dador”, es decir, “dador de tiempo”) para denotar una señal ambiental periódica que sincroniza o establece el tiempo de un ritmo circadiano. El *zeitgeber* más importante para el reloj circadiano de mamíferos es el ciclo luz/oscuridad (*LD*, del Inglés: *light-darkness*), que se detecta mediante fotorreceptores de la retina, incluidos bastones, conos y células ganglionares de la retina *intrínsecamente* fotosensibles que expresan melanopsina (ipRGC, por sus siglas en inglés) [Banks y col., 2016]. Estas señales de entrada de luz se transmiten a los NSQ a través del tracto retino-hipotalámico, donde actúan como señales de ajuste de fase para el reloj circadiano maestro. Dicha información

se transmite a los NSQ para ajustar el ángulo de fase del oscilador circadiano con el ciclo de iluminación ambiental o bien, en sujetos mantenidos en iluminación continua, mediando los efectos de la intensidad de la luz sobre la velocidad angular del oscilador [Golombek, 2007]. El proceso de la sincronización en sí mismo se denomina *entrainment* [Roenneberg y col., 2019]. Cuando los relojes biológicos se sincronizan activamente (*entrain*) con los ciclos de luz-oscuridad, no solo muestran el mismo período que el ciclo *zeitgeber* (en la Tierra, 24 h), sino que también establecen una relación estable con el *zeitgeber*, llamada fase de *entrainment* [Roenneberg y col., 2019]. La relación entre el reloj biológico y el ciclo ambiental explica la existencia de especies diurnas, nocturnas y crepusculares, y garantiza que determinados procesos ocurran en el momento de expresión. Las características de la sincronización son generales para los seres vivos, por consiguiente, la luz puede actuar de modos diferentes sobre el reloj biológico: a través de efectos discretos o fásicos (aquellos ejercidos por pulsos cortos de luz u oscuridad), y efectos continuos o tónicos (que pueden ser detectados cuando la condición ambiental es de luz constante) [Golombek, 2007].

Cuando se mantiene un organismo en un ciclo de 24 horas que consta de 12 horas de luz, seguido de 12 horas de oscuridad, como por ejemplo en un bioterio, el *zeitgeber* tiempo 0 o ZT0 corresponde al horario de encendido de las luces y ZT12 es el horario de apagado de las mismas. Así, todos los puntos de tiempo entre 0 y 12 se refieren a horas durante el día, mientras que aquellos entre 12 y 24 (que es el mismo que "0") se refieren a horas nocturnas.

Ya se ha mencionado que una propiedad importante de los ritmos circadianos es su capacidad de persistir aún en ausencia de señales ambientales cíclicas. Bajo estas condiciones se dice que están *corriendo libremente* y los relojes

mantendrán el ritmo con una periodicidad (τ) de aproximadamente de 24 horas, propia de cada individuo [Banks y col., 2016]. Así, la naturaleza endógena de un ritmo y su periodicidad deben ser determinadas bajo condiciones de libre curso. Bajo estas condiciones, se habla en términos de *tiempo circadiano* (CT, del Inglés: *circadian time*), éste es el tiempo que marca el reloj interno. Los organismos vivos “eligen” un intervalo de tiempo en el cual estará activo; si se tratara de una especie diurna mantenida en condiciones de libre curso, este intervalo será su día subjetivo y la fase en que reposa será la noche subjetiva, mientras que esta distribución de la actividad y reposo es opuesta para las especies nocturnas, en las mismas condiciones. Un organismo mantenido en condiciones constantes y exhibiendo su ritmo en libre curso puede ser sincronizado cuando es sometido a pulsos cortos, incluso, pulsos de algunos milisegundos son suficientes para modificar la fase del ritmo observado. Un cambio de fase puede ser en dos sentidos, esto es, adelantando o retrasando la fase, o puede no haber efecto sobre el ritmo [Golombek, 2007]. La representación gráfica de las relaciones entre la fase sometida al pulso de luz y la dirección de deslocalización de fase es conocida como *curva de respuesta de fase* (Figura 1.1) [Golombek, 2007].

Dado que la periodicidad del reloj interno con frecuencia es algo diferente de 24 horas, como se mencionó anteriormente los ritmos circadianos pueden tener un período de 20-28 horas, los términos CT y ZT no son equivalentes, sino que el uso de uno u otro dependerá de las condiciones ambientales bajo las que se encuentra el modelo animal en estudio [García Fernández, 1998]. En ratones nocturnos y condiciones de oscuridad constante (OO), una unidad circadiana suele ser inferior a 1 hora porque el ritmo interno de estos animales suele ser inferior a 24 horas [Jud y col., 2005]. Los ratones de tipo salvaje, C57BL/6Tyrc-Brd \times 129S7,

por ejemplo, tienen una duración del período interno de $23,7 \pm 0,1$ h y, por tanto, 1 CT equivale a 59,25 min. CT0 designa el inicio del día subjetivo (la fase de reposo en roedores nocturnos) y CT12 el de la noche subjetiva (su fase de actividad). Lo mismo ocurre en los animales diurnos, solo que su fase de actividad comienza a CT0 y su fase de descanso a CT12, respectivamente [Jud y col., 2005].

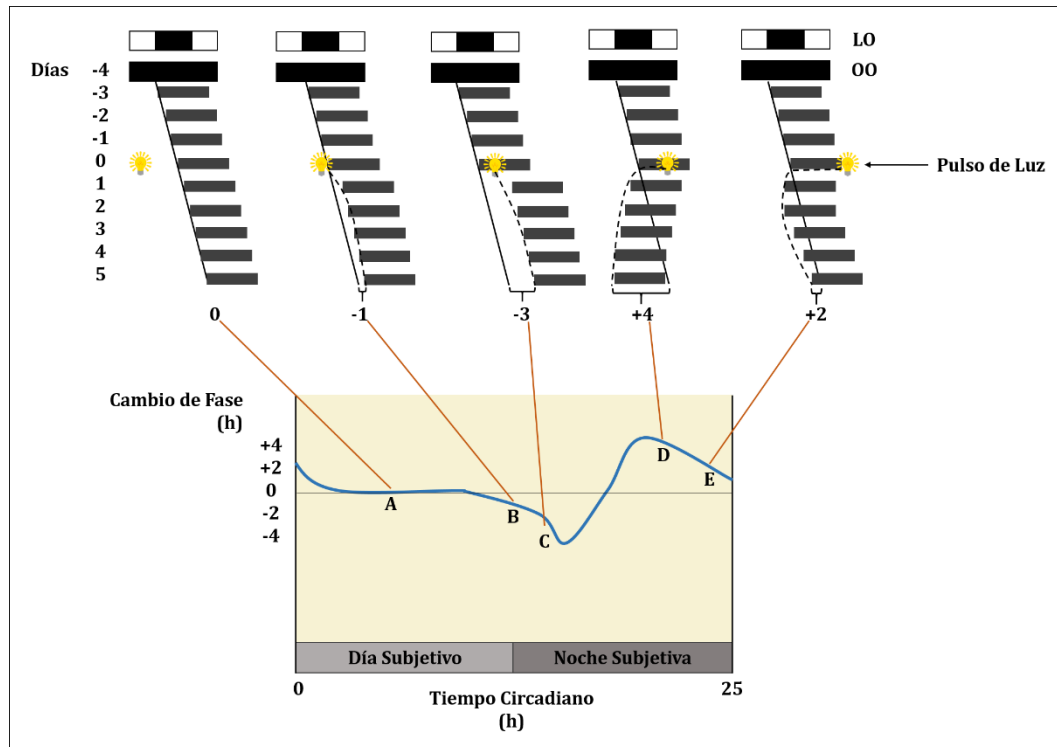


Figura 1.1: Entrainment fótico de los ritmos de sueño-vigilia: Curva de Respuesta de Fase. Se grafican cinco experimentos (A-D) con ratas individuales, cuya actividad locomotora nocturna se informa como una barra gris oscuro. Cada animal es sincronizado a ciclos de 12h luz-12h oscuridad (LO, blanco: luz, negro: oscuridad) y luego mantenido en oscuridad constante (OO, negro). Desde el día -4 hasta el día -1, los animales muestran ritmos de libre curso en OO con un período circadiano de 25h. El día 0, las ratas se someten a un pulso de luz corto (foco amarillo), que se aplica en un momento diferente del ciclo circadiano de 25 h para cada individuo. A continuación, los animales siguen en OO desde el día 1 hasta el día 5. Dependiendo de la hora a la que se administró el pulso, la rata mostrará un cambio de fase de su ritmo de actividad después del pulso o ningún cambio. Los pulsos aplicados durante el día subjetivo (A) no producen respuesta, los pulsos aplicados al comienzo de la noche subjetiva (B, C) producen retraso de fase y los pulsos aplicados al final de la noche subjetiva (D, E) producen avances de fase. Estos cambios de fase se grafican contra el tiempo circadiano para derivar en la curva de respuesta de fase que se muestra en la parte inferior [extraído y modificado de Galizia y Pierre, 2013].

Parámetros circadianos

Los componentes de un ritmo biológico se pueden analizar mediante una función sinusoidal (Figura 1.2). Los procesos biológicos se organizan en el tiempo como ritmos innatos definidos por parámetros típicos de una oscilación física, como el período (τ), fase (Φ), amplitud (A) y mesor (M) [Smolensky y col., 2016]. Por lo que los parámetros que definen un ritmo son los siguientes [García Fernández, 1998]:

- El *Periodo*, es el intervalo de tiempo entre dos puntos de igual magnitud de la variable.
- El valor medio o *Mesor*, (*MESOR* del Inglés: *Midline Estimate Statistics of Rhythm*), es el valor medio de la función cosenoidal obtenida del ajuste por mínimos cuadrados de los datos, y se aproxima al valor promedio de la oscilación.
- La *Amplitud*, es la diferencia entre el valor máximo (o mínimo) y el valor medio que toma la variable en una oscilación.
- La *Fase*, es el momento o tiempo al cual la variable adquiere un valor determinado. Para caracterizar la fase normalmente se determina la *acrofase* o el momento en el que la variable alcanza el valor máximo, o el *nadir*, que es el momento en el que la variable adquiere su valor mínimo. La representación de las acrofases de los distintos ritmos se denomina mapa de fases e indica la relación temporal entre distintos factores, señales, metabolitos y/o procesos biológicos, que ocurren con una secuencia característica dentro de un ciclo.

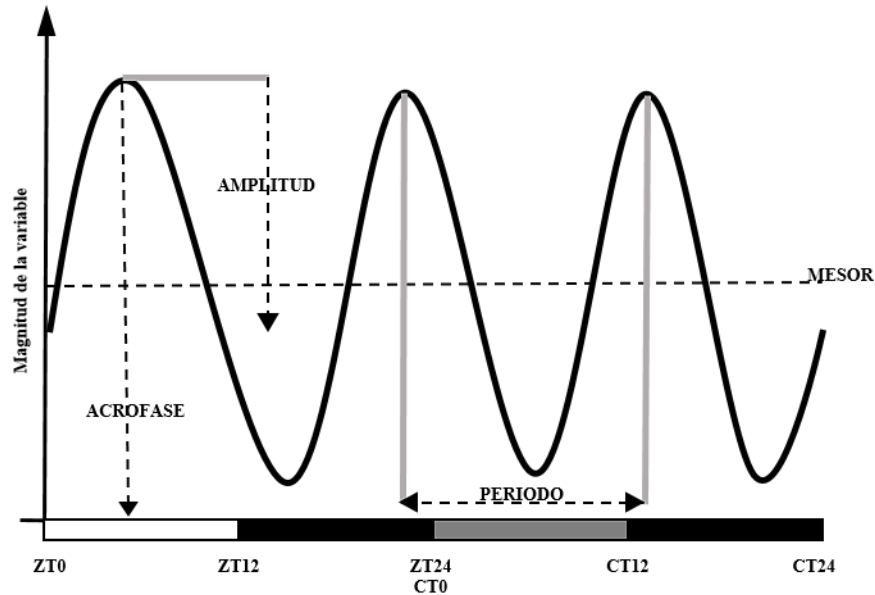


Figura 1.2: Parámetros que caracterizan un ritmo biológico ajustado a una función sinusoidal.

Análisis de los ritmos circadianos

El análisis matemático de los ritmos puede hacerse mediante varios métodos. Uno de los más utilizados es el de Cosinor que consiste en determinar, por el método de los cuadrados mínimos, la función cosenoidal que mejor describe el ritmo. Esto posibilita la determinación de los principales parámetros del ritmo con sus intervalos de confianza, período, amplitud, mesor y acrofase. La expresión matemática de la función cosinor, es la siguiente:

$$y = M + A \cdot \cos (f + \omega t)$$

Donde M es el mesor, A es la amplitud, f representa la acrofase y t el tiempo en horas (h); ω es la velocidad angular que, en el caso de un ritmo circadiano con el tiempo expresado en horas, equivale a $\pi/24=0,2618$ radianes/h. Para convertir f en horas se la divide por ω . El procedimiento estadístico consiste en hallar los valores de M, A y f, que hacen que la función cosenoidal se ajuste lo máximo posible a los valores experimentales de la variable “y” [Golombek, 2007].

Otro de los métodos utilizados es el programa para la detección de la organización rítmica en datos arbitrarios que se registran durante un período de tiempo, el *Chronos-Fit*. Originalmente fue desarrollado para la evaluación de datos de monitoreo de presión arterial ambulatoria [Zuther y col., 2009]. Sin embargo, el programa se ha ampliado a otros campos de la investigación del ritmo, como mediciones de actividad en humanos, datos radiotelemétricos de presión arterial, frecuencia cardíaca, actividad, temperatura, etc. en animales, y datos recopilados de otro modo durante todo el día. El programa realiza un análisis lineal, que consta de parámetros convencionales como la media y la desviación estándar, y un análisis de ritmo, que realiza un análisis de Fourier parcial de los datos. Además, se implementan módulos para análisis de grupos, análisis de espectro de potencia y actogramas.

Sistema circadiano en mamíferos

Cuando amanece, las funciones de nuestro organismo se aceleran, anticipándose al aumento de actividad locomotora que se aproxima. Las fases del ciclo sueño-vigilia o de actividad-descanso, la temperatura corporal, los niveles de hormonas como el cortisol o la melatonina siguen un ritmo biológico, por lo que decimos que varían con un ritmo circadiano [García Fernández, 1998; Banks y col., 2016]. Estos ritmos deben estar coordinados para el buen funcionamiento del organismo. En el sistema temporizador interno, existe una jerarquía, siendo el marcapasos principal o reloj maestro localizado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo (Figura 1.3), quien coordina y sincroniza los demás relojes ubicados en cada órgano y/o tejido del organismo que, a su vez, generan ritmos propios según su funcionalidad [Albers y col., 1992; Schibler y col., 2015].

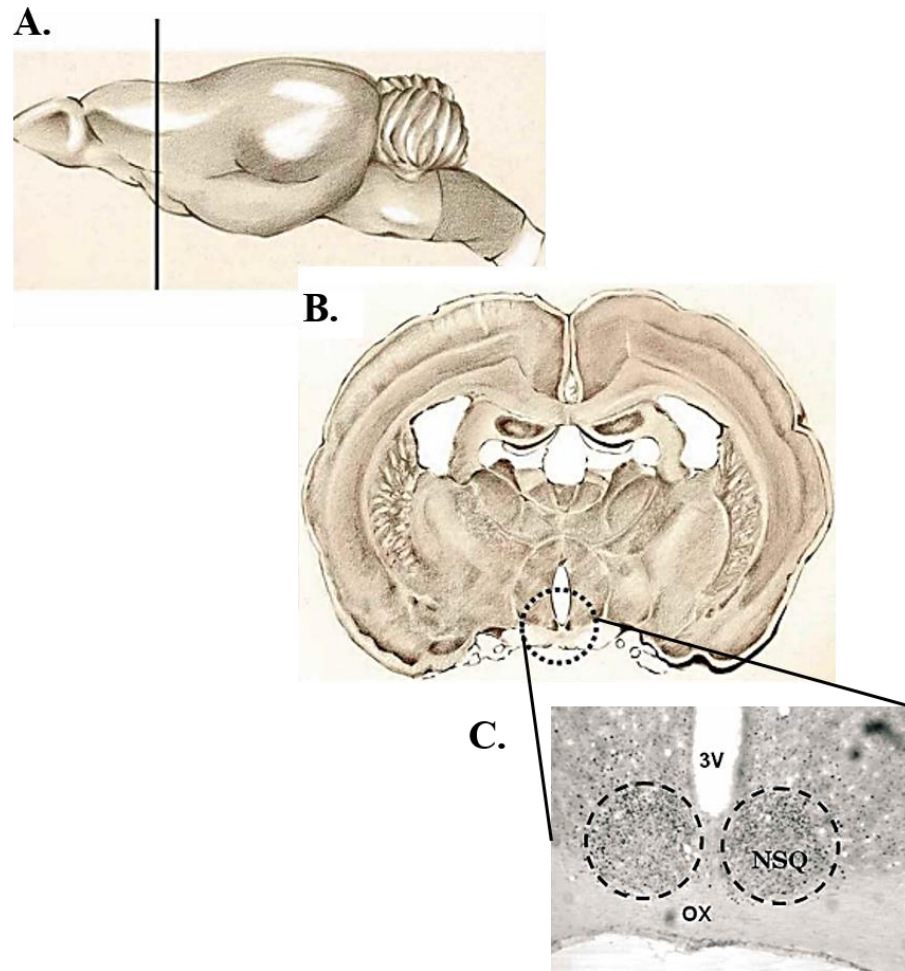


Figura 1.3: Localización de los núcleos supraquiasmáticos [modificado de Guadarrama-Ortiz y col., 2014]. (A) dibujo de corte sagital de cerebro de rata; (B) dibujo de corte coronal del cerebro de rata; (C) Micrografía electrónica del corte coronal de los NSQ.

Los ritmos circadianos exhiben propiedades que se conservan entre las especies. Así, los relojes circadianos de mamíferos poseen características similares a los de otros organismos [Schibler y col., 2015], a saber:

1. En primer lugar, presentan un período de alrededor de 24 horas, es decir, existen distribuciones poblacionales normales de periodos cercanas a las 24 hs para diferentes especies de mamíferos.
2. Los relojes circadianos en mamíferos presentan *entrainment* ante señales ambientales.

3. Los relojes circadianos en mamíferos son endógenos. En otras palabras, los ritmos circadianos persistirán, aún en ausencia de señales ambientales (condiciones de libre curso, por ejemplo, cuando el organismo se encuentra en oscuridad constante).

4. Aunque son capaces de regular su temperatura corporal, los estudios realizados con células cultivadas de mamíferos, indican que los ritmos en mamíferos muestran la propiedad requerida de compensación de temperatura, es decir, que son capaces de mantener un periodo τ constante en un rango amplio de temperatura.

En mamíferos, la lesión de los NSQ produce una pérdida de los ritmos circadianos de comportamiento y de funciones fisiológicas como actividad motora, ciclo sueño/vigilia, ingesta de comida y bebida, temperatura y secreción hormonal, en varias especies de mamíferos, incluido el hombre [Moore y Eichler, 1972; Kafka y col., 1985; Meijer y Rietveld, 1989; Albers y col., 1992; Leak y Moore, 2001; Saavedra Torres y col., 2013]. Investigadores se valieron de una cepa mutante de hamsters, denominados *tau* cuyo período es significativamente más corto que el de la cepa salvaje. Al trasplantar NSQ fetales de estos animales en animales de cepa salvaje, a los que previamente se les había lesionado los NSQ, observaron que los animales trasplantados recuperaron la ritmicidad, pero con el período correspondiente a los NSQ del donante. Análogamente, al trasplantar NSQ de cepa salvaje en animales *tau*, la cepa receptora adoptó los parámetros circadianos correspondientes a los NSQ donantes [Ralph y col., 1990].

Por otro lado, los NSQ presentan ritmos circadianos de utilización de glucosa y de actividad eléctrica de sus neuronas [Meijer y Rietveld, 1989; Albers y col.,

1992], que se mantienen en forma autonómica a lo largo de más de un mes al aislar estos núcleos del resto de las áreas cerebrales [Leak y Moore, 2001]. Es por la evidencia mencionada que estos núcleos se consideran el marcapasos o reloj principal, existiendo además osciladores secundarios en los núcleos del hipotálamo anterior (núcleo paraventricular hipotalámico) y del hipotálamo tuberal (núcleo paraventricular talámico y el núcleo septal lateral). Estos núcleos reciben conexiones directas desde el marcapasos principal [García Fernández, 1998]. Por su parte, los NSQ reciben 3 aferencias principales (Figura 1.4) [García Fernández, 1998; Moore, 1999; Leak y Moore, 2001; Mazzocchi y col., 2012; Saavedra Torres y col., 2013]:

- Los fotorreceptores de la retina proyectan directamente a los NSQ a través del tracto retino hipotalámico. Esta vía nerviosa lleva la información lumínica a través de los fotorreceptores clásicos cono/bastones, y las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotorreceptoras, obteniendo acceso al reloj para mediar la sincronización de su actividad con el medio externo [García Fernández, 1998; Moore, 1999; Leak y Moore, 2001; Morin, 2013].

- El tracto retino hipotalámico envía vías de señalización colaterales al núcleo intergeniculado lateral, el cual contiene células que proporcionan NPY, el que a su vez inerva a los NSQ. Se ha sugerido que el núcleo geniculado lateral integra información lumínica y no lumínica para el sistema de sincronización circadiana que modula la función de los NSQ [Moore, 1999; Morin, 2013; Saavedra Torres y col., 2013].

- Las neuronas serotoninérgicas provenientes de los núcleos mesencefálicos del rafe inervan los NSQ. La actividad de estas neuronas depende del estado de vigilia del individuo, ya que se activan de forma regular durante la

vigilia, lentamente durante el sueño lento y están silentes durante el sueño REM [Moore, 1999; Saavedra Torres y col., 2013]. El sistema serotoninérgico modula tanto la regulación fótica como la no fótica del sistema circadiano [Albers y col., 1992; Moore, 1999; Morin, 2013; Saavedra Torres y col., 2013].

Por otro lado, las eferencias de los NSQ son de dos tipos:

- **Nerviosa:** sus principales eferencias nerviosas proyectan al hipotálamo anterior e hipotálamo tuberal, proyectando ambos a órganos efectores. A su vez, el hipotálamo anterior inerva, por medio de una vía multisináptica, a la glándula pineal, controlando así la síntesis de la hormona melatonina [García Fernández, 1998; Saavedra Torres y col., 2013]. Los NSQ inervan numerosos núcleos cerebrales, pasando así la información temporal a otros relojes del SNC. Los núcleos paraventriculares hipotalámicos (PVN) son una de las principales regiones que transducen la función circadiana de los NSQ a la periferia. Los PVN son un centro de retransmisión de la homeostasis energética y se proyectan principalmente a la hipófisis, donde regulan la liberación de hormonas como la adenocorticotrofina (ACTH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Los PVN también inervan la vía simpática del sistema nervioso autónomo que permite a los NSQ controlar, indirectamente, la liberación de melatonina de la glándula pineal. Se han descrito proyecciones adicionales de los NSQ a los núcleos dorsomediales hipotalámicos (DMH), los núcleos accumbens (NAc) y los núcleos talámicos paraventriculares permitiendo que los NSQ afecten a una gran cantidad de factores y procesos fisiológicos tales como el sistema de recompensa, los ciclos de alimentación-ayuno, la función cognitiva, la actividad locomotora y la temperatura corporal [Dibner y col., 2010]. Además, los NSQ secretan factores

difusibles que pueden funcionar como señales temporales. El factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), prokineticin-2 (PK-2) y citocina tipo cardiotrofina (CLC) han sido implicados como péptidos secretados por los NSQ capaces de regular los ritmos conductuales [Barclay y col., 2012]. Los diferentes tipos de eferencias mencionadas no serían las únicas moduladoras de la funciones cognitivas, recientemente, se ha reportado el efecto de la luz sobre el aprendizaje, el estrés y el estado de ánimo en animales y seres humanos utilizando distintas vías de salida de ipRGC [Fernandez y col., 2018; Wirz-Justice y col., 2021]. Las ipRGC que se proyectan a los NSQ median los efectos de la luz en el aprendizaje, independientemente de la función de marcapasos de los NSQ [Fernandez y col., 2018; Wirz-Justice y col., 2021]. La regulación del estado de ánimo por la luz, por otro lado, también requiere una vía independiente de los NSQ que une las ipRGC con una región talámica no reconocida previamente, denominada núcleo perihabenular [Fernandez y col., 2018]. Por lo tanto, la información fótica al núcleo perihabenular también puede influir en el aprendizaje por separado del papel circadiano de los NSQ [Wirz-Justice y col., 2021]. El núcleo perihabenular está integrado en un circuito distintivo con centros reguladores del estado de ánimo y es necesario y suficiente para impulsar los efectos de la luz sobre el comportamiento afectivo [Fernandez y col., 2018].

- **Hormonal:** la hormona melatonina se secreta de manera circadiana al torrente sanguíneo y sincroniza agudamente los ritmos de todo el organismo, incluido los NSQ [Rusak y Bina, 1990; Saavedra Torres y col., 2013; Pfeffer y col., 2018]. El metabolismo está bajo un fuerte control circadiano, en mamíferos. Los relojes periféricos localizados, por ejemplo, en hígado, páncreas, tejido adiposo, corazón, entre otros, están regulados por los NSQ y, a su vez,

retroalimentan al mismo [Panda, 2016; Poggiogalle y col., 2018]. Como mencionamos previamente, la alternancia luz-oscuridad es el principal *zeitgeber* exógeno que regula la fase del reloj molecular en los NSQ, sin embargo, señales hormonales y humorales endógenas, como glucocorticoides o insulina y glucosa, derivadas de comportamientos como el ciclo alimentación/ayuno, modulan la fase del reloj central y de los relojes periféricos [Panda, 2016; Poggiogalle y col., 2018]. La coordinación circadiana del metabolismo también involucra a miembros de la familia de receptores nucleares (NR, del Inglés: *nuclear receptors*), tales como: REV-ERB (también conocido como NR1D1, del Inglés: *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*), ROR (del Inglés: *retinoic acid receptor-related orphan receptor*), PPAR (del Inglés: *peroxisome proliferator activated receptor*) y otros [Jagannath y col., 2017].

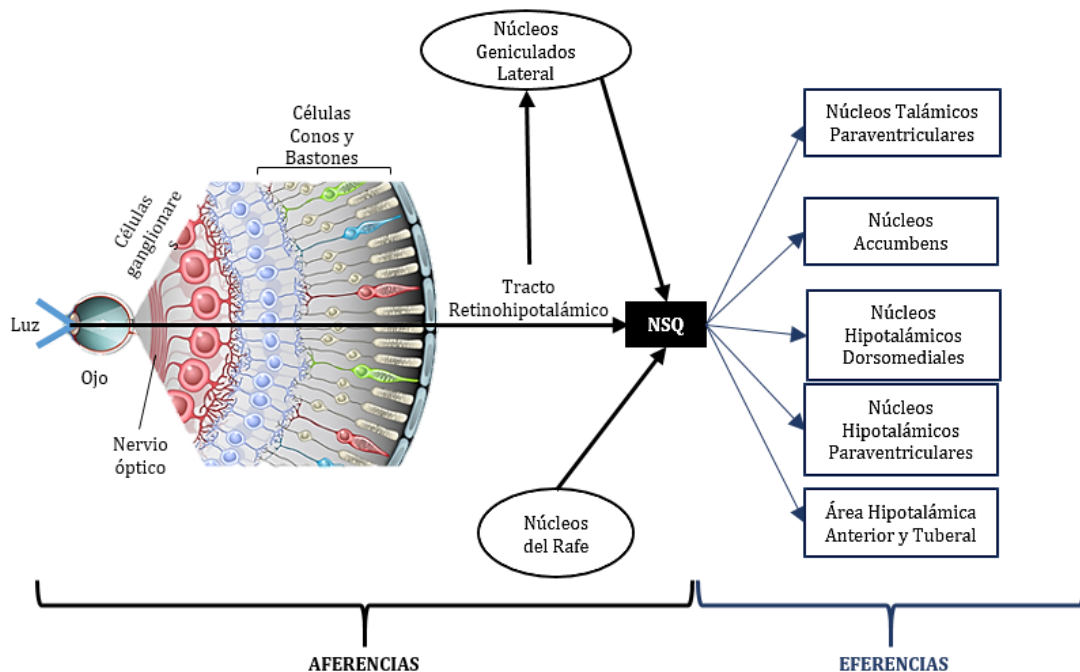


Figura 1.4: Aferencias y Eferencias del Reloj Circadiano Central

Maquinaria molecular del reloj circadiano en mamíferos

Los ritmos circadianos están organizados genéticamente en bucles de retroalimentación transcripción/traducción, positivos y negativos, interconectados [Schibler y Sassone-Corsi, 2002; Jagannath y col., 2017]. Mientras que muchos componentes de este oscilador están conservados evolutivamente entre los diferentes organismos, existen diferencias en la organización específica.

La maquinaria molecular del reloj celular endógeno involucra los factores de transcripción BMAL1, también llamado ARNTL1 (del Inglés: *Brain and muscle Arnt-like protein-1*), y CLOCK (del Inglés: *circadian locomotor output cycles kaput*), que son factores del tipo *basic-helix-loop-helix* (bHLH) - PER-ARNT-SIM (PAS), o su parálogo NPAS2 (del Inglés: *neuronal PAS domain protein 2*). BMAL1 y CLOCK heterodimerizan en el citoplasma y el complejo es luego translocado al núcleo donde, previa fosforilación, se une a elementos específicos, en las regiones reguladoras de sus genes blanco, denominados *E-box* -CACGTG- o *E-box-like* -CANNTG- [Mazzocchi y col., 2012] con preferencia por aquellos boxes organizados en tándem, con un espaciador de 6 o 7 nucleótidos [Beytebiere y col., 2019]. Los genes blancos pueden ser otros genes del reloj como los genes Periodo (Per) 1, 2 y 3, Cryptocromo (Cry) 1 y 2 [Hirayama y Sassone-Corsi, 2005], Ror a, b y c, y Rev-Erb α y β [Kume y col., 1999; Takahashi y col., 2018], o genes controlados por el reloj (*CCG*, del Inglés: *clock-controlled gene*), cuya expresión varía con una periodicidad de, o cercana a, 24 h [Kwon y col., 2011].

Las proteínas PER y CRY a su vez interactúan entre sí y con las serina-treonina quinasas, Caseína quinasa 1 δ (CK1 δ) y CK1 ϵ 43. Luego de la dimerización, fosforilación y unión a las quinasas, el complejo PER:CRY:CK1 δ se transloca al núcleo para completar el bucle de retroalimentación al actuar como reguladores

negativos del complejo BMAL1:CLOCK [Griffin y col., 1999; Kume y col., 1999; Takahashi y col., 2018; Harms y col., 2004]. Esto resulta en una menor expresión de Per y Cry y una disminución de los niveles de proteína PER y CRY las cuales debido a su vida media corta son rápidamente ubiquitiniladas y degradadas por el proteosoma [Takahashi y col., 2018].

Además de este mecanismo de retroalimentación negativo, la actividad del dímero BMAL1:CLOCK también es regulada a través de modificaciones postraduccionales y de estabilidad de las proteínas BMAL1 y CLOCK [Harms y col., 2004].

Por otro lado, las proteínas REV-ERB y ROR forman otro bucle de retroalimentación. BMAL1:CLOCK activa la transcripción de los genes Nr1d1 y Nr1d2 que codifican para los receptores nucleares REV-ERB α y REV-ERB β respectivamente. REV-ERB α y REV-ERB β compiten con ROR α , ROR β y ROR γ por los elementos de unión al receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico, ROR/REV-ERB (ROREs) presentes en el promotor de Bmal1. La alternancia de la regulación positiva de la transcripción por parte de ROR y la regulación negativa por REV-ERB, genera la expresión rítmica de Bmal1 [Preitner y col., 2002; Sato y col., 2004; Takahashi y col., 2018].

Un tercer bucle transcripcional impulsado por BMAL1:CLOCK, involucra los factores PAR-bZip (denominados de este modo porque contienen un motivo con cremallera de leucina básico): DBP (proteína de unión a la caja D), TEF (factor embrionario tirotrófico) y HLF (factor de leucemia hepática). Estas proteínas interactúan en los sitios *D-Box* (TTAYGTAA) con el represor NFIL3 (Factor Nuclear Interleucina 3 Regulada; o E4BP4), que es impulsado por el bucle REV-ERB/ROR. El entrelazamiento de estos tres bucles de retroalimentación puede generar ciclos

de transcripción con diversas fases de expresión dependiendo de la combinación de elementos *cis* (*E-box*, RORE, *D-box*) en los promotores y potenciadores de genes diana específicos (Figura 1.5) [Takahashi y col., 2018].

Por otro lado, las proteínas DEC reconocen los mismos sitios *E-box* que el complejo BMAL1:CLOCK, pero, en contraste con dicho complejo, inhiben la expresión de sus genes diana, creando así un bucle de regulación adicional.

Los productos de los genes blanco del reloj pueden ejercer control sobre una gran variedad de procesos biológicos rítmicos, tales como el metabolismo, el ciclo sueño-vigilia, la actividad locomotora, la temperatura corporal, y las funciones cognitivas, entre muchos otros.

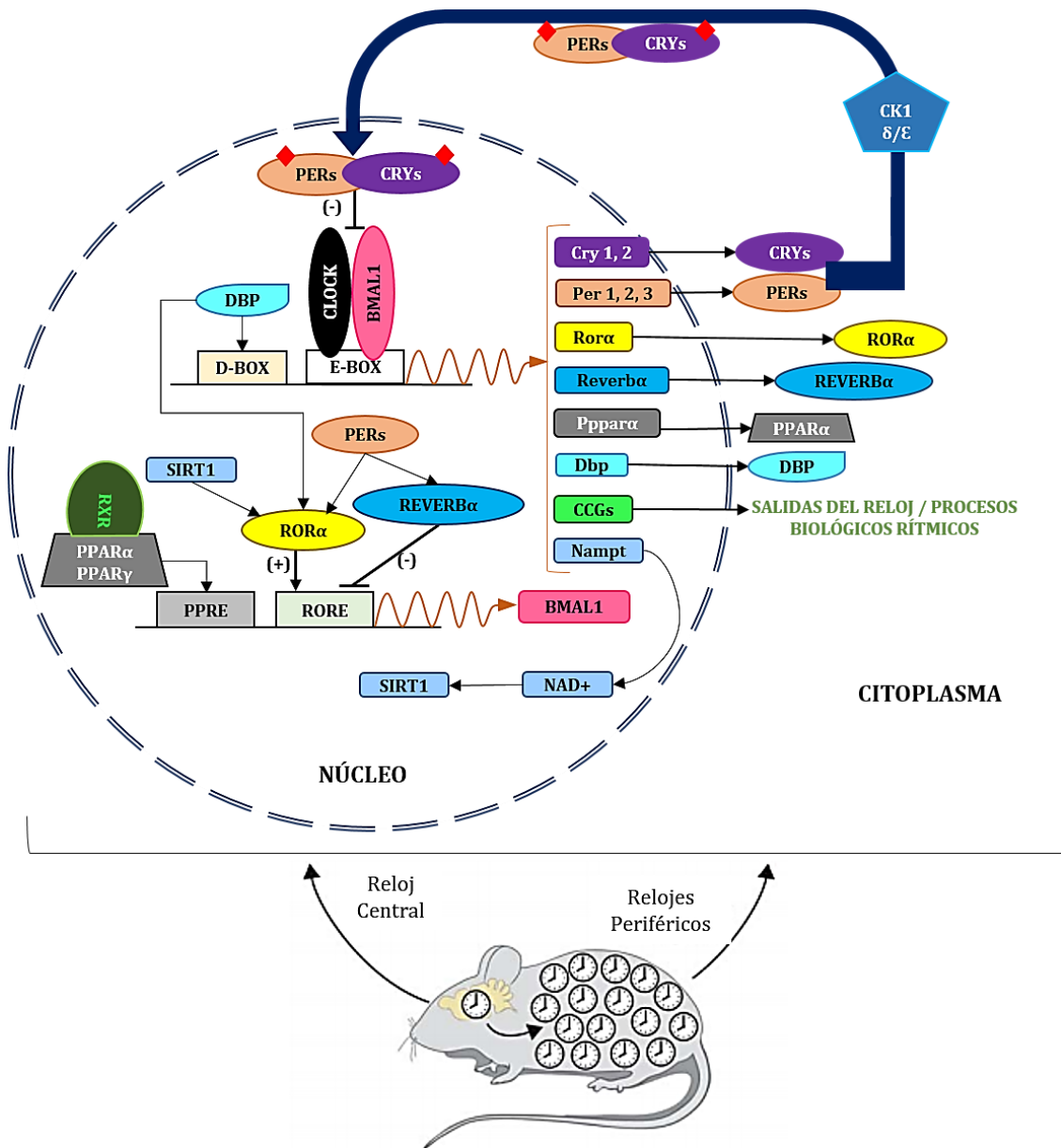


Figura 1.5: Mecanismos moleculares del reloj circadiano en mamíferos

Regulación epigenética del reloj circadiano

Al comienzo del ciclo de transcripción, los activadores, CLOCK y BMAL1, interactúan con las acetiltransferasas de histona (HAT) p300 y la proteína de unión a CREB (CBP), respectivamente, que median la acetilación de H3K9 y H3K27, y las histonas metiltransferasas MLL1 y MLL3 (leucemia mieloide/linfoide o de linaje mixto 1 y 3), que promueven la trimetilación de H3K4, y proporcionan un estado de cromatina accesible para la transcripción. Curiosamente, MLL1

interactúa con el dominio de activación $\delta 19$ de CLOCK y se cree que es importante para el reclutamiento de CLOCK al ADN. Además, la histona desacetilasa dependiente de NAD⁺, Sirtuina 1 (SIRT1) desacetila rítmicamente a MLL1, lo que afecta su actividad metiltransferasa. La metiltransferasa MLL3 exhibe comportamiento circadiano y está asociada con promotores que llevan marcas rítmicas H3K4me₃; sin embargo, el reclutamiento de MLL3 al ADN no depende de BMAL1 o CLOCK [Takahashi y col., 2018; Trott y Menet, 2018].

Se ha informado que CLOCK tiene actividad HAT intrínseca y acetila las histonas H3K9 y H3K1459. SIRT1, se asocia con CLOCK, BMAL1 y PER2, y un ritmo circadiano en los niveles de NAD⁺ impulsado por la expresión del gen objetivo Nampt, conduce a un ritmo en la actividad SIRT1 que retroalimenta para inhibir el complejo BMAL1:CLOCK [Takahashi y col., 2018].

Relojes circadianos cerebrales y periféricos en mamíferos

Como se mencionó anteriormente, en mamíferos, el reloj maestro se encuentra en los NSQ y el primer oscilador autónomo que se identificó fuera del mismo, es la retina. El descubrimiento de los genes del reloj permitió la identificación de áreas del cerebro que contienen la maquinaria molecular necesaria para la generación de ritmos circadianos. Así, oscilaciones diarias en la expresión génica se han identificado en varias regiones del cerebro, incluidos los núcleos del tálamo e hipotálamo, bulbos olfatorios, hipocampo y cerebelo, entre otros [Sollars y Pickard, 2015; Challet, 2019]. Ensayos de bioluminiscencia para el gen Per1 permitieron la visualización de la ritmicidad intrínseca de la activación del promotor Per1 en veinte regiones cerebrales aisladas. Los NSQ mostraron una oscilación circadiana sostenida de Per1, mientras que todas las demás regiones

cerebrales investigadas mostraron oscilaciones amortiguadas o fueron arrítmicas. Este hallazgo está de acuerdo con las observaciones de que los osciladores celulares están acoplados en los NSQ, pero no en otras regiones del cerebro (o tejidos periféricos) [Dibner y col., 2010].

Por lo tanto, existen diferencias notables en fase y robustez, así como en la cinética del restablecimiento de fase inducida por la luz entre diferentes áreas cerebrales [Dibner y col., 2010].

El cerebro está compuesto principalmente por neuronas y células gliales, que dependen metabólicamente entre sí y realizan funciones complementarias. El grado de dependencia metabólica, así como la comunicación electrofisiológica entre estos dos tipos de células, puede variar en diferentes regiones del cerebro, lo que puede tener consecuencias en el grado de sincronización entre estas células. Algunos resultados indican una activación del promotor *Per1* y *Per2* de tipo célula específica, indicando que pueden existir variaciones en el mecanismo del reloj en neuronas y glía [Dibner y col., 2010; Jackson y col., 2015].

Osciladores diferentes de los NSQ, localizados en regiones cerebrales particulares, pueden ayudar a un animal a coordinar temporalmente sus necesidades básicas como, por ejemplo, la alimentación, el apareamiento, las funciones cognitivas, entre otras.

En los órganos periféricos, una gran cantidad y diversidad de funciones biológicas claves están sujetas a oscilaciones diarias. Ejemplos de éstas incluyen la desintoxicación xenobiótica y endobiótica por hígado, riñón e intestino delgado [Gachon y Firsov, 2011]; metabolismo de carbohidratos y lípidos en hígado, músculo y tejido adiposo [Poggiogalle y col., 2018]; flujo de plasma renal y producción de orina; parámetros del sistema cardiovascular, como la presión

arterial y los latidos del corazón [Sherratt y col., 2019]; en particular, nuestro grupo ha mostrado que la actividad del sistema de defensa antioxidante oscila en forma circadiana en hígado, hipocampo y corteza prefrontal de rata [Golini y col., 2012, Lacoste y col., 2017; Ledezma y col., 2021]. También, es de mencionar, la regulación circadiana de la expresión de la proteína xeroderma pigmentosa A (XPA), un factor limitante de la velocidad en la reparación de la escisión de los fotoproductos de dipirimidina inducidos por los rayos UV y que, Aziz Sancar (Premio Nobel en Química, 2015) y su grupo, demostraron que la reparación del DNA por escisión de nucleótidos es modulada por el reloj endógeno [Kang y col., 2009; Partch y col., 2014]. Dada la arquitectura jerárquica del sistema de cronometraje circadiano, estas funciones periféricas son coordinadas por señales sistémicas que emanan de los NSQ, como señales neuronales y hormonas circulantes o metabolitos, y/o de osciladores periféricos locales sincronizados por los NSQ [Dibner y col., 2010].

2- SISTEMAS EUCARIOTAS DE REPARACIÓN DEL ADN NUCLEAR

Nuestras células están constantemente expuestas a agentes endógenos y exógenos que inducen daño a las macromoléculas celulares como el ADN, ARN, proteínas y lípidos. En contraste con los lípidos y las proteínas dañados, el ADN dañado no puede reemplazarse [Gredilla y col., 2012].

Los daños en el ADN pueden generar cambios en la expresión de genes, afectar el crecimiento celular e incluso, generar tumores. Una consecuencia potencial de los daños irreparables del ADN es la inestabilidad genómica y la inducción de cascadas de señalización que conducen a la senescencia o muerte celular, fenotipos celulares asociados con el envejecimiento. Las células cuentan con mecanismos complejos que vigilan la integridad del ADN, activando mecanismos de

reparación cuando hay deficiencias o errores durante la replicación; no obstante, se ha descrito que la capacidad para reparar el daño del ADN disminuye a medida que las células envejecen [Gredilla y col., 2012; Iyama y Wilson, 2013; Maynard y col., 2015].

En las células de mamíferos, las vías de reparación del ADN incluyen: la reparación por escisión de base o *BER* (del Inglés: *base excision repair*), la reparación por escisión de nucleótidos o *NER* (del Inglés: *nucleotide excision repair*), la reparación de desapareamiento o *MMR* (del Inglés: *mismatch repair*) y la reparación de rotura de doble cadena o *DSBR* (del Inglés: *double-strand break repair*) (Figura 1.6). *BER* elimina principalmente el daño oxidativo y de alquilación del ADN, *NER* elimina las lesiones voluminosas que distorsionan la hélice del ADN (por ejemplo, fotodímeros ultravioleta), *MMR* revierte los errores de replicación, y *DSBR* es específico para reparar roturas de doble cadena, principalmente por cualquier reincorporación propensa a errores de los extremos de ADN rotos (reincorporación extremos no homólogos, NHEJ, del Inglés: *non-homologous DNA end joining*) o repara con precisión rotura de doble cadena utilizando información de la cromátida hermana no dañada (recombinación homóloga, *HR*, del Inglés: *homologous recombination*) [Maynard y col., 2015].

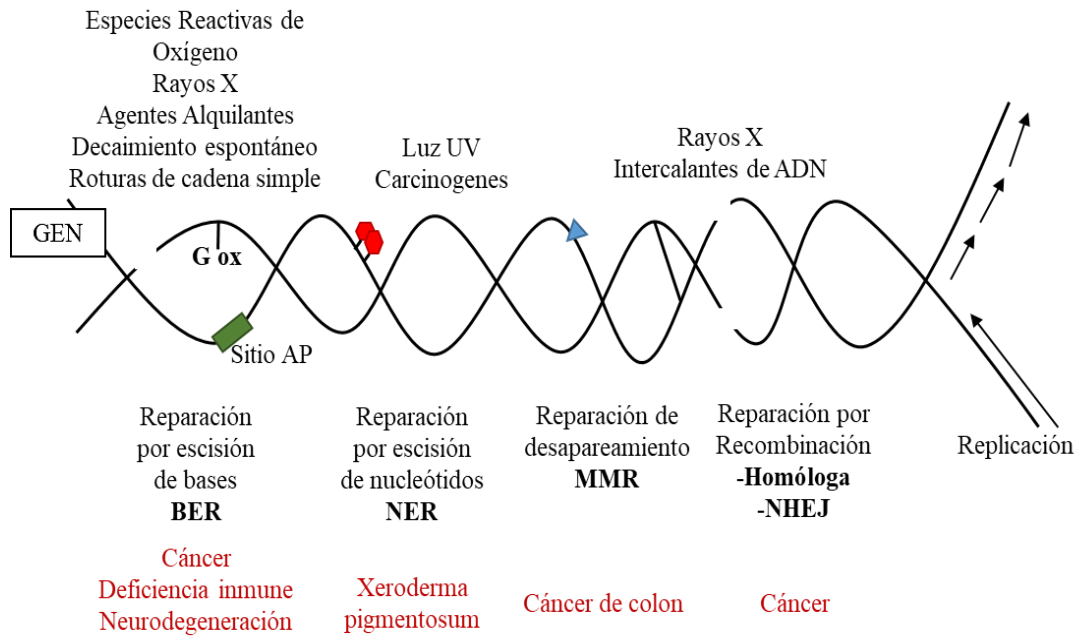


Figura 1.6: Sistemas eucariotas de Reparación del ADN [modificado de Maynard y col., 2015].

Las fuentes exógenas de daño al ADN incluyen: radiación, dieta, agentes ambientales físicos, químicos y biológicos, mientras que entre las fuentes endógenas de daño al ADN se encuentran: la inestabilidad química, como la depuración, los errores espontáneos durante la replicación y reparación del ADN, y las especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales se obtienen como subproductos de la respiración mitocondrial, o generadas por otros agentes como la luz ultravioleta (UV), la radiación ionizante (*IR*, del Inglés: *ionic radiation*), metales pesados, contaminantes del aire, fármacos quimioterapéuticos y respuesta inflamatorias [Gredilla y col., 2012; Iyama y Wilson, 2013]. Se ha propuesto, por ejemplo, que las ERO generan hasta 50,000 lesiones en el ADN, por célula humana, por día, incluidas modificaciones de bases, sitios abásicos, roturas de cadena sencilla (*SSB*, del Inglés: *single-strand break*), roturas de cadena doble (*DSB*, del Inglés: *double-strand break repair*), oxidación de bases y entrecruzamiento intra- e

inter-catenario (*ICL*, del Inglés: interstrand DNA crosslinks) [Iyama y Wilson, 2013; Maynard y col., 2015].

Reparación del ADN por escisión de base

Más de 100,000 lesiones oxidativas y 200,000 sitiosapurínicos/apirimidínicos (AP) son generados por día, por cada célula humana. Así, una célula debe estar preparada para responder a cualquier estrés agudo, como los causados por explosiones oxidativas durante infecciones o el estrés crónico causado por la acumulación de mutaciones, durante el envejecimiento [Swartzlander y col., 2012]. El daño oxidativo y su reconocimiento por las enzimas del sistema *BER* están involucrados en la regulación transcripcional de genes específicos [Wallace, 2014]. Entre las lesiones de base, 8-oxoG es una de las más abundantes y bien caracterizadas; se ha estimado que alrededor de 180 guaninas se oxidan a 8-oxoG por genoma de mamífero por día. La formación de 8-oxoG en los elementos de respuesta del ADN tiene la capacidad de interferir con la regulación génica normal, dado que puede afectar la afinidad de la unión de los factores de transcripción a sus sitios específicos [Pan y col., 2017].

La desaminación es otra reacción espontánea potencialmente dañina, que produce uracilo, inosina y xantosina, a partir de citidina, adenina y guanina, respectivamente. Las lesiones de base de uracilo e inosina, que pueden emparejarse con adenina y citidina, respectivamente, pueden conducir a mutaciones de transición C:G a T:A y A:T a G:C. Además de causar potencialmente resultados mutagénicos, las modificaciones de la base tienen la capacidad de obstaculizar o bloquear la progresión de la ADN o ARN polimerasa y, por lo tanto, activar las respuestas de muerte celular [Iyama y Wilson, 2013].

Para protegerse contra las consecuencias nocivas del daño de bases no voluminosas, así como de sitios abásicos y *SSB*; la vía *BER* ha evolucionado para mantener la integridad del genoma. Dada la frecuencia de la oxidación, la desaminación y la hidrólisis espontánea, *BER* cumple una función crítica tanto en las células en división como en las que no se dividen. La vía *BER* involucra varias enzimas y proteínas, y ocurre a través de los siguientes pasos principales [Iyama y Wilson, 2013]:

- a. reconocimiento y escisión de una base inapropiada
- b. incisión de la enzima reparadora en el sitio abásico resultante
- c. reemplazo del nucleótido removido
- d. procesamiento del/los extremo/s terminal/es
- e. sellado final del *nick*

Como mostramos en la Figura 1.7, la *BER* convencional se inicia mediante una ADN glicosilasa específica de lesión, que puede ser mono o bifuncional, la cual reconoce e hidroliza el enlace N-glucosídico de una base de sustrato, creando un sitio AP intermedio. Las ADN glicosilasas bifuncionales, como la 8-oxoguanina ADN glicosilasa (OGG1), entre otras, exhiben actividad de glicosilasa y actividad intrínseca de 3' AP liasa.

Los sitios AP son hidrolíticos no codificantes al eliminar la base del sustrato. Dichos sitios de AP, que también pueden formarse a alta frecuencia por hidrólisis espontánea o inducida por daño del enlace N-glucosídico, posteriormente son escindidos por APE1 [Gredilla y col., 2012; Iyama y Wilson, 2013].

APE1 es una endonucleasa AP1 de clase II que corta el esqueleto de ADN inmediatamente en la posición 5' de la lesión abásica, creando un producto de ruptura de cadena 5'-desoxirribosa-5-fosfato (5'-dRP) y 3'-hidroxilo (OH). La ADN

polimerasa β (Pol β) es la principal enzima responsable de eliminar el resto 5'-dRP. Después de la eliminación de la base por una glicosilasa de ADN bifuncional, la proteína puede cortar el esqueleto de ADN inmediatamente en la posición 3' del producto del sitio AP a través de una reacción de eliminación β o β - δ . APE1 elimina el residuo 3'-PUA generado por la eliminación β mediante su actividad 3'-fosfodiesterasa, mientras que la polinucleótido quinasa 3'-fosfatasa (PNKP) elimina el resto 3'-P, estableciendo un grupo de cebado 3'-OH para reparar síntesis y ligadura [Iyama y Wilson, 2013].

Después de generar los extremos 3'-OH y 5'-P necesarios, *BER* generalmente avanza a través de la vía de parche corto (*SP*, del Inglés: *short patch*), que involucra a Pol β para reemplazar el nucleótido faltante y el complejo XRCC1-LIG3 α para sellar el *nick* restante. Sin embargo, en los casos en que el resto 5'-terminal no es un sustrato para la actividad liasa de Pol β , o en circunstancias en que las concentraciones de ATP son bajas (lo que resulta en una eficiencia de ligadura reducida) o durante la fase S del ciclo celular (cuando las proteínas asociadas a la replicación son más abundantes), *BER* puede proceder mediante un proceso de síntesis de desplazamiento de cadena de parche largo (*LP*, del Inglés: *long patch*) (Figura 1.7) [Gredilla y col., 2012; Iyama y Wilson, 2013]. Es de notar que, en células no proliferativas, como las neuronas, es probable que la vía *SP-BER* tenga un papel preponderante, dado que las proteínas asociadas a la replicación en *LP-BER*, están reguladas negativamente en estas células [Iyama y Wilson, 2013].

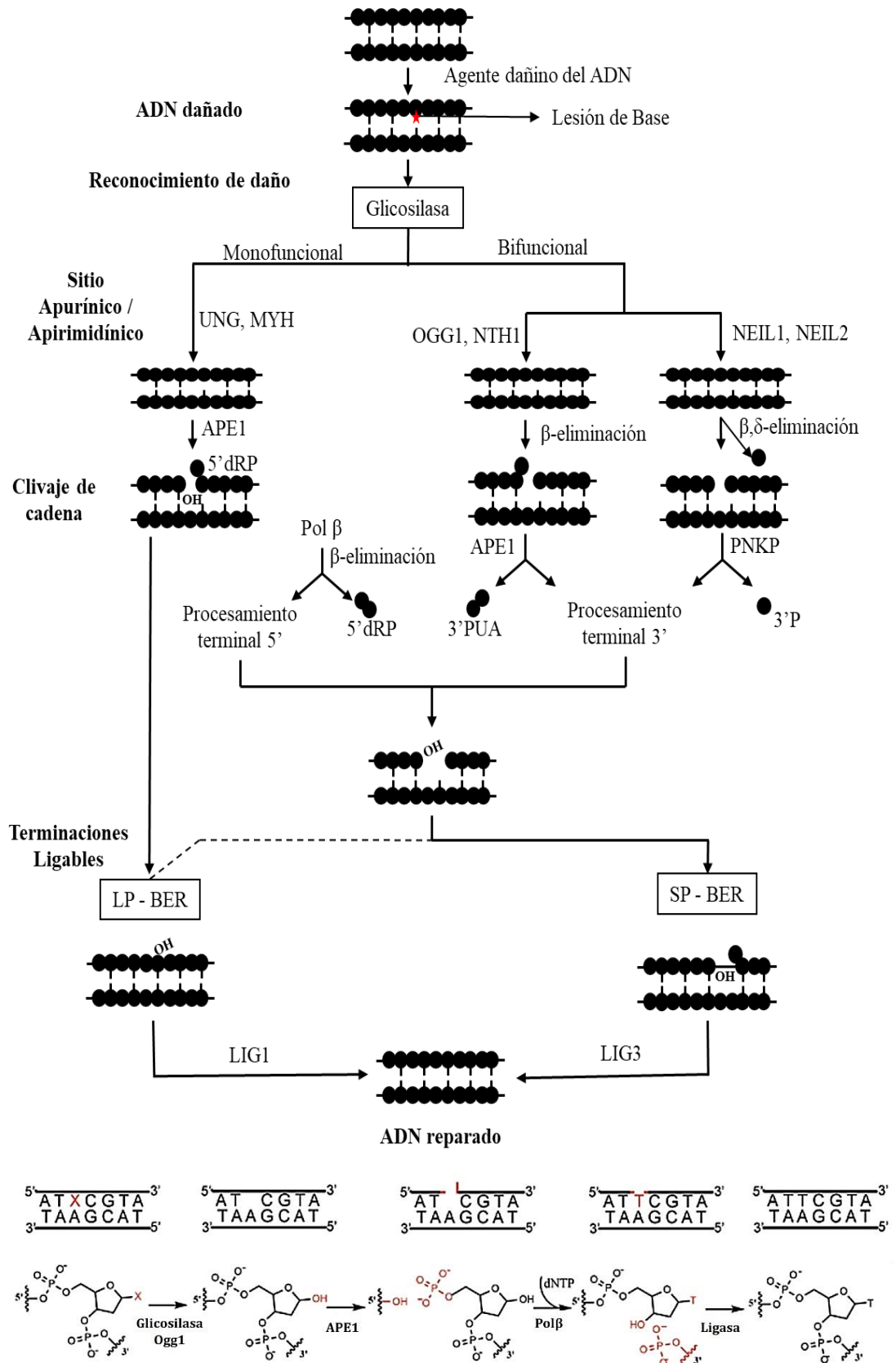


Figura 1.7: Mecanismo del sistema de reparación *BER* [modificado de Zinovkina, 2018, y Caffrey y Delaney, 2020]

A pesar de la importancia documentada de esta vía para mantener la integridad del genoma, solo hay unos pocos trastornos hereditarios asociados con un defecto genético en un componente *BER* clásico. Estos trastornos implican la predisposición al cáncer (el ADN MUTYH glicosilasa y el cáncer colorrectal); defectos inmunológicos (el uracilo ADN glicosilasa UNG y el síndrome de hiperplasia V), y anomalías neurológicas. El hecho que *knock-outs* homocigotas de los principales componentes de *BER* (APE1, Pol β , XRCC1, LIG1 y LIG3) conducen a la letalidad embrionaria o postnatal, subraya la naturaleza frecuente del daño relevante del ADN endógeno y sugiere que la eliminación completa de la vía es incompatible con la vida [Iyama y Wilson, 2013].

Algunos investigadores persiguen la hipótesis de que reducciones más sutiles en la capacidad de *BER* están asociadas con el riesgo de enfermedad, probablemente de una manera dependiente de la exposición. De hecho, se han informado asociaciones entre la capacidad reducida de *BER* y neuropatologías, como la enfermedad de Alzheimer. Además, hay evidencia emergente de que los defectos en la *BER* dan lugar a una mayor susceptibilidad a complicaciones inducidas por accidentes cerebrovasculares, presumiblemente debido al estrés oxidativo agudo [Iyama y Wilson, 2013].

Componentes del Sistema de Reparación por escisión de Bases

OGG1 Glicosilasa: pertenece a la superfamilia de HhH (del Inglés: *helix-hairpin-helix*) y detecta lesiones por difusión térmica [Wallace, 2014], es responsable de la escisión del daño en la base de 8-oxoguanina, y una variante común de OGG1 presente en el genoma es el polimorfismo que codifica OGG1 S326C95, que predispone a los portadores a múltiples tipos de cáncer [Limpose y

col., 2017]. La combinación de 8-oxoG y OGG1 determina los niveles de unión de factores de transcripción en el ADN. 8-OxoG limita la posición de OGG1 donde se beneficiaría la unión de factores de transcripción. En ese caso, OGG1 que reconoce 8-oxoG producido dentro del sitio de unión de FTs desplaza al FT correspondiente por competencia, mientras que los motivos externos facilitan la unión de FTs de manera robusta [Pan y col., 2017]. Una eliminación eficiente de 8-oxoG del ADN nucleosómico requiere los factores de remodelación de la cromatina dependientes de ATP, SWI/SNF o RSC [Boiteux y col., 2017]. Otra función de OGG1 es que la enzima es también una proteína "arquitectónica" que permite interacciones FT-ADN [Pan y col., 2017]. OGG1 tiene distintos roles en la expresión génica mediante modulación de la transcripción o transducción de señales, al unirse a 8-oxoG ubicado en regiones reguladoras de genes, OGG1 actúa como un modulador de la transcripción, que puede controlar la orientación del factor de transcripción, inducir la transición alostérica de la estructura G-cuadruplex o reclutar remodeladores de cromatina. Además, el complejo formado, posterior a la reparación, entre OGG1 y su 8-oxoG, sin productos de reparación, aumenta los niveles de pequeñas GTPasas activas e induce cascadas de señalización posteriores para desencadenar expresiones génicas [Wang y col., 2018]. Por ejemplo, un factor de transcripción que requiere de OGG1 es NF- κ B, las lesiones 8-oxoG inducidas por ERO, en y cerca de los sitios de unión de NF- κ B, reclutan un OGG1 catalíticamente inactivo, que, a su vez, dobla bruscamente el ADN, lo que facilita el reclutamiento de NF- κ B y un complejo de iniciación de la transcripción.

El restablecimiento de la homeostasis redox daría como resultado la reactivación de la función catalítica de OGG1, la escisión de la lesión y la reparación [Sampath y Lloyd, 2019]. Un estudio reveló que OGG1 también puede reclutar

remodeladores y modificadores de cromatina para modular la expresión génica [Wang y col., 2018]. La actividad de OGG1 está modulada por modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación, que podría permitir la relocalización de la enzima en el núcleo, y acetilación, que parece aumentar significativamente la renovación enzimática de OGG1 en presencia de APE1, y la fracción acetilada intracelular de la enzima aumenta aproximadamente 2,5 veces después del estrés oxidativo [Boiteux y col., 2017]. Existe evidencia que mutaciones somáticas poco frecuentes en OGG1 conlleva a diferentes tipos de cáncer, como gástrico, de cabeza y cuello, pulmón y riñón humano [Boiteux y col., 2017]. Además, algunos datos sugieren una correlación entre la reparación reducida de 8-oxoG en el cerebro debido a alteraciones heterocigotas de OGG1 y enfermedad de Alzheimer (EA) en humanos; por lo tanto, el desarrollo de inhibidores de OGG1 podría ser útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, inflamación y accidente cerebrovascular [Boiteux y col., 2017].

Experimentos recientes en ratones *knock-out* homocigotas para OGG1 (Ogg1 -/-), han mostrado que, con el aumento de la edad, los ratones Ogg1 -/- tendían a ser significativamente más pesados respecto a los wild type (WT), además acumulaban más tejido adiposo, desarrollaban resistencia a la insulina y un estado pre-diabético en comparación a los ratones WT. Finalmente, se reportó que la expresión del coactivador transcripcional, el activador gamma del receptor activado por proliferador de peroxisomas 1-alfa (PGC1 α), que regula la biogénesis mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos, fue significativamente menor en ratones Ogg1 -/- [Sampath y Lloyd, 2019].

Endonucleasa AP (APE1): también llamada HAP1, APEX1 and REF-1 [Khobta y Epe, 2013], además de su actividad endonucleasa, posee funciones 3'-5'

exonucleasa y 3'-fosfodiasterasa, que están altamente conservadas desde *Escherichia coli* hasta humanos [Wallace, 2014]. La porción N-terminal de la proteína está dedicada a la función de coactivación transcripcional, y el dominio C-terminal ejerce la actividad endonucleasa en los sitios abásicos de ADN [Antoniali y col., 2014]. Es propensa a múltiples modificaciones post-traduccionales, que afectan tanto la actividad endonucleasa como las funciones reguladoras de la transcripción de la proteína. La S-glutacionilación, adición de grupos glutatión en residuos cisteína, es la modificación que se produce en respuesta al estado redox alterado de la célula en APE1, inhibiendo el 90% de las escisiones de sitios AP, así como también, generando complejos inestables de APE1-ADN [Limpose y col., 2017]. La relevancia de APE1 para la supervivencia celular se demuestra por el hecho de que la eliminación del gen APE1 induce apoptosis en células diferenciadas o falla del desarrollo durante la embriogénesis [Antoniali y col., 2014].

Las evidencias acumuladas han indicado que la desregulación de APE1 tanto en la expresión como en la localización subcelular está de hecho asociada con diferentes procesos tumorigénicos: la regulación positiva de APE1 o la expresión desregulada se ha descrito en una variedad de cánceres, que incluyen pulmón, próstata, pancreático, ovario, cuello uterino, mama, glioblastoma, células germinales, rhabdomiosarcoma, y colon [Antoniali y col., 2014; Li y col., 2018]. Además, se ha informado que los niveles elevados de APE1 y la localización intracelular anómala también se correlacionan típicamente con una proliferación agresiva y una mayor resistencia a los fármacos quimioterapéuticos y a la radiación ionizante, lo que implica que APE1 mejora la reparación y la supervivencia de las células tumorales.

APE1 tiene un importante papel tanto en la reparación del ADN como en el metabolismo del ARN (biogénesis de ribosomas, maduración/empalme de pre-ARNm y catabolismo de ribonucleótidos), y es que esta dualidad preservaría la estabilidad genética [Antoniali y col., 2014]. APE1 además es un regulador sensible a redox de varios factores de transcripción, como NF- κ B y p53 [Khobta y Epe, 2013]. APE1 es parte de un complejo multiproteico que incluye hOGG1, Ku70 y RNA Pol II, que se recluta en el promotor SIRT1 para regular las funciones del gen SIRT1 durante la respuesta temprana al estrés oxidativo [Antoniali y col., 2014]. En tanto, SIRT1 tiene como objetivo de desacetilación a APE1, promoviendo la actividad endonucleasa de esta enzima, esta interacción física y funcional aumenta cuando la demanda de *BER* aumenta, como ocurre con los insultos genotóxicos [Yamamori y col., 2010].

La eliminación de ambos alelos de APE1 en ratones conduce a la letalidad embrionaria, y la deficiencia en las células puede promover la muerte celular; además, APE1 tendría un papel crítico en la protección del ADN de los telómeros en muchos tipos de células diferentes [Li y col., 2018].

ADN polimerasa β : también conocida como Pol β , se une a los sitios abásicos escindidos y utiliza la cadena intacta y sin daños como molde para la síntesis de ADN, agregando un solo nucleótido en la reparación de parche corto, (Pol δ o Pol ϵ suman hasta 13 nucleótidos en la reparación de parche largo) al grupo hidroxilo 3' del nucleótido 5' del *nick*. El fosfato de desoxirribosa restante se elimina por la actividad dRPasa de Pol β en la reparación de parches cortos (mientras que el tramo 5' de nucleótidos desplazados durante la reparación de parches largos es escindido por la endonucleasa FEN-1) [Hinz y Czaja, 2015]. Pol β es una enzima que sufre varios tipos de modificaciones post-traduccionales, las más destacadas son

acetilaciones y metilaciones, que modulan sus actividades liasas y ADN polimerasa [Carter y Parsons, 2016].

ADN ligasa I y III α : la ligasa I se estabiliza formando complejo con PCNA, mientras que la ligasa III α lo hace formando un complejo con la proteína *scaffold* XRCC1 [Krokan y Bjoras, 2013], siendo ambas moduladas por varias modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilaciones [Carter y Parsons, 2016]. Es una enzima dependiente de ATP que utiliza un mecanismo de reacción de tres pasos: después de la formación de un intermedio covalente de enzima-adenilato (paso 1), el grupo adenilato se transfiere al terminal 5-fosfato en un *nick* de ADN (paso 2) seguido por la formación de enlaces fosfodiéster (paso 3) [Beard y col., 2019].

Reparación por escisión de bases y desmetilación activa

Existen cambios heredables en la estructura y organización del ADN, los mismos no involucran cambios en la secuencia y modulan la expresión génica. Las modificaciones de cromatina en mamíferos pueden ocurrir por metilaciones en islas CpG o citosinas en dinucleótidos CpG aislados del ADN, modificaciones de histonas (que suelen ser metilaciones y acetilaciones) y por acción de ARN no codificantes [Langie y col., 2017].

Hay tres fases de metilación del ADN: establecimiento (metilación de ADN *de novo*), mantenimiento y desmetilación [Greenberg y Bourc'his, 2019].

La metilación del ADN es clave para muchos procesos biológicos, incluida la impronta genómica, la determinación del destino celular, inactivación del cromosoma X, silenciamiento de elementos génicos móviles, la organización de la arquitectura de la cromatina y la regulación de la expresión génica [Liu y col., 2016; Bochtler y col., 2017]. Si bien la metilación del ADN ha sido generalmente asociada

con la represión transcripcional, estudios recientes han indicado que la metilación del ADN también puede estar asociada con la activación transcripcional [Sweatt y col., 2013]. En general, la metilación de islas de CpG localizadas en las regiones promotoras o potenciadoras de genes está asociada con la represión de la transcripción, mientras que la metilación dentro del cuerpo de un gen dado se ha correlacionado positivamente con la expresión génica [Gavin y col., 2013; Langie y col., 2017].

Típicamente una isla CpG tiene al menos 200pb con más de 50% de contenido de guaninas y citosinas, estas regiones se solapan con regiones promotoras en 50-60% de los genes en humanos. Se ha estimado que la 5-metil citosina (5-mC) es aproximadamente 1% del total de bases nitrogenadas del ADN y representa de 70 a 80% del total de dinucleótidos CpG en el genoma.

La metilación del ADN ocurre por modificación covalente del quinto carbono (C5) en la citosina por la enzima ADN metiltransferasa (DNMT), siendo establecida por dos DNMT de *novο*, DNMT 3a y DNMT 3b, y mantenida por DNMT 1. En los mamíferos, las enzimas DNMT 3a y DNMT 3b contienen un dominio DNMT altamente conservado (el dominio MTasa) en el terminal carboxi y dos dominios de lectura de cromatina [Greenberg y Bourc'his, 2019]. Se cree que las DNMT se reclutan al ADN, a través de sus interacciones con factores de transcripción, proteínas de cromatina, así como otras proteínas [Gavin y col., 2013; Liu y col., 2016]. En tanto que la metilación de ADN de *novο* puede ocurrir en cualquier contexto de la secuencia, solo se mantiene la metilación simétrica de CpG tras la replicación del ADN (Figura 1.8). Esto depende de la actividad de la enzima de mantenimiento de DNMT 1 junto a otra proteína multidominio, llamada E3

ubiquitina-proteína ligasa UHRF1, ya que libera a DNMT 1 de su autoinhibición [Greenberg y Bourc'his, 2019].

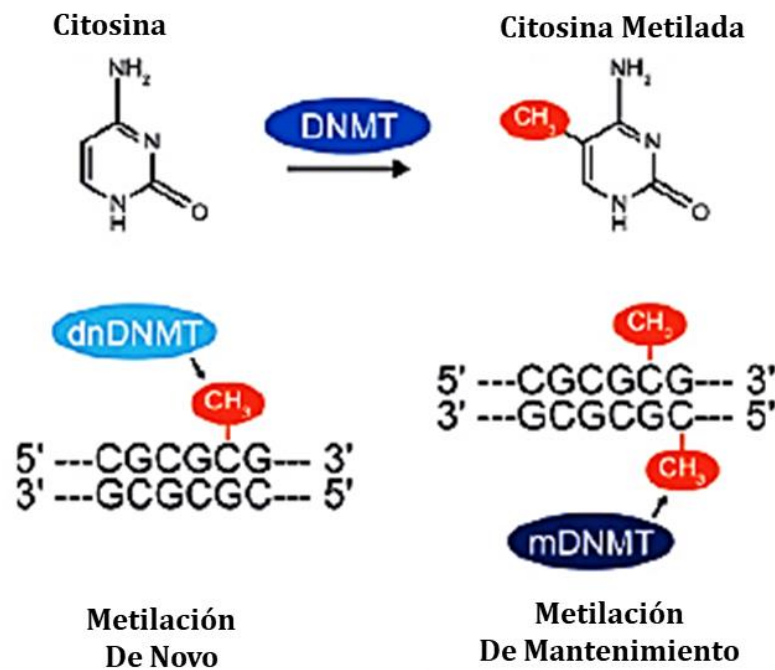


Figura 1.8: Tipos de Metilaciones en el ADN [modificado de Sweatt y col., 2013]

Aunque originalmente se consideraba que la desmetilación de ADN ocurría solo de forma pasiva, por ejemplo a través de la inhibición de DNMT1 [Liu y col., 2016; Schuermann y col., 2016], actualmente está documentado que ocurre también por un proceso activo, observándose en células post-mitóticas de cerebro adulto y durante cambios de destino celular [Liu y col., 2016; Bochtler y col., 2017]. Existe evidencia de la desmetilación activa del ADN en el SNC adulto en respuesta al entrenamiento conductual de condicionamiento por miedo [Sweatt y col., 2013].

La desmetilación puede ocurrir mediante la oxidación del grupo metilo por la enzima dioxigenasa TET (del Inglés: *ten-eleven translocation*) o a través de ERO, que forman 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), oxidándose progresivamente a 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC), para finalmente ser restaurada en

citocinas no modificadas por la vía de reparación de escisión de base (Figura 1.9)
[Liu y col., 2016; Langie y col., 2017; Greenberg y Bourc'his, 2019].

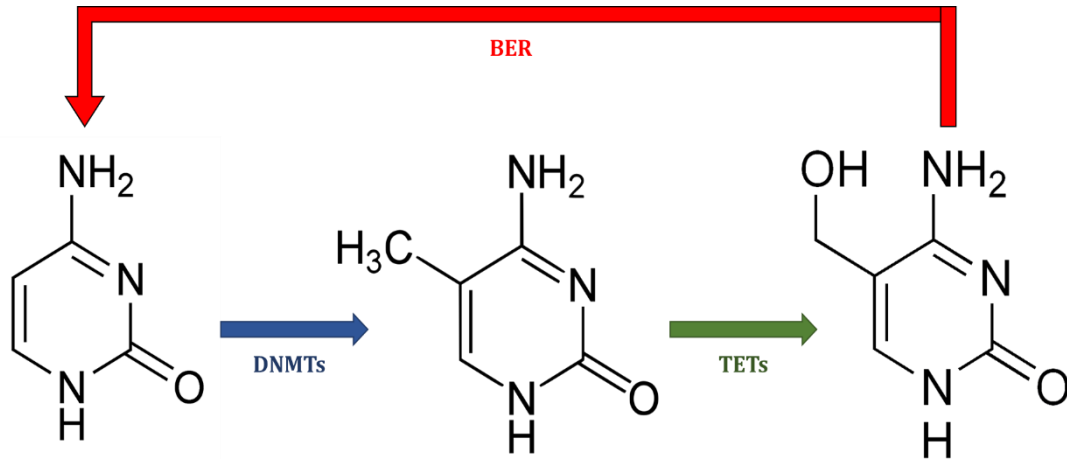


Figura 1.9: Cascadas de modificaciones enzimáticas en citosina [modificado de Schuermann y col., 2016]

Creciente evidencia experimental indica que la regulación epigenética de la cromatina constituye un mecanismo molecular central del reloj circadiano, el cual lo utiliza para generar expresión rítmica de diversos genes y establecer una relación de fase estable entre la expresión génica, la fisiología y el comportamiento de un animal y el medio ambiente [Sweatt y col., 2013].

3- ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso extremadamente complejo y multifactorial que ocasiona en los individuos el deterioro progresivo de las funciones [da Costa y col., 2016] y un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad con el tiempo [Zhang y col., 2017]. Los signos de envejecimiento comienzan después de la pubertad, cuando todas las funciones fisiológicas comienzan a declinar gradualmente, estos cambios relacionados con la edad incluyen aspectos fundamentales de la biología

como la disfunción metabólica, la inestabilidad genómica, la falla de los mecanismos de control de calidad, la interrupción de las vías celulares que controlan el crecimiento y el reciclaje, la falla en la integridad de la comunicación célula-célula y la pérdida de la capacidad regenerativa [Balasubramanian y col., 2017].

La edad es un factor de riesgo sólido e independiente para una variedad de enfermedades no transmisibles como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas [Balasubramanian y col., 2017]. También para los desórdenes y déficits motores [Bernard y Seidler, 2014].

Los mecanismos biológicos y celulares precisos responsables del envejecimiento no se han terminado de dilucidar, es probable que el envejecimiento sea originado por una gran variedad de factores complejos e interrelacionados, incluyendo: daños en proteínas y en el ADN inducidos por el estrés oxidativo [Khan y col., 2017], una insuficiente reparación del ADN [Johnson y col., 2019], la inestabilidad de los genomas mitocondriales y nucleares [Fang y col., 2016], un estado de inflamación crónica no infecciosa causada por el aumento de producción de adipocinas y citocinas [Fougère y col., 2019], alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos, incluyendo la excesiva liberación de ácidos grasos libres en plasma, con la consiguiente resistencia a la insulina de los tejidos [Semba y col., 2018], acumulación de productos finales del metabolismo, tales como los de glicosilación avanzada, productos amiloides y proteínas que interfieren con la función normal de las células [Caldeira y col., 2017], la pérdida de células post-mitóticas resultando en una disminución del número de neuronas y células musculares, así como deterioro de la estructura y función de las células en todos los tejidos y órganos [Carmona y Michan, 2016]. Diversos estudios apoyan la idea

de que el estrés oxidativo es un marcador importante de la senescencia en diferentes especies [Moldogazieva y col., 2019].

Teorías del Envejecimiento

Existen varias teorías que tratan de explicar el proceso de envejecimiento, cada una desde su propia perspectiva. Dichas teorías no son mutuamente excluyentes, ya que ninguna puede explicar todos los detalles del mencionado proceso. Se ha propuesto una clasificación de las teorías y mecanismos biológicos del envejecimiento en tres categorías: evolutiva, molecular-celular y sistémica (Figura 1.10) [Teixeira y Guariento, 2010].

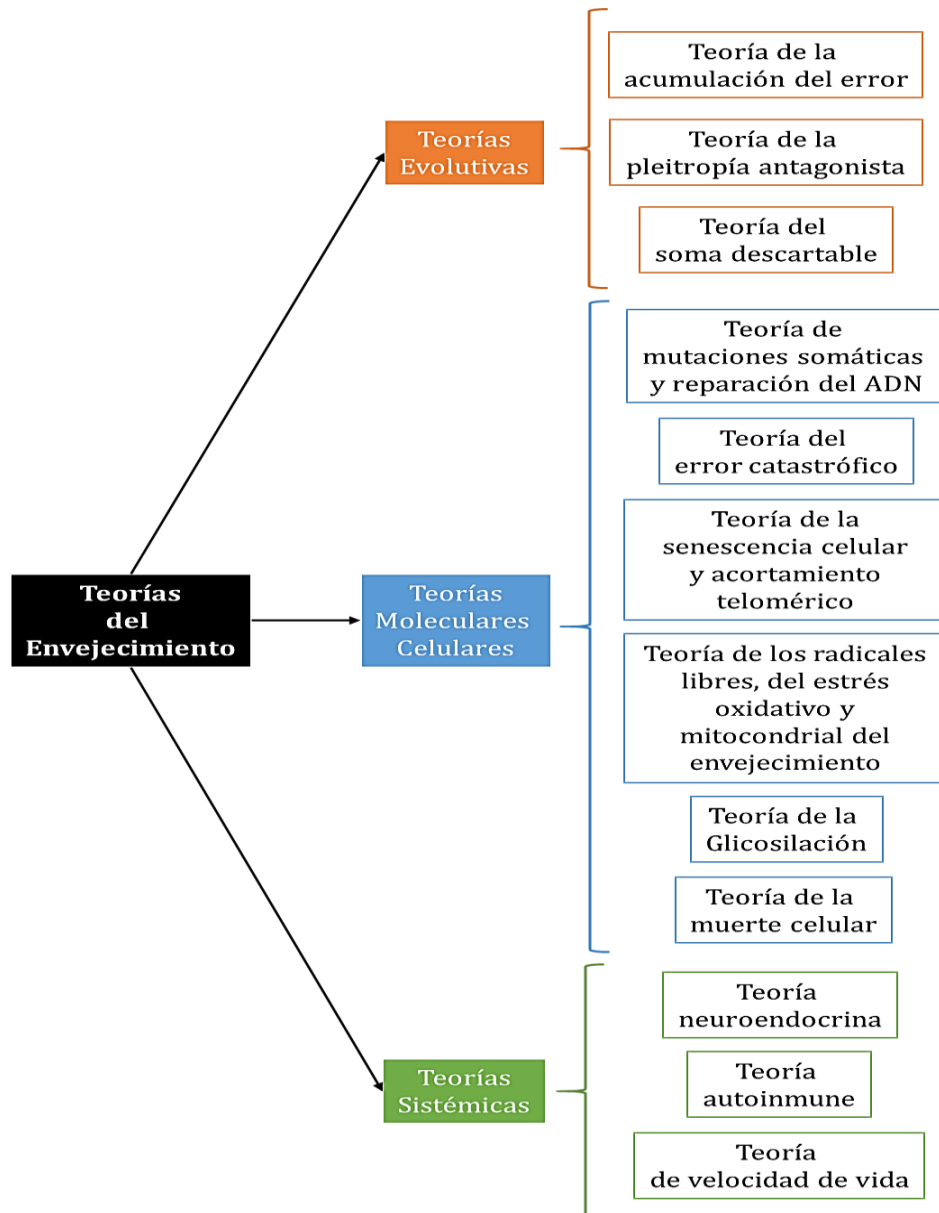


Figura 1.10: Esquema sobre las Teorías del Envejecimiento

Teorías Evolutivas

Estas teorías buscan explicar las diferencias de longevidad entre especies.

-La **teoría de la acumulación de error** argumenta que las mutaciones deletéreas que escapan a los mecanismos de corrección del código genético pueden acumularse pasivamente sin resistencia [Teixeira y Guariento, 2010; Johnson y col., 2019].

-La **teoría de la pleiotropía antagonista** postula que existen genes con efectos beneficiosos durante juventud, que se vuelven perjudiciales en la etapa tardía de la vida [Teixeira y Guariento, 2010; Johnson y col., 2019].

-La **teoría del soma descartable** propone que, debido a que los recursos celulares son limitados, y la energía es finita entonces la energía debe tener como objetivo mejorar la capacidad de salud reproductiva del individuo por lo que el envejecimiento resultaría de la acumulación gradual de defectos somáticos [Teixeira y Guariento, 2010; Johnson y col., 2019].

Teorías Moleculares-Celulares

Otra posible causa del envejecimiento puede deberse a una interacción de mecanismos moleculares, celulares y sistémicos que se explican en las siguientes teorías:

- La **teoría del error catastrófico** propone que puede ocurrir la acumulación de errores en la transcripción y en la traducción disminuyendo la fidelidad de la maquinaria molecular introduciendo errores que podrían dar un resultado incompatible con la vida [Teixeira y Guariento, 2010].

- La **teoría de mutaciones somáticas y reparación del ADN** establece que dosis subletales de radiación inducen mutaciones que finalmente conducen a la muerte. La *teoría de la reparación del ADN* es un ejemplo específico de la teoría de la mutación somática, dado que la tasa de errores de replicación del ADN puede llegar al 0,01%. Ciertos genes acumulan más errores a lo largo del tiempo y algunas regiones del genoma, como los telómeros, muestran mutaciones puntuales por encima de la media [Teixeira y Guariento, 2010].

- La **teoría de senescencia celular y acortamiento telomérico**

propone que una de las causas de la senescencia celular se debe a que, durante el proceso de replicación del ADN en las células eucariotas, se pierde una pequeña cantidad de ADN en cada extremo del cromosoma, en cada división celular, lo que resulta en un acortamiento de los telómeros [Teixeira y Guariento, 2010; Cefalu, 2011].

- La **teoría de los radicales libres, teoría del estrés oxidativo y teoría mitocondrial del envejecimiento**. Harman [1972] propuso por primera vez, que el envejecimiento normal resulta, en parte, del daño ocasionado por los radicales libres en los tejidos, de manera azarosa y, posteriormente, se centró en la mitocondria como generadora de radicales libres. El grado de estrés oxidativo es proporcional a la concentración de radicales libres, que depende de su velocidad de formación y extinción. Las principales causas del aumento de la producción de radicales libres incluyen: causas *endógenas* (elevación de la concentración O₂, aumento de la fuga mitocondrial, inflamación, entre otros) y causas *exógenas* (medio ambiente -contaminación, pesticidas, radiación-, tabaquismo, mala nutrición, trastornos y enfermedades crónicas, inflamación crónica, ejercicio extenuante y estrés psicológico y emocional) [Sohal y col., 1995].

Habitualmente, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O₂), con los electrones que forman el enlace *p* con el mismo espín, es decir, en estado triplete. Bajo esta forma, el oxígeno es poco reactivo en condiciones fisiológicas. Sin embargo, a causa de reacciones químicas, enzimáticas o por efecto de radiaciones ionizantes, se pueden generar una serie de especies químicas inestables, altamente reactivas, capaces de reaccionar con múltiples compuestos en el organismo. Los radicales libres pueden definirse como moléculas o fragmentos moleculares que

contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares [Hu y col., 2021]. Este electrón desapareado usualmente le brinda un elevado grado de reactividad al radical libre. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuas y difusibles que se originan por múltiples reacciones bioquímicas en varios sistemas celulares localizados en la membrana plasmática, membranas de mitocondrias y retículo endoplásmico, y en el citosol y peroxisomas, entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial y la cadena de transporte de electrones en microsomas y cloroplastos. [Hu y col., 2021]. La cadena de transporte de electrones mitocondrial se considera como la fuente predominante de precursores de especies reactivas del oxígeno (ERO), como también las NADPH oxidasas de la membrana plasmática. Las principales ERO son: anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^\bullet), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), ozono (O_3) y radical peróxido (ROO^\bullet) [Hu y col., 2021].

El estrés oxidativo es principalmente producto de un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad del sistema de defensa antioxidante y está implicado en una gran variedad de alteraciones fisiopatológicas, contribuyendo a la inducción de distintas enfermedades [Hu y col., 2021]. El estrés oxidativo causa daño a las principales macromoléculas celulares, incluyendo proteínas, lípidos y ADN. En particular, el daño oxidativo del ADN abarca tanto el daño del ADN nuclear como el daño del ADN mitocondrial [Hu y col., 2021].

La teoría del estrés oxidativo como causa del envejecimiento sostiene que el aumento de las ERO acompaña el envejecimiento y dan lugar a alteraciones funcionales, condiciones patológicas, e incluso la muerte [Teixeira y Guariento, 2010; Cefalu, 2011]. Según esta teoría, el aumento de estrés oxidativo tiene un papel importante en diversas enfermedades crónicas relacionadas con la edad. Se

ha observado que los mamíferos de edad avanzada contienen altas cantidades de lípidos y proteínas oxidadas, así como ADN dañado/mutado, en particular en el genoma mitocondrial [Harman, 1972; Cefalu, 2011]. En apoyo de esta teoría mitocondrial del envejecimiento, se ha encontrado un incremento asociado con la edad de daño en el ADN mitocondrial [Moldogazieva y col., 2019]. Las mitocondrias son la principal fuente de agentes oxidantes, que tienen el potencial de reaccionar con diversos constituyentes y destruirlos. Las mitocondrias dañadas pueden provocar una crisis energética en la célula, debido a la disminución de la capacidad celular de generar ATP, conduciendo a la senescencia y al envejecimiento del tejido. Además, la disfunción mitocondrial ocasiona, a su vez, una alta generación de ERO, incrementando el daño celular [Teixeira y Guariento, 2010]. Los cambios oxidativos relacionados con la edad son más comunes en las células no proliferativas, como las neuronas y cardiomiocitos, dado que no hay un "efecto de dilución" de las estructuras dañadas a través de la división celular [Terman, 2001].

- La **teoría de Glicosilación**. La glicosilación (es decir, la unión de cadenas de polisacáridos –glicanos- a las proteínas) es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes de proteínas y lípidos [Franzka y col., 2021]. Es un proceso complejo que involucra 13 tipos de monosacáridos diferentes unidos a 8 tipos de residuos de aminoácidos que conducen a un total de al menos 41 enlaces que representan los productos de la *N*- y *O*-glicosilación, *C*-manosilación, fosfoglicación y glicación, y es asistido por numerosas enzimas diferentes [Shental-Bechor y Levy, 2008]; además, comienza en el retículo endoplásmico durante la síntesis de proteínas en el ribosoma [Shental-Bechor y Levy, 2008], siendo relevante para la mayoría de las proteínas de membrana plasmática y secretadas. El estado de glicosilación de las proteínas puede afectar su estabilidad

y conformación. Por lo tanto, la glicosilación juega un papel importante en muchos procesos biológicos, incluida la comunicación de célula a célula, la interacción célula-matriz, la adhesión, la orientación y el plegamiento de proteínas, la infección viral o bacteriana, el cáncer y el envejecimiento [Franzka y col., 2021].

El estrés oxidativo induce reacciones de peroxidación lipídica y glucoxidación, que conducen a la formación de productos finales de glicosilación avanzada. Los compuestos producto de estas reacciones se acumulan con la edad, pudiendo llevar a dañar la fisiología celular y orgánica [Teixeira y Guariento, 2010; Moldogazieva y col., 2019]. Además, existe evidencia de que la glicosilación contribuye a la formación del péptido β -amiloide [Teixeira y Guariento, 2010].

- La **teoría de muerte celular** propone que la desregulación de la muerte celular programada puede contribuir al envejecimiento, algo que se ha observado en miocitos, neuronas e incluso células T, sin embargo, aún se necesita más investigación acerca de la relación entre muerte celular y mecanismos moleculares del envejecimiento [Teixeira y Guariento, 2010].

Teorías Sistémicas

Basadas principalmente en tres sistemas que son indispensables para la vida:

- La **teoría neuroendocrina** postula que con el envejecimiento y en respuesta al estrés, los mecanismos de retroalimentación del eje hipotálamico-pituitario-suprarrenal podrían presentar déficits. Generando de esta manera hormonas o metabolitos que podrían volverse tóxicos para algunas neuronas y causar una falla en el control de retroalimentación y la característica cíclica de algunas hormonas. Con el aumento de la edad en el ser humano hay una

disminución significativa en la secreción de hormonas por las glándulas tiroideas, la corteza suprarrenal, los testículos y los ovarios; y mientras que, en el ser humano, la disminución en la secreción de esteroides testiculares y ováricos parece deberse a cambios primarios de edad en las gónadas, en la rata los cambios en la edad en los mecanismos reguladores centrales parecen ser responsables del envejecimiento gonadal [Everitt, 1980]. Esta discrepancia en la retroalimentación del sistema neuroendocrino daría lugar a algunos cambios característicos de la senescencia [Teixeira y Guariento, 2010; Cefalu, 2011].

- La **teoría autoinmune** hipotetiza que el cuerpo de un organismo esencialmente comienza a producir autoanticuerpos contra sus propios tejidos y/o la producción de déficits adquiridos con el tiempo principalmente en la función de las células T. La inmunosenescencia se caracteriza por una disminución de la resistencia a las enfermedades infecciosas, una disminución de la protección contra el cáncer y una menor competencia para el autorreconocimiento, como ocurre en las enfermedades autoinmunes [Cefalu, 2011; Teixeira y Guariento, 2010].

- La **teoría de velocidad de vida** fue propuesta por Pearl en 1928, la misma considera que el consumo de energía representa una limitación a la longevidad, ya que la generación de ERO está involucrada en la senescencia celular. El soporte empírico de esta teoría se basa en la alteración de la tasa metabólica de los poiquiloterms. Estos animales muestran un aumento en la frecuencia respiratoria con el aumento de temperatura. Experimentalmente, se ha demostrado que la longevidad de los poiquiloterms tiene una relación inversa con la temperatura o con la intensidad de la actividad física que realizan a una temperatura específica. Por lo que propone que el consumo calórico representa

una limitación en la longevidad, sin embargo, sus postulados requieren mayor investigación [Teixeira y Guariento, 2010].

Las teorías mencionadas presentan en común la idea del daño celular, y es bien conocido que la exposición a ERO es causante de diferentes tipos de daño celular, peroxidación de lípidos, proteínas, daños en el ADN, mayor velocidad en el acortamiento de los telómeros, entre otros [Cefalu, 2011].

Si bien aún no reconocida como otra teoría de envejecimiento, a la fecha, existen también evidencias de la existencia de alteraciones en los ritmos circadianos comportamentales, bioquímicos y fisiológicos, que precederían y caracterizarían al envejecimiento [Cornelissen y Otsuka, 2017; Acosta y col., 2020].

4- RESTRICCIÓN CALÓRICA

La restricción calórica (RC) es la única intervención conocida, hasta el momento, capaz de prolongar la vida de manera consistente y reproducible en varios modelos animales. Consiste en la reducción crónica de la ingesta de calorías; los distintos trabajos plantean una reducción de la disponibilidad de calorías entre un 10% y un 50%, sin desnutrición [Cornelissen y Otsuka, 2017; Madeo y col., 2019; Pifferi y Aujard, 2019].

La RC es una de las estrategias no farmacológicas que se ha demostrado repetidamente que prolonga la vida útil en todos los taxones [Cornelissen y Otsuka, 2017; Gensous y col., 2019]. En experimentos en humanos sanos, la RC reduce los niveles de TNF α circulante y factores de riesgo cardiometabólicos (triglicéridos, colesterol y presión arterial), mientras que, en humanos obesos, la RC promueve una pérdida de peso significativa, reducción de los niveles del factor de crecimiento

de insulina 1 (IGF-1) y mejora la salud general. La RC promueve la longevidad al impactar en vías altamente conservadas en todas las especies, incluyendo la inhibición de IGF-1 y mTOR, así como la activación de las vías de señalización SIRT1, NAMPT, AMPK, FGF-21 y PGC-1 α [Acosta-Rodriguez y col., 2021].

En ratones, a los que se aplicó un sistema de alimentación automatizado que controla la cantidad, la duración y el momento de la disponibilidad de alimentos y también registra la alimentación y la actividad voluntaria de correr en rueda, mostró que los animales con RC se autoimpusieron un componente temporal al consolidar la ingesta de alimentos y aumentar inesperadamente la actividad de correr sobre rueda durante su período de descanso [Acosta-Rodríguez y col., 2017].

La RC reduce la aparición de varias enfermedades, entre las que se encuentran la aterosclerosis, el cáncer, la diabetes, las enfermedades renales, neurodegenerativas y respiratorias [Madeo y col., 2019; Pifferi y Aujard, 2019].

En el sistema nervioso central, la RC aumenta la expresión de proteínas reparadoras del ADN y antiestrés, mejora la eficiencia del metabolismo de la glucosa y retrasa la aparición de citocinas inflamatorias [Hadad y col., 2018]. También retrasa la neurodegeneración y la disfunción sináptica, mejora la función neuroendocrina y promueve la inducción de genes activos en la neuroprotección neuronal, crecimiento, y función sináptica y neuronal (Figura 1.11) [Hadad y col., 2018].

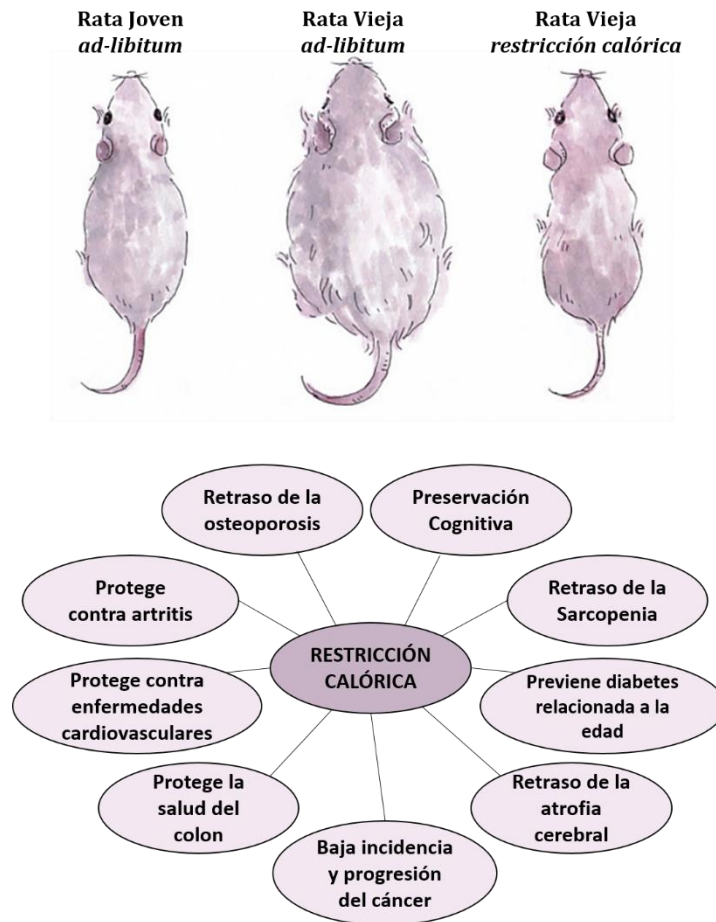


Figura 1.11: Restricción calórica y sus beneficios [modificado de Balasubramanian y col., 2017; Ma y col., 2020]

Los efectos beneficiosos de la RC se producen a través de una gama extremadamente amplia de mecanismos moleculares, entre las cuales los factores epigenéticos han ganado interés recientemente [Gensous y col., 2019].

Restricción Calórica y metabolismo

La autofagia (proceso catabólico en el que un sistema de degradación intracelular entrega componentes citoplásmicos al lisosoma) se induce tras la privación de nutrientes y desempeña un papel importante en los efectos beneficiosos que ejerce la RC. La RC modula varios factores moleculares claves involucrados en la regulación y ejecución de autofagia, señalización de nutrientes y

metabolismo energético. Existe evidencia que la RC activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), un sensor energético; también activa, directa e indirectamente, las sirtuinas (SIRT), que son lisina desacetilasas dependientes de NAD⁺, y desempeñan funciones centrales durante el envejecimiento y la autofagia [Madeo y col., 2019]. La correlación inversa entre la ingesta calórica y la esperanza de vida involucra reguladores sensibles a los nutrientes en los mecanismos de la RC.

Es de notar que la autofagia y la acetilación de proteínas están sujetas a fluctuaciones circadianas. Esta oscilación circadiana se pierde con el envejecimiento y se ha propuesto como un modulador de la RC, aunque no se ha llegado a un consenso al respecto. El mantenimiento de la (des)acetilación rítmica por RC está hipotéticamente vinculado a niveles elevados de NAD⁺ y la activación de SIRT1 [Madeo y col., 2019].

Sirt1: histonas desacetilasas de clase III que requieren NAD⁺ para su actividad enzimática y funcionan como sensores de energía celular sensibles a la relación intracelular NAD⁺/NADH. El reloj circadiano actúa sobre la síntesis de NAD⁺, controlando la expresión circadiana del gen Nampt [Orozco-Solis y Sassone-Corsi, 2014]. Además, el reloj dirige a una gran variedad de proteínas, tanto histonas como no histonas, incluidas FOXO1, PGC1 α , p53, E2F1, PPAR γ , STAT3 y SREBP-1c [Orozco-Solis y Sassone-Corsi, 2014]. La actividad de SIRT1 oscila de manera circadiana, desacetilando rítmicamente la histona H3K9/K14 en los promotores de CCG y de las propias proteínas del núcleo del reloj circadiano, BMAL1 y PER2 [Orozco-Solis y Sassone-Corsi, 2014]. Se ha sugerido que la actividad de SIRT1 contrarresta la función rítmica de la histona acetiltransferasa CLOCK, aunque es probable que otros HAT estén implicados [Orozco-Solis y Sassone-Corsi, 2014]. Si bien, es reconocida la participación de SIRT en la

regulación epigenética de factores del reloj celular endógeno, existen sólo unos pocos reportes sobre su expresión y actividad circadiana en tejidos como el hepático o el muscular [Nakahata y col., 2009], no habiéndose investigado aún su variación temporal y la importancia de la misma en cerebelo y otras áreas cerebrales.

La expresión de Sirt1 se activa durante el ayuno para aumentar la oxidación de los ácidos grasos y la gluconeogénesis, y suprimir la secreción de insulina, la acción de la insulina y la adipogénesis. SIRT1 juega un papel relevante en el sistema nervioso central ya que modula la función cognitiva, la plasticidad sináptica y el aprendizaje [Rickert y col., 2019]. Es importante destacar que evidencia reciente ha demostrado que los niveles de NAD⁺ disminuyen durante el envejecimiento, lo que afecta la actividad de SIRT1 [Orozco-Solis y Sassone-Corsi, 2014].

5- FUNCIÓN DEL CEREBELO

El enfoque en la función motora del cerebelo (literalmente "pequeño cerebro" en Latín) surgió a principios del siglo XIX tras cuidadosas observaciones en modelos animales de daño cerebeloso e incluso su posición anatómica sobre la médula espinal (Figura 1.12) y los déficits observados en pacientes neurológicos llevaron a referirse al cerebelo como el "ganglio del sistema propioceptivo de la cabeza" [Buckner, 2013].

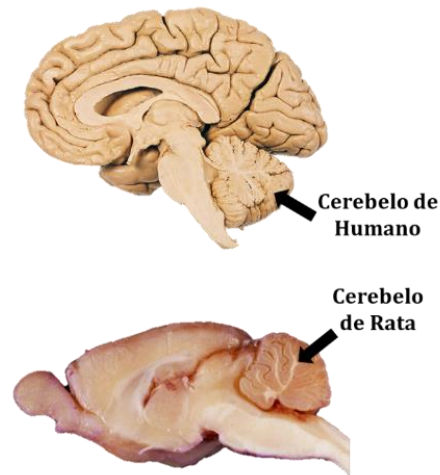


Figura 1.12: Posición anatómica del cerebelo en ser humano y rata

El cerebelo es una estructura cerebral central profundamente integrada en los circuitos principales con la corteza cerebral, el tronco encefálico y la médula espinal. Muestra una organización regional compleja que consta de lóbulos con orientación sagital [D'Angelo, 2018]. Esta estructura cerebral participa en el control motor, y su lesión provoca un síndrome de descoordinación del movimiento, denominado ataxia. El cerebelo está interconectado con el cerebro contralateral principalmente a través de dos circuitos polisinápticos: un canal de entrada que hace sinapsis en la protuberancia y luego cruza al cerebelo, y un canal de salida que se proyecta primero a los núcleos cerebelosos profundos (DCN), luego al tálamo y finalmente a la corteza cerebral (Figura 1.13) [Buckner, 2013].

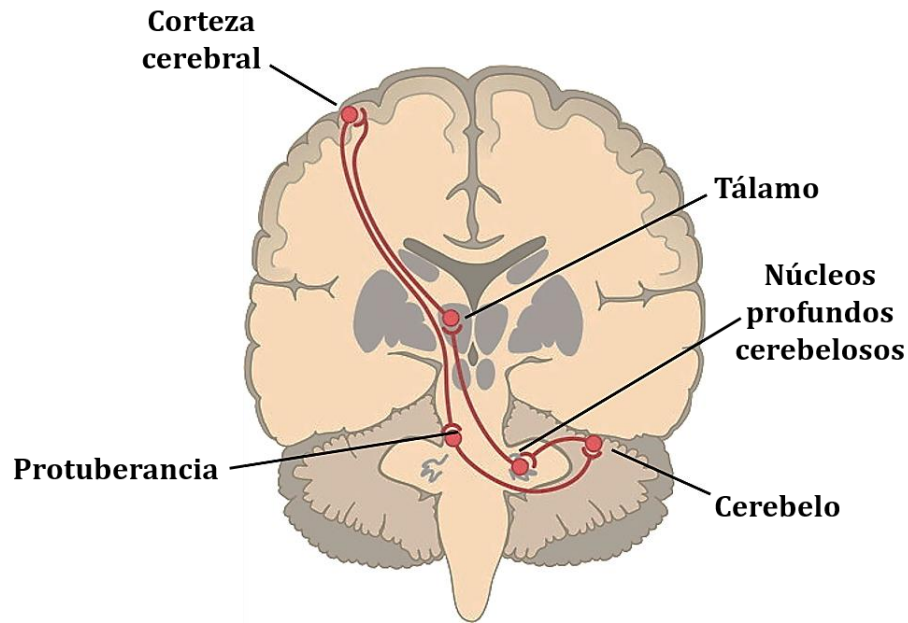


Figura 1.13: Circuito cerebrocerebelar en ser humano [modificado de Buckner, 2013]

El cerebelo se caracteriza por una organización neuronal muy estereotipada con dos tipos de entradas: fibras musgosas y trepadoras. Estas entradas no sólo llevan la información desde la médula espinal sobre los movimientos en curso en todas las diferentes partes del cuerpo, sino también la información de los diferentes centros motores sobre los movimientos planificados, incluso antes de que se haya ejecutado un movimiento. El cerebelo se subdivide en un gran número de diferentes regiones que procesan diferentes tipos de información. Estas regiones responden a través de sus neuronas de salida, llamadas células de Purkinje. La corteza cerebelosa contiene sólo interneuronas inhibitorias, y dos sistemas de entrada, fibras trepadoras y fibras musgosas (a través de las células granulares), y proporcionan los componentes excitadores.

Por lo tanto, las señales que ingresan al cerebelo a través de las fibras musgosas se procesan en la capa granular y se transmiten a las células de Purkinje, mientras que una vía colateral activa los núcleos cerebelosos profundos (DCN). Las

células de Purkinje, a su vez, inhiben los DCN, de modo que la corteza cerebelosa funciona como un bucle lateral que controla los DCN [D'Angelo, 2018].

El cerebelo y su rol sobre las capacidades cognitivas

Observaciones recientes también implican la participación del cerebelo en la cognición y el control ejecutivo, con un impacto en patologías como la dislexia y el autismo [D'Angelo, 2018]. Los descubrimientos que comenzaron en la década de 1980 sentaron las bases para replantear el papel del cerebelo en la cognición. Al comparar la topografía de las proyecciones dentatotalámicas y talamocorticales, dedujeron que el canal de salida del cerebelo contiene proyecciones sustanciales hacia áreas de asociación cerebral, incluidas las que se encuentran dentro de la corteza prefrontal [Buckner, 2013].

Ahora se sabe que el aprendizaje ocurre a través de la plasticidad sináptica en múltiples sinapsis en la capa granular, capa molecular y DCN, extendiendo el concepto original de la Teoría del Aprendizaje Motor que predijo una forma única de plasticidad en la sinapsis entre fibras paralelas y células de Purkinje debajo de la supervisión de las fibras trepadoras derivadas del olivo inferior.

Con respecto a los movimientos básicos tales como la postura, el caminar y el reflejo de parpadeo, muy estudiado, el cerebelo claramente participa en cada fase de movimiento. El cerebelo es claramente de importancia para la adaptación a largo plazo de diferentes patrones de coordinación motora. Sin embargo, hay mucho que aprender sobre el proceso real que se desarrolla en el cerebelo, una estructura que regula la calidad del desempeño motor y parece estar implicado en una forma de aprendizaje motor.

Al mismo tiempo, el síndrome afectivo cognitivo cerebeloso ha proporcionado un sustento clínico al papel del cerebelo en el intelecto y la emoción. Éste síndrome se caracteriza por deficiencias en la función ejecutiva, procesamiento espacial visual, déficits lingüísticos y desregulación afectiva [Koziol y col., 2014]. Las lesiones cerebelosas inicialmente llevan a grandes problemas con la estabilidad postural y con la precisión de diferentes tipos de movimientos. Es de destacar que, por ejemplo, con la edad, los movimientos en general pueden llevarse a cabo, pero su calidad se reduce drásticamente [Bernard y Seidler, 2014]. A pesar de la presencia de daño cerebeloso, los individuos aún pueden realizar una variedad de tareas motoras complejas, incluyendo el habla y la escritura a mano, pero con menos precisión. Por lo tanto, la programación motora para estas tareas aprendidas no se almacenaría exclusivamente en el cerebelo [Koziol y col., 2014].

A fin de poder evaluar las funciones cerebelares de aprendizaje motor, equilibrio y coordinación motora en animales de experimentación, los investigadores han desarrollado y propuesto diversos tests o pruebas comportamentales, tales como: el *Beam Walking test*, *Single reaching pellet*, *Rotarod test*, entre otros [Urakawa y col., 2007; Shiotsuki y col., 2010; Klein y Dunnett, 2012; Luong y col., 2011; Chen y col., 2014]. Dado que estas funciones son dependientes del olfato y del estado de bienestar animal, pruebas como las de *Buried Food Pellet*, *Corner* y *Open Field* complementan los estudios de la función cerebelar [Arranz y col., 2009; Sun y col., 2018; Ye y col., 2014; Walsh y Cummins, 1976].

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina más abundante en el cerebro, es un miembro de la familia de factores de crecimiento, que integra las bases moleculares de las funciones cognitivas. Se sabe que el BDNF

está involucrado en la plasticidad sináptica, juega un papel fundamental en el desarrollo cerebral, el crecimiento de las neuritas y la plasticidad del SNC y se ha relacionado con la biología de trastornos psiquiátricos, y con los procesos de aprendizaje y memoria [Li y col., 2015].

El BDNF cerebelar deriva principalmente de neuronas excitadoras (núcleos precerebelosos/neuronas de la médula espinal que dan lugar a fibras musgosas) y promueve la formación de sinapsis GABAérgicas como resultado de la liberación desde los axones. Por lo tanto, dentro del cerebelo, la localización preferencial de BDNF en axones mejora la especificidad a través de la cual BDNF promueve la diferenciación sináptica GABAérgica [Chen y col., 2016].

Los genes *Bdnf* de ratón y rata poseen una complejidad estructural que da como resultado múltiples variantes de empalme; tiene nueve exones, ocho de los cuales tienen su propio promotor y se empalman directamente con el exón IX, exón que contiene la secuencia codificante, es decir, consisten en un exón 3' común que codifica la proteína pro-BDNF y al menos ocho exones no codificantes 5' (exones I-VIII) [Aid y col., 2007; Palomer y col., 2016]. Los exones I, II y III tienen patrones de expresión enriquecidos en el cerebro [Aid y col., 2007].

El BDNF se une al receptor de tirosina quinasa de tipo B (TrkB) y al receptor de neurotrofina de baja afinidad p75 (p75^{NTR}). El BDNF puede modular la transmisión sináptica no solo de forma anterógrada sino también retrógrada. Es importante destacar que se ha demostrado que el BDNF participa en la eliminación de la sinapsis en la unión neuromuscular [Choo y col., 2017].

Es de mencionar que BDNF estimula la reparación del ADN activando la proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico (CREB), que, a su vez, induce la expresión de la endonucleasa APE1 [Yang y col., 2014]. La supresión de

APE1 o TrkB por interferencia de ARN anula la capacidad del BDNF para proteger las neuronas contra la muerte inducida por daño del ADN oxidado [Yang y col., 2014]. Otros y nosotros hemos demostrado que la expresión y los niveles proteicos de BDNF y su receptor TrkB, muestran una variación circadiana en áreas del SNC como hipocampo, corteza prefrontal, corteza temporal, dando cuenta de que su función en dichos tejidos es dependiente de la hora del día [Dolci y col., 2003; Golini y col., 2012; Coria-Lucero y col., 2016]. Sin embargo, hasta la fecha, no hemos encontrado antecedentes de una organización temporal de los niveles de BDNF/TrkB en cerebelo, ni de las funciones que regula, tales como la reparación del ADN y las proteínas implicadas en este proceso.

6- LOS RITMOS CIRCADIANOS Y SU RELACIÓN CON ENVEJECIMIENTO, METILACIÓN DEL ADN, BER, RC Y SU EFECTO EN CEREBELO.

Ritmos circadianos y envejecimiento

El primer indicio de una amortiguación de los ritmos circadianos con el avance de la edad provino de estudios de Franz Halberg en la década de 1950, cuando mostró que tanto el mesor como la amplitud de 24 horas de la temperatura rectal disminuyeron con el envejecimiento en la cepa I de ratones [Cornelissen y Otsuka, 2017]. También se encontró una disminución en la amplitud circadiana en la temperatura intraperitoneal teledorada longitudinalmente en ratas Sprague-Dawley, y en la temperatura central del cuerpo de la rata Okamoto propensa al envejecimiento, además de una disminución en la amplitud circadiana del ritmo de la presión arterial con el avance de la edad [Cornelissen y Otsuka, 2017].

Aunque el número total de neuronas dentro de los NSQ sigue siendo el mismo en ratas envejecidas, factores de acoplamiento como la vasopresina y GABA muestran disminución con la edad, por lo tanto, este grupo neuronal exhibe una disminución en los potenciales postsinápticos inhibitorios en comparación con las neuronas de los NSQ jóvenes [Manoogian y Panda, 2017]. La amortiguación de las salidas neuronales y humorales da como resultado una coordinación deficiente de los osciladores periféricos, que comienzan a mostrar una disminución en la amplitud del gen del reloj con la edad. Esto puede deberse a la alteración del reloj molecular intrínseco, la coordinación temporal alterada de los osciladores o el resultado de una fisiología alterada general asociada con el envejecimiento. La robustez de los ritmos biológicos de un organismo está determinada por una combinación de señales externas y ritmos internos. Por lo tanto, a medida que los ritmos endógenos disminuyen con la edad, la sincronización de las señales externas juega un papel cada vez más importante en la determinación de la amplitud del reloj circadiano de un organismo [Manoogian y Panda, 2017].

Con el avance de la edad, el sistema de sincronización circadiano se altera progresivamente (en los seres humanos y en otros mamíferos), como se demuestra claramente por una reducción de la amplitud, de la longitud del periodo de los ritmos circadianos y una mayor tendencia hacia la desincronización interna [Duffy y col., 2015; Hood y Amir, 2017]. En los seres humanos, los cambios relacionados con la edad se han descrito para los ritmos hormonales, la temperatura corporal central, el ciclo sueño-vigilia y varios otros ciclos de comportamiento [Hood y Amir, 2017]. Por otro lado, la fragmentación del ciclo sueño-vigilia (caracterizada por la aparición de episodios de vigilia durante la noche y de siestas durante el día), es un

patrón característico en personas de edad avanzada, siendo un síntoma de alteración de los ritmos circadianos de sueño, similar a los que se encuentran tras lesiones experimentales de los NSQ [Hood y Amir, 2017]. De hecho, los trastornos del sistema circadiano durante el envejecimiento pueden manifestarse inicialmente en el patrón de sueño-vigilia. Las observaciones en animales sugieren que también existen cambios relacionados con la edad en las propiedades del oscilador circadiano, que regula el tiempo de sueño, la temperatura corporal y otras variables [Hood y Amir, 2017].

Se ha encontrado que el envejecimiento se correlaciona con una disminución de la expresión de varios de los genes que componen la maquinaria molecular del reloj circadiano, incluyendo CLOCK y BMAL1 [Rijo-Ferreira y Takahashi, 2019]. Los ratones genéticamente arrítmicos (*Bmal1*^{-/-}) presentan síntomas de envejecimiento temprano, que incluyen una disminución de la grasa muscular y subcutánea, cataratas y encogimiento de órganos [Manoogian y Panda, 2017]. En roedores, trasplantar los NSQ de un hámster joven a un hámster viejo con ritmos conductuales débiles, fue suficiente no solo para restablecer ritmos conductuales robustos en el hámster viejo, sino también para aumentar la vida útil en 4 meses [Manoogian y Panda, 2017].

Los ritmos circadianos son una parte integral de la fisiología que parecen ser esenciales para la salud, y una alteración de los mismos compromete múltiples niveles de fisiología (por ejemplo, metabolismo, inflamación) y aumenta el riesgo de enfermedades crónicas no infecciosas como trastornos metabólicos, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer [Manoogian y Panda, 2017].

Ritmos circadianos y metilación del ADN

Varios estudios en mamíferos han revelado que múltiples sitios de metilación del ADN oscilan en sincronía con el ciclo celular, que a su vez está controlado por el reloj circadiano; estos datos sugieren que la regulación epigenética también puede oscilar con la ritmicidad circadiana [Paredes y col., 2018].

También se ha demostrado en peces un patrón de expresión diaria de genes clave implicados en los procesos de metilación (Dnmts con pico en la fase de reposo) y desmetilación del ADN, que muestran ritmos diarios tanto en gónadas femeninas como masculinas [Paredes y col., 2018]. En hígado de ratones se describió la existencia de ritmos diarios de expresión de los genes Dnmts y Tets en antifase: con pico de Dnmts durante la fase de luz y Tets durante la fase oscura [Paredes y col., 2018].

Además, un estudio en ratones mostró que la privación del sueño puede cambiar el estado de metilación e hidroximetilación del ADN de cientos a miles de sitios CpG cerca de genes implicados en la neuritogénesis y plasticidad sináptica, el citoesqueleto, vías de señalización y en neurotransmisión [Liu y Chung, 2015]. La evidencia directa que respalda el rol de la metilación del ADN en la regulación de los ritmos circadianos provino de un estudio en humanos, que utilizó estadísticas globales para mostrar evidencia de una ritmicidad significativa de 24 h de la metilación del ADN, así como su correlación con la expresión génica rítmica en la corteza prefrontal dorsolateral humana [Liu y Chung, 2015].

Investigaciones recientes han revelado que la maquinaria del reloj determina las características circadianas del epigenoma que al mismo tiempo

puede ser modulado por señales metabólicas [Paredes y col., 2018]. Dado que la metilación y los relojes circadianos han evolucionado tempranamente y operan a lo largo del árbol de la vida, se ha demostrado que la inhibición de la metilación afecta los ritmos biológicos en especies que van desde algas unicelulares hasta humanos, separados por más de mil millones de años de evolución [Fustin y col., 2020].

Ritmos circadianos y BER

Manzella y col. [2015] encontraron una variación diaria de la expresión y actividad de Ogg1 con niveles más altos en la mañana en comparación con las horas de la tarde en un grupo de 15 voluntarios sanos; donde los linfocitos expuestos al daño oxidativo del ADN a las 08:00 am muestran una menor acumulación de 8-oxoG que los linfocitos expuestos a las 08:00 pm. Además, también se observaron niveles alterados de expresión de Ogg1 en un grupo de trabajadores por turnos que experimentaron una desregulación de los genes del reloj circadiano en comparación con un grupo de control [Manzella y col., 2015]. Al mismo tiempo, los fibroblastos *knock-down* de BMAL1 mostraron una abolición de la variación circadiana de la expresión de Ogg1 y un aumento de la actividad de OGG1 [Manzella y col., 2015].

En el caso de la endonucleasa APE1, Kimura y col. [2003] examinaron los niveles de ARNm en el cerebro de ratón mediante hibridación *in situ*, detectando transcritos de APE1 en todo el cerebro del ratón, particularmente en las neuronas del reloj en los NSQ, células piramidales del hipocampo, células granulares y en neuronas monoaminérgicas. En los NSQ del centro circadiano, los niveles de

transcripciones de ARNm de APE1 eran constantemente altos, aunque no parecían estar influenciados ni por los ritmos circadianos ni por la exposición a la luz.

Ritmos circadianos y su relación con el cerebelo

El posible papel del cerebelo en la escala circadiana no ha sido muy estudiado. Curiosamente, la corteza cerebelosa pertenece al grupo de regiones cerebrales en las que se han detectado ritmos circadianos en los genes reloj [Plumel y col., 2019], lo que sugiere que el cerebelo podría contener un oscilador circadiano. La base molecular del oscilador cerebeloso se ha demostrado mediante la expresión del gen reloj en la corteza cerebelosa de roedores, algunos genes del reloj, como Per1, Per2, Per3, Bmal1, Cry1, Nr1d1 y Dbp, se expresan rítmicamente, mientras que otros, es decir, Cry2 y Clock, son expresados constitutivamente [Guissoni Campos y col., 2018]. Las oscilaciones circadianas de los genes reloj y las proteínas en el cerebelo del ratón son bastante similares a las del hígado murino, y las oscilaciones en ambas estructuras se retrasan en fase unas 6 h en comparación con las del reloj maestro. Por ejemplo, los perfiles de ARNm de Per1 y Dbp, en condiciones de luz-oscuridad, alcanzan su punto máximo al anoecer (que corresponde al inicio de la actividad en ratones) tanto en el cerebelo como en el hígado, mientras que estos perfiles muestran picos alrededor del mediodía (período de descanso medio) en los núcleos supraquiasmáticos (es decir, 6 h antes) [Plumel y col., 2019].

El cerebelo clásicamente se asociaba a funciones motoras, pero se ha involucrado al reloj cerebeloso en la anticipación diaria de la hora de comer dado entre otras cosas, a que la utilización de glucosa se reduce específicamente a la

corteza cerebelosa [Mendoza y col, 2010; Plumel y col., 2019]. El cerebelo expresa una alta densidad de receptores de leptina (hormona que puede inhibir la anticipación de alimentos), lo que sugiere que la leptina periférica bien podría transmitir señales metabólicas a esa estructura [Berman y col., 2013]. Además, la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT), incluyendo el insulino dependiente Glut4, en el cerebelo, sugiere que la glucosa y/o la insulina podrían proporcionar señales aferentes a esa región del cerebro [Gómez y col., 2010]. Alternativamente, el cerebelo puede recibir señales de alimentación indirectas, después de la integración de las señales transmitidas por la sangre al tronco cerebral (núcleo del tracto solitario/núcleo parabraquial) o el hipotálamo mediobasal (núcleo arqueado, núcleo ventromedial hipotalámico; Zhu y col., 2006). Una vez procesados por la corteza cerebelosa, los mensajes temporales asociados con la alimentación/señales metabólicas se transfieren luego a través de las vías nerviosas a estructuras reguladoras que controlan las salidas, incluyendo áreas hipotalámicas, talámicas y corticales para el control de la actividad anticipatoria de alimentos y temperatura [Zhu y col., 2006].

Ritmos circadianos y RC

La amplia regulación recíproca entre el reloj circadiano y el metabolismo de los nutrientes [Manoogian y Panda, 2017] sugiere que el patrón de alimentación diario puede afectar la amplitud y la fase de los ritmos circadianos.

Entre los diferentes experimentos que tratan de observar los efectos de la RC sobre los ritmos circadianos, podemos mencionar el aumento en la amplitud circadiana de parámetros como la temperatura rectal, corticosterona y glucógeno

hepático en ratones BALB/c con RC en comparación a aquellos alimentados *ad-libitum*; resultados similares se observaron en ratones hembra CD2F1 [Cornelissen y Otsuka, 2017]. En este, y en estudios posteriores, la amplitud de los ritmos circadianos generalmente aumentó cuando la ingesta de alimentos se restringió a una sola "comida" diaria [Cornelissen y Otsuka, 2017]. La acrofase de algunos, pero no todos, los ritmos circadianos se alteraron según el momento de la disponibilidad de alimentos, lo que permitió manipular las relaciones entre los ritmos de una manera predecible [Cornelissen y Otsuka, 2017].

En seres humanos, estudios a corto plazo de comidas únicas diarias, consumidas en 2000 kcal fijas o por libre elección, mostraron una pérdida de peso relativa con "solo desayuno" pero no con "solo cena". Una mayor pérdida de peso en "solo desayuno" en comparación con "solo cena" está de acuerdo con la variación circadiana de la termogénesis inducida por la dieta, que es más alta por la mañana que por la noche en personas sanas [Cornelissen y Otsuka, 2017].

SIRT1 es necesaria para la adaptación a condiciones de RC, para controlar el metabolismo de la glucosa y el metabolismo de los lípidos en los tejidos periféricos cuyo desequilibrio es el sello distintivo del envejecimiento; además en los NSQ, SIRT1 modula el reloj central, a través de desacetilación directa de BMAL1 a través de PGC-1 α y NAMPT, en un proceso que parece volverse menos eficiente en animales envejecidos [Orozco-Solis y Sassone-Corsi, 2014].

Múltiples estudios investigaron la diafonía entre la RC y el ritmo circadiano. En estas condiciones la expresión media diaria de Cry2 y Bmal1 hepáticos aumenta, pero se reduce el nivel de la proteína CLOCK en todos los momentos analizados durante el día [Duszka y Wahli, 2020]. La expresión de los genes Rev-Erb α , Ror γ ,

Cry1 y Cry2 junto a varios genes regulados por la RC, difiere entre hombres y mujeres, mientras que la expresión hepática de algunos genes del reloj circadiano como Bmal1, Per1, Per2 y Per3, así como el efecto de la RC sobre su expresión, son independientes del género [Duszka y Wahli, 2020].

Por lo tanto, la RC regularía la expresión de los genes del reloj circadiano en diferentes tejidos y afecta tanto a los relojes centrales como a los periféricos en los niveles transcripcional, traduccional y postraduccional [Duszka y Wahli, 2020].

Las señales ambientales, incluidos los alimentos, actúan como potentes agentes no fóticos de sincronización de los relojes. Cuando el acceso a los alimentos está restringido a unas pocas horas durante el día, los roedores aumentan su actividad anticipando el tiempo de disponibilidad de alimentos [Acosta-Rodríguez y col., 2021]. Un aspecto importante a tener en cuenta respecto a los protocolos de RC, es que éstos pueden consistir en restringir la cantidad de alimento ingerido o el momento/período de administración de la dieta. Muchas veces, en este último caso, el momento de la administración del alimento queda determinado por horarios dependientes de la rutina (o comodidad) del operador, por ejemplo, la administración del alimento por la mañana (cuando los roedores nocturnos normalmente no comerían) autoimpone ciclos diarios de alimentación y ayuno, distintos a los fisiológicos. Dado que la ingesta de alimentos sincroniza la función metabólica y la producción de hormonas en todo el organismo, el momento de la ingesta de alimentos es fundamental [Acosta-Rodríguez y col., 2021]. Acosta-Rodríguez y col. (2021) proponen que quizás los grupos alimentados por el día y por la noche prolongan la vida útil a través de diferentes mecanismos.

Los paradigmas de restricción temporal antinaturales también cambian la fase de los ritmos circadianos, en varias horas, en relojes periféricos como el hígado, sin un efecto significativo en los NSQ. Esta desincronización interna del organismo, con relojes centrales y periféricos fuera de fase, se ha asociado con trastornos metabólicos. Sin embargo, una combinación de restricción temporal con RC, o con alimentos altamente sabrosos, da como resultado un estímulo más fuerte capaz de restablecer los relojes centrales y periféricos [Acosta-Rodriguez y col., 2021]. Los ciclos de alimentación/ayuno son señales poderosas para los relojes circadianos periféricos, con RC y restricción temporal reprogramando los perfiles circadianos del transcriptoma y el metaboloma [Acosta-Rodriguez y col., 2021].

En conclusión, a pesar de que existen muchos estudios que utilizan RC, la contribución del momento del acceso a los alimentos por sí misma se ha convertido en una nueva área de exploración para desentrañar los mecanismos antienviejimiento inducidos por RC [Acosta-Rodriguez y col., 2021].

7- EL ENVEJECIMIENTO EN CEREBELO Y SU RELACIÓN CON METILACIÓN DEL ADN, EL SISTEMA BER Y LA RESTRICCIÓN CALÓRICA.

Envejecimiento y metilación del ADN

Durante el envejecimiento en general se ha observado un aumento del nivel de metilaciones en las islas CpG de diversos genes que no están presentes durante la juventud, estos hallazgos se han evidenciado en varias especies, entre las que podemos mencionar, ratones jóvenes, monos *rhesus* y sujetos humanos [Morgan y col., 2018]. Se ha informado repetidamente que la expresión alterada de las enzimas responsables de la metilación y desmetilación del ADN es un factor que contribuye

a los cambios observados en los patrones de metilación del ADN con la edad [Morgan y col., 2018].

El metiloma neuronal cambia drásticamente después de la actividad neuronal, asociándose con genes de plasticidad sináptica que ganan o pierden la metilación del ADN [Cui y Xu, 2018]. El nivel de DNMT1 en el cerebro es más alto que en otros tejidos, pero a su vez varía entre las diferentes regiones del cerebro; además, se encontró que los niveles de expresión de las DNMT disminuían con la edad tanto en la corteza frontal como en el hipocampo de ratones y humanos [Cui y Xu, 2018]. Actualmente, se ha informado que la metilación del ADN en la mediación del envejecimiento cerebral varía enormemente según el gen y el tejido. Al mismo tiempo, se ha informado que la familia DNMT, que media el proceso de metilación del ADN, es responsable de la formación de la memoria o los déficits cognitivos, por lo que es importante investigar a fondo no solo la metilación del ADN en el cerebro, sino especialmente durante la vejez [Cui y Xu, 2018].

Existen hallazgos incongruentes entre los estudios que tratan de describir los cambios en los niveles de metilación que se dan con el envejecimiento, ya que según algunos autores los niveles globales de 5-mC en corteza e hipocampo de ratones y humanos está aumentado con la vejez, mientras que otros autores indican lo contrario [Fasolino y col., 2017]. Dados estos resultados contrapuestos, se necesita investigación adicional para determinar hasta qué punto la metilación del ADN cambia con el envejecimiento en el cerebro y si estos cambios son específicos de la región del cerebro [Fasolino y col., 2017].

Lardenoije y col., [2015] demostraron que el envejecimiento también está asociado con un aumento de la inmunorreactividad de 5-mC y 5-hmC en células de

Purkinje del cerebelo de ratón. Estos aumentos relacionados con la edad fueron mitigados por RC, y además reportaron que la RC tiene un efecto más fuerte sobre la metilación del ADN que la hidroximetilación del ADN.

Los cambios epigenéticos se han relacionado con muchas enfermedades del envejecimiento, incluido el cáncer y la demencia, y se ha planteado la hipótesis de que el envejecimiento acelerado del "reloj epigenético" está asociado con marcadores relacionados con la mortalidad de la aptitud física y mental [Spiers y col., 2016].

Hasta la fecha no hay evidencias concluyentes respecto a cómo el envejecimiento afecta la expresión y actividad de las diferentes Dnmts, por lo tanto, un cambio en la proporción entre metiltransferasas de mantenimiento y metiltransferasas de *novo* podría ser un factor clave para investigar y comprender la metilación aberrante del ADN asociada con el envejecimiento.

Envejecimiento y BER

El ADN está sujeto al constante daño, y la acumulación de daño durante el envejecimiento tiene efectos profundos en la función celular. Esto contribuye a generar los rasgos característicos del envejecimiento, incluidos cambios en la expresión génica, inestabilidad del genoma, cambios en la replicación celular, senescencia celular y muerte celular [Langie y col., 2017].

Las enzimas *BER* se encuentran en su nivel más alto durante la embriogénesis y disminuyen con la edad, siendo por ejemplo importante determinar los niveles de proteína APE1 en el cerebro, ya que se puede usar para predecir el daño neuronal. [Sykora y col., 2013].

El sistema *BER* constituye el principal modo de reparación del ADN en el cerebro de los mamíferos, esto se ha demostrado dado que la expresión y actividad de OGG1 disminuye significativamente con la edad, particularmente en las neuronas adultas y viejas [Swain y Rao, 2011]. Además, la actividad de la OGG1 humana disminuye con la edad en los linfocitos y es menor en los cerebros con enfermedad de Alzheimer [Langie y col., 2017].

Al mismo tiempo, se observó una reparación defectuosa por parte de OGG1 por alteración en su actividad, en un modelo celular con síndrome de Rothmund-Thomson de envejecimiento prematuro y propenso al cáncer, así como también, se propuso una modulación indirecta por parte de Sirt1 sobre OGG1 y APE1 [Duan y col., 2020].

German y col., [2017] proponen que, ante el envejecimiento o un estrés excesivo, paradójicamente, la proteína de reparación del ADN, OGG1, induce senescencia con el fin de proteger, a las células en riesgo, de proliferación no deseada, transformación maligna y posible tumorigénesis.

La actividad de APE1 disminuye con la edad en varios tejidos excepto en riñones [Chang y col., 2015], además Li y col. [2018] expresan una correlación inversa entre la expresión de esta endonucleasa y la regulación de la senescencia celular y las características del envejecimiento.

Envejecimiento y cerebelo

El Envejecimiento se asocia con una disminución de la función motora, incluyendo enlentecimiento de los movimientos, coordinación reducida, menos aprendizaje en la adaptación sensoriomotora y tareas de aprendizaje de secuencia

motora [Bernard y Seidler, 2014]. Teniendo en cuenta que la esperanza de vida media en los países desarrollados tuvo un aumento de 30 años en el siglo pasado, y que la proporción de adultos mayores en la sociedad sigue creciendo, el desarrollo de nuevos enfoques para combatir la disminución en la función motora relacionada con la edad es un importante reto científico [Zimmerman y Hummel, 2010].

El cerebelo se encarga de las actividades de movimiento y conciencia, como el entrenamiento de la actividad motora, el reconocimiento del tiempo y los movimientos finos [Mohamed y Sayed, 2020]. Las alteraciones en el aprendizaje y la memoria dependientes del cerebelo se asocian con la pérdida de neuronas de Purkinje en la corteza cerebelosa y el deterioro relacionado con la edad en la morfología y la función [Kennard y col., 2013].

El cerebelo sufre de atrofia durante el envejecimiento en una extensión mucho mayor que el resto del cerebro, la cual es contrarrestada por medio de hiperactivación bilateral [Filip y col., 2019]. Este tejido muestra una senescencia más temprana que el hipocampo, y esto podría tener implicaciones cruciales para la disfunción en el envejecimiento [Kennard y col., 2013]. En general, a través de estudios estereológicos en modelos humanos y animales, hay evidencia que indica la disminución relacionada con la edad en el número de células cerebelosas y, como tal, una disminución en el volumen cerebeloso [Kennard y col., 2013].

En general, en lo que respecta al contexto de la neurodegeneración y el envejecimiento, el cerebelo es un enigma. Esta área cerebral muestra una mayor actividad en la enfermedad de Alzheimer temprana y la enfermedad de Parkinson, lo que sugiere una función compensadora que puede mitigar los primeros síntomas de la fisiopatología neurodegenerativa [Liang y Carlson, 2020].

Envejecimiento y RC

Hasta la fecha, la RC es la única intervención conocida capaz de prolongar la vida de manera consistente y reproducible en varios modelos animales; y estudios de RC contribuyeron en gran medida al nacimiento de la cronobiología [Cornelissen y Otsuka, 2017]. Estudios continuos sobre RC, comenzando en 1935 con un estudio en ratas por McCay, han demostrado consistentemente que la RC puede facilitar la aptitud física, como lo demuestran las mejoras en el índice de masa corporal, la condición de la piel, la función hepática y renal, así como la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares [Ma y col., 2020]. Estudios en levaduras, gusanos, moscas y ratones indican que las vías de señalización que responden a los nutrientes, por ejemplo, mediadas por SIRT1, mTOR y PGC-1 α , interconectan el envejecimiento y la RC [Ma y col., 2020]. Por ejemplo, la RC activa al sensor energético AMPK, éste se encarga de inhibir a mTOR, un represor de la autofagia; asimismo la RC activa directa e indirectamente a las SIRTs, por lo que SIRT1 y AMPK podrían participar de un bucle de retroalimentación positiva para amplificar la respuesta a la RC [Madeo y col., 2019]. Curiosamente, la autofagia está sujeta a fluctuaciones circadianas y esta oscilación se pierde con el envejecimiento y se ha propuesto como un objetivo modulable por la RC [Madeo y col., 2019].

Se ha informado que la RC reduce las citocinas proinflamatorias, aumenta las citocinas antiinflamatorias y aumenta los niveles de BDNF en el hipocampo, además la RC aumentó la densidad de las espinas dendríticas, de acuerdo con el papel de las espinas dendríticas en los resultados cognitivos y conductuales y la respuesta a las intervenciones dietéticas [Wahl y col., 2018].

En los seres humanos, la RC con una ingesta adecuada de vitaminas y minerales provoca muchas de las mismas adaptaciones fisiológicas, metabólicas y moleculares observadas en los animales sometidos a RC; además bajo este régimen alimenticio se provocaron modificaciones importantes de los niveles de varias hormonas que están implicadas en la patogenia del cáncer y en la biología del envejecimiento de los seres humanos [Fontana y col., 2018]. Las concentraciones séricas de insulina, testosterona, estradiol y varios marcadores inflamatorios fueron significativamente más bajas, mientras que las concentraciones de adiponectina y cortisol fueron más altas en las personas que practicaban la RC que en los controles que consumían dietas occidentales *ad-libitum* [Fontana y col., 2018]. La concentración plasmática de triyodotironina y, como consecuencia, la temperatura corporal central promedio de 24 horas, durante el día y la noche, también se redujo significativamente, lo que respalda un fuerte efecto inhibitorio mediado por RC sobre la tasa metabólica y el estrés oxidativo [Fontana y col., 2018].

8- LA RESTRICCIÓN CALÓRICA, SU EFECTO EN CEREBELO, SOBRE METILACIÓN DEL ADN Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA BER.

RC y metilación del ADN

Evidencia reciente ha sugerido que la RC, incluso a corto plazo, podría revertir la metilación aberrante observada en genes asociados a enfermedades. Esto se concluye de un experimento en ratones viejos alimentados *ad-libitum* en comparación a un grupo de ratones viejos bajo RC, donde este último grupo presentó menor metilación en promotores, respecto al grupo *ad-libitum* [Morgan y col., 2018].

La ingesta calórica reducida ralentiza los efectos del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad en vertebrados e invertebrados, un proceso potencialmente mediado por el impacto de la RC sobre factores epigenéticos como la metilación del ADN [Hearn y col., 2019]. En ratas y monos, la RC a corto plazo en los individuos mayores mejora los efectos del envejecimiento con respecto a los marcadores de enfermedades tales como diabetes o cardiopatías, el estrés y el daño oxidativo, y aumenta la expresión de genes relacionados con la longevidad, como Sirt1 y AMPK [Hearn y col., 2019].

Curiosamente, una característica importante de la RC es su capacidad para inducir una memoria celular que puede persistir incluso cuando se interrumpe el tratamiento, esto fue propuesto debido a un experimento en ratones machos de cuatro meses de edad, donde una RC de un mes fue capaz de inducir cambios significativos en la expresión de varios genes, tales como Pomc y Crh en hipotálamo o Hsph1 en colon, observándose que entre el 20 y el 50% de estos cambios persistieron dos meses después de la interrupción de la RC [Gensous y col., 2019]. También se han observado efectos duraderos de una restricción dietaria severa sobre la metilación del ADN del gen IGF2 en humanos expuestos prenatalmente a la hambruna durante el invierno holandés del hambre en 1944-1945. Sorprendentemente, se observó que la metilación diferencial del gen IGF2 persistió incluso después de seis décadas [Gensous y col., 2019].

Existen ocho estudios que evaluaron el impacto de la RC en los cambios direccionales de metilación del ADN (hipo o hipermetilación), informando finalmente que la RC protege contra los cambios de metilación del ADN relacionados con la edad en mamíferos, en diferentes tipos de tejidos (riñón, sangre,

hígado, hipocampo y cerebelo). Las regiones genómicas que tienden a metilarse diferencialmente con la edad experimentan menos cambios en animales sometidos a RC [Gensous y col., 2019].

Los cambios relacionados con la edad en los patrones de metilación del ADN pueden también, estar parcialmente relacionados con modificaciones en la expresión y/o actividad de las enzimas DNMT. Se ha observado en fibroblastos durante el envejecimiento, una disminución en la actividad y en la expresión de DNMT1; mientras que por el contrario se evidenció un aumento de los niveles de DNMT3a en el hipocampo de ratón, especialmente en la región del giro dentado del hipocampo [Gensous y col., 2019]. La metilación del ADN puede ser un predictor de la edad biológica, y una reducción en los niveles de expresión de las enzimas DNMT que conduce a una pérdida global de metilación genómica se asocia con el envejecimiento de los seres humanos [Hearn y col., 2019]; aunque las regiones promotoras de ciertos genes se hipermetilan con la edad [Hearn y col., 2019]. La actividad de DNMT1 aumenta considerablemente durante la RC rescatando los niveles reducidos de metilación durante el envejecimiento [Daniel y Tollefsbol, 2015].

RC y BER

Según experimentos realizados en el año 2003, la RC invierte completamente la disminución relacionada con la edad en la capacidad de *BER* (particularmente en la actividad de la polimerasa beta) en cerebro, hígado, bazo y testículos, proporcionando animales envejecidos bajo RC con el fenotipo *BER* de animales jóvenes alimentados *ad-libitum* [Cabelof y col., 2003].

Un ensayo donde las mitocondrias de ratones sometidos a RC fueron aisladas, tenían actividades de uracilo (UDG) y OGG1 ligeramente más altas, pero sus actividades de relleno de huecos de endonucleasa abásica y polimerasa gamma ligeramente más bajas, aunque estas diferencias eran específicas de tejido [Stuart y col., 2004]. Stuart y col., [2004] reportaron que no se produce una regulación positiva general del sistema *BER* mitocondrial en la RC, tampoco encontraron diferencias en las actividades de las glicosilasas de ADN o la endonucleasa AP en extractos nucleares de ratones con RC.

Kisby y colaboradores [2010] demostraron que la actividad de APE1 en la corteza frontal/parietal, cerebelo, tronco encefálico, mesencéfalo e hipotálamo disminuyó con la edad en ratas alimentadas con una dieta *ad-libitum*. Por el contrario, la actividad de APE1 para estas regiones del cerebro fue aproximadamente 1,5-3 veces mayor en ratas con RC. Dado que el análisis de los niveles proteicos de APE1, ADN polimerasa β y ADN ligasa III en la corteza frontal/parietal de las ratas bajo ambos regímenes alimenticios se mantuvo sin cambios con la edad, esto sugiere que el aumento de la actividad APE1 en las ratas con RC es el resultado de una modificación postraducciona diferencial de APE1 y no de un aumento en los niveles de dicha proteína [Kisby y col., 2010].

RC y cerebelo

Prolla [2002] examinó los eventos moleculares asociados con el envejecimiento cerebral y su retraso por RC, empleando matrices de oligonucleótidos de alta densidad que proporcionan datos sobre la expresión de 6347 genes; reportando que en el cerebelo de ratones C57BL/6 el envejecimiento

dio como resultado un perfil de expresión génica que sugiere una marcada respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y reducción de la plasticidad neuronal. La RC atenuó selectivamente la inducción asociada a la edad, de genes que codifican para factores involucrados en la respuesta inflamatoria y de estrés [Prolla, 2002].

Se ha informado que las concentraciones de ERO fueron más bajas en el cerebro, cerebelo, hipocampo y corteza cerebral de ratas Wistar viejas sometidas a RC en comparación con los controles alimentados *ad-libitum* [Moyse y col., 2019]. Una dieta de RC provoca una reducción significativa del daño oxidativo, acorde a una regulación positiva de las defensas antioxidantes (niveles de glutatión y de enzimas antioxidantes claves) en comparación con los controles alimentado *ad-libitum* de la misma edad. Además, se observó que los efectos de la RC a los 19 meses consistieron principalmente en aumentar las defensas endógenas antes de la aparición de alteraciones redox relacionadas con la edad. Estos efectos fueron más prominentes en el hipocampo [Moyse y col., 2019].

Finalmente, se ha observado que la RC aumenta los niveles de noradrenalina que se alteran por el envejecimiento en regiones específicas del cerebro como el estriado, el tálamo, el cerebelo y el hipotálamo [Portero-Tresserra y col., 2020].

Parte II

INVESTIGACIÓN

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

Objetivo General

El Objetivo General de este trabajo de Tesis es estudiar la organización temporal de las funciones de coordinación y aprendizaje motor y los patrones de expresión circadiana de los factores cognitivos, *Bdnf/TrkB*, y del sistema de reparación por escisión de bases del ADN, en el cerebelo de ratas de 22 meses, sometidas a restricción calórica.

Hipótesis Central

Nuestra Hipótesis Central es que existe una organización temporal de las funciones de coordinación y aprendizaje motor, y de sus bases moleculares, Bdnf/TrkB, su control epigénético, y del sistema de reparación por escisión de bases del ADN (BER), en el cerebelo de ratas jóvenes; el envejecimiento modifica dicha organización temporal afectando el ritmo circadiano del factor de transcripción del reloj, BMAL1, alterando así los patrones de expresión circadiana de los factores Bdnf/TrkB, su control epigénético, y del sistema de reparación BER. La restricción calórica, revierte las alteraciones en las funciones de coordinación y aprendizaje motor asociadas al envejecimiento, ya que, favorece el funcionamiento del reloj endógeno y, de esta manera, restablece los patrones temporales de los factores involucrados en las funciones cognitivas, tales como Bdnf y TrkB, sus moduladores epigenéticos, y los ritmos circadianos de enzimas clave que participan en el sistema de reparación BER, en el cerebelo de ratas de 22 meses de edad.

Objetivos Específicos

A fin de contribuir al Objetivo General y comprobar la Hipótesis propuesta, nos planteamos los siguientes Objetivos Específicos:

- Estudiar las consecuencias del envejecimiento y la RC sobre la organización temporal de las funciones de coordinación y aprendizaje motor dependientes de cerebelo y de sus bases moleculares, previa evaluación del sentido olfativo y estado anímico de los animales en estudio.

- Analizar la variación temporal del factor activador del reloj celular, BMAL1, en el cerebelo de ratas de 3 y 22 meses y de 22 meses sometidas a RC.

- Analizar los patrones de expresión temporal de enzimas involucradas en el control de modificaciones epigenéticas como Sirt1, uno de los mediadores de la respuesta a la RC, y la ADN metiltransferasa 1 (Dnmt1), en el cerebelo de los tres grupos experimentales.

- Analizar la variación día/noche de los niveles de metilación de las regiones promotoras de genes relacionados a la cognición, Bdnf y TrkB, en el cerebelo de ratas jóvenes, viejas y viejas con RC.

- Analizar los patrones de expresión temporal de las principales enzimas involucradas en el sistema de reparación por escisión de bases, en el cerebelo de ratas jóvenes, viejas y viejas con RC.

- Dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en el control de la expresión temporal de enzimas del sistema de reparación por escisión de bases, por parte del reloj celular, mediante estudios de transfección transitoria *in vitro*, en células NIH-3T3.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

1- ANIMALES Y CONDICIONES DE ALOJAMIENTO

Ratas machos de la cepa Holtzman, criadas y mantenidas en el Bioterio de la Universidad Nacional de San Luis (San Luis, Argentina), fueron destetadas a los 21 días de edad y asignadas a las salas de experimentación, donde se mantuvieron, a partir de esa edad, bajo condiciones de luz artificial, con ciclos de 12h-Luz:12h-Oscuridad (LO), y en condiciones de temperatura controlada, de 22-24 °C, con agua y alimentación *ad-libitum*. A fin de analizar los ritmos circadianos endógenos, cumplida la edad y tratamiento de cada grupo experimental, los animales se transfirieron a una sala contigua donde se mantuvieron en condiciones de oscuridad constante, 12h-oscuridad: 12h-oscuridad (OO), aislados de *zeitgebers* ambientales, durante los 15 días previos a la fecha del experimento de obtención de las muestras (Figura 3.1).

En experimentos previos realizados en nuestro grupo de investigación, en las mismas condiciones de LO y OO, se registró la actividad locomotora de ratas de 3 meses de edad, a través del sistema Archron version 1.3 y *software* Simonetta Chronus [Simonetta Sistem, UNQ, Buenos Aires, Argentina] y se construyeron los actogramas y periodogramas con el *software* *The Temps 2.14 version* [www.ub.es/dpfisiv/soft/ElTemps] que permitieron definir el período endógeno de las ratas Holtzman, como se detalla en el apartado de Diseño Experimental [Navigatore-Fonzo y col., 2014].

2- DISEÑO EXPERIMENTAL

A partir de los 21 días de edad, los animales se distribuyeron al azar en los siguientes grupos experimentales: 1) adulto joven (Jóvenes AL, 3 meses de edad, n = 24, de distintas cohortes), 2) adulto mayor (Viejas AL, 22 meses, n=24, de distintas cohortes) y 3) a fin de estudiar los efectos de la RC sobre parámetros circadianos alterados en el envejecimiento, se estableció un tercer grupo de animales (Viejas RC, n=24, de distintas cohortes), a los cuales se les administró una dieta de idéntica composición a la administrada a los grupos 1) y 2), pero reducida en un 40% en calorías, durante los 3 meses previos a cumplirse los 22 meses de edad. Para ello, 4 días antes del inicio de la RC, se determinó la ingesta promedio diaria de cada animal alimentado *ad-libitum* a la cual se le restó luego el 40% en peso. Dicha cantidad fue administrada al grupo 3) diariamente, a partir de los 18 meses de edad, 2h antes del apagado de la luz en el bioterio, coincidiendo con la actividad anticipatoria del alimento (AAA) en condiciones LO y continuando a la misma hora durante los últimos 15 días en OO (Figura 3.1). Cumplidos la edad y el tiempo de tratamiento, cuatro ratas de cada grupo se sacrificaron, por decapitación, cada 4 h, a lo largo del día 15 de OO, a los tiempos circadianos: CT0, CT4, CT8, CT12, CT16 y CT20 (con CT0, correspondiente al comienzo del día subjetivo) (Figura 3.1). A fin de mantener las condiciones de oscuridad, la eutanasia de los animales se practicó bajo luz roja tenue (< 1 Lux). Para calcular los CT, previamente, determinamos la longitud del período interno (τ) de las ratas Holtzman analizando los actogramas y periodogramas [Navigatore-Fonzo y col., 2014] y encontramos que su τ es 24.5 ± 0.16 , mantenidos bajo OO. Luego, a partir de ese dato, calculamos los CT según las ecuaciones planteadas por Jud y col. [2005] de la siguiente manera: CT12 del Día 15 = CT12 del Día 14 + (τ - 24h). Las horas circadianas (o unidades) se calcularon

dividiendo τ entre 24, por lo tanto: 1 hora circadiana = $(24.5 \pm 0.16)/24 = 1.02 \pm 0.006$. Como se indica en las pautas de trabajo de Jud y col. [2005], se definieron los tiempos circadianos, CTXs, anteriores a CT12 (CT0 a CT10) restando X veces una hora circadiana del CT12 predicho en el día 15, y para valores de CTX posteriores a CT12 (CT14 a CT24), agregando X veces 1 hora circadiana a CT12 el día 15. La restricción alimentaria a un momento determinado del día, actúa como un regulador circadiano [Assali y col., 2018], y la hora del día en que alimentamos nuestro grupo de ratas viejas sometidas a RC fue a ZT11-CT12, momento que antecede la noche subjetiva, y coincide con la actividad anticipatoria del alimento descrita por varios autores [Mistlberger, 1994; Shibata y col., 1994; Gavrila y col., 2017; Power y Mistlberger, 2020]. Los experimentos fueron repetidos al menos dos veces por año. Se realizaron de acuerdo con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Publicaciones NIH No. 80-23) y las pautas del Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUA) de la Universidad Nacional de San Luis (Protocolo N° B-312/19, B-315/19 y B-315R1/19 aprobado por Res. 56/20-UNSL).

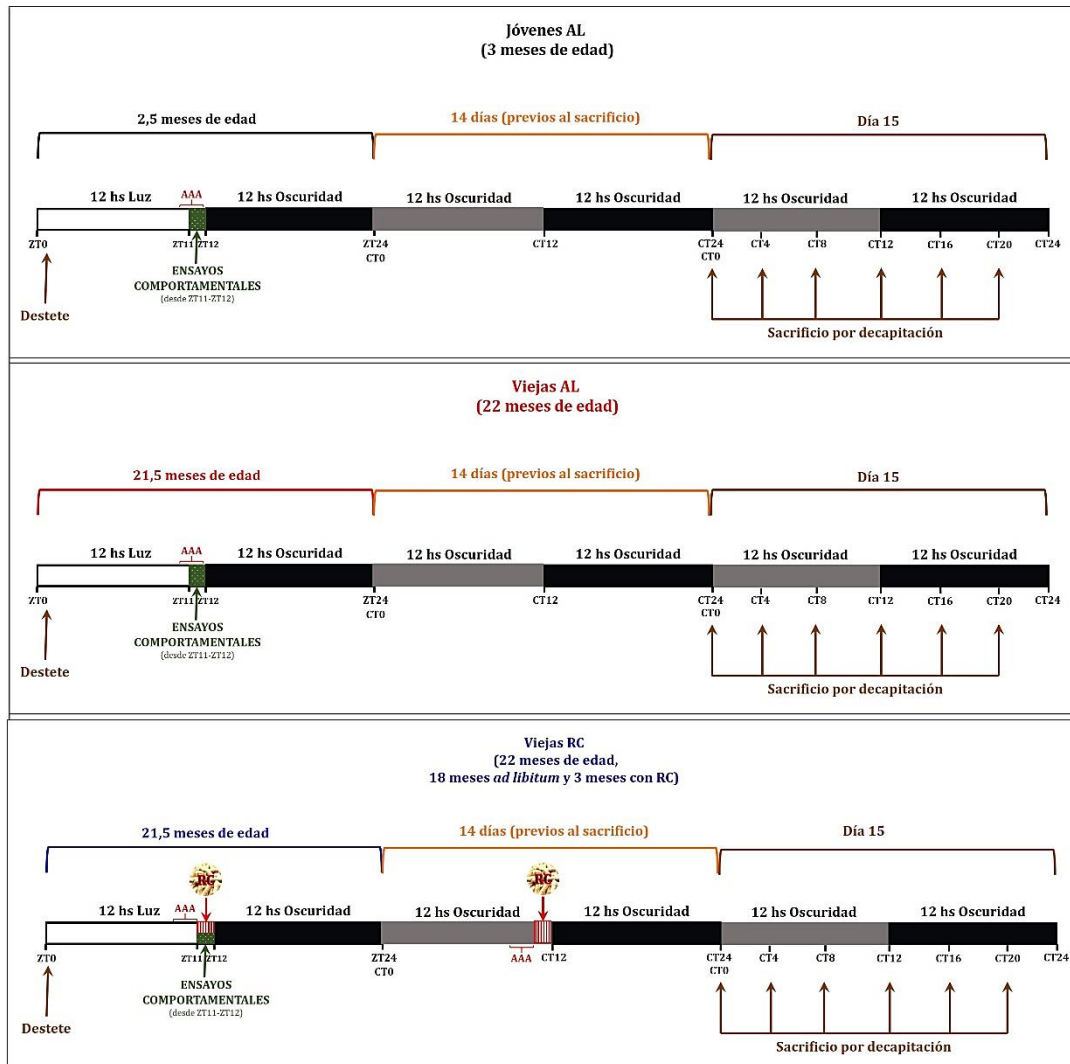


Figura 3.1: Esquema del diseño experimental empleado. En la figura se representa las condiciones ambientales a las que se encontraban los grupos experimentales. En barras horizontales de color blanco se representa al período de 12hs de luz, en color negro el período de 12hs de oscuridad y en color gris oscuro el período de 12hs de día subjetivo; en forma rectangular con barras rojas se representa el momento de restricción calórica; en forma rectangular verde se representa el momento de los ensayos comportamentales.

2- ESTUDIO PARA EVALUAR LA FUNCIÓN OLFATIVA

Esta prueba de comportamiento se ha utilizado en numerosas ocasiones para evaluar la función olfativa, y se realizó con el ensayo *Buried Food Pellet Test* (BFPT) descrito por [Sun y col., 2018] en ratas machos de los tres grupos experimentales (n=12 para cada grupo) en el ZT 11-12. En los días de prueba, según lo estipulaba el protocolo, desde 6 horas antes de la evaluación las ratas se

restringieron a sólo 0.5 g de alimento. El agua estaba disponible *ad-libitum*. El principio es que las ratas son animales con agudeza olfativa, por lo tanto, cuando los alimentos se entierran, su búsqueda se basa principalmente en el sentido del olfato [Ye y col., 2014]. El tiempo que transcurre desde que se enjaula hasta encontrar el alimento puede reflejar la función olfativa [Ye y col., 2014]. Las pruebas de BFPT se realizaron en un contenedor no transparente cerrado de 55 cm x 30 cm x 35 cm cuyo piso estaba cubierto con material de cama de rata de 5 cm de espesor (Figura 3.2). Un anillo de *Froot Loops* (Kellow's Battle Creek, Michigan) se enterró aproximadamente a 1 cm por debajo de la superficie, en sitios aleatorios durante cada ensayo [Yang y Crawley, 2009]. En una sola prueba, se colocó una rata en el centro de la jaula y se le dio 300 s para localizar el anillo de *Froot Loops*. Se registró la latencia para encontrar el anillo (considerando hallazgo cuando las extremidades anteriores se adhieren al gránulo de comida o lo agarran con los dientes) después de la introducción en la situación de prueba.

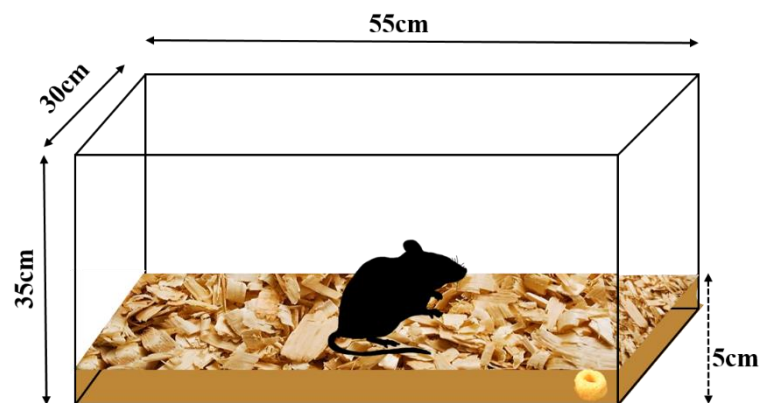


Figura 3.2: Esquema estructura para desarrollo de *Buried Food Pellet Test*

3- ESTUDIOS PARA EVALUAR LA NEOFOBIA

El test de esquinas (o *Corner Test*) es utilizado para evaluar la neofobia o el miedo a la novedad [Arranz y col., 2009], lo que permite determinar las dificultades

para desenvolverse con normalidad en ambientes nuevos o potencialmente ansiogénicos, y consiste en colocar al animal en el centro de una jaula cuadrangular idéntica a las que se utilizan para la estabulación. Dicho test se realizó en ratas machos de los tres grupos experimentales (n=12 para el grupo jóvenes AL, n=10 para el grupo viejas AL y n=14 para el grupo viejas RC) en el ZT 11-12. La jaula está descubierta y llena de un lecho de 10 cm de material de cama de rata (Figura 3.3). El experimentador observa la conducta espontánea del animal y anota la latencia del primer levantamiento, el número total de levantamientos y el número total de esquinas que el animal visita en un período de 30 s. Se utiliza una jaula distinta para cada animal, para evitar interferencias en esta conducta debido al rastro de olor de otro animal [Arranz y col., 2009].

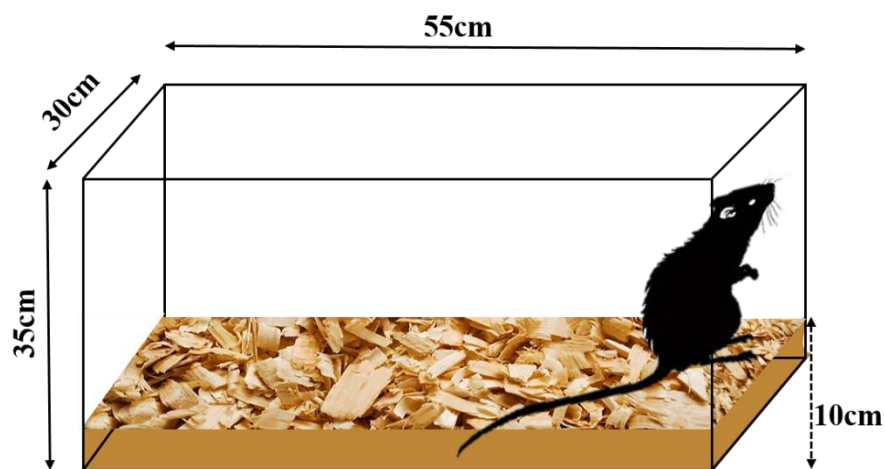


Figura 3.3: Esquema estructura para desarrollo de *Corner Test*

4- ESTUDIOS PARA EVALUAR LA HABITUACIÓN

La prueba de campo abierto (*Open Field Test*) consiste en la medición de los comportamientos provocados al colocar al roedor en un espacio abierto novedoso del que una pared circundante impide el escape. Dicho test se realizó en ratas

machos de los tres grupos experimentales (n=11 para cada grupo) en el ZT 11-12.

La obtención de estos comportamientos depende de la interacción del animal con una variedad de factores de prueba tales como:

- a. estimulación como resultado de la remoción de un entorno familiar
- b. estimulación involucrada en el traslado del animal al campo abierto
- c. exposición al entorno de prueba, que consiste tanto en el campo abierto como en sus alrededores
- d. toda la experiencia previa de la situación de prueba

En efecto, este último factor significa que estamos midiendo, entre otras cosas, la habituación y el aprendizaje en respuesta al entorno de prueba [Walsh y Cummins, 1976]. Los animales que pasaron el mayor tiempo en la región central del campo se consideraron menos temerosos (o "ansiosos") que aquellos que prefirieron el perímetro. Cada rata se colocó en la caja de campo abierto y, durante 5 min, se observó continuamente a la rata. Se anotó si la rata se levantaba sobre sus patas traseras, se acicalaba el cuerpo, permanecía completamente inmóvil, la cantidad de defecaciones y micciones. Las altas frecuencias de caminar, levantamientos sobre sus patas traseras, la ocupación del centro y las latencias de emergencia breves a menudo se supone que indican baja ansiedad, mientras que las altas frecuencias de aseo, inmovilidad y defecación pueden sugerir alta ansiedad [Hughes y Hancock, 2017].

5- ESTUDIO DE VARIACIÓN DIARIA DE LA COORDINACIÓN MOTORA

Se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Urakawa y col. [2007] y Luong y col. [2011]. La coordinación motora fina y el equilibrio se puede evaluar mediante el ensayo *Beam Walking*. Dicho test se realizó en ratas machos de los tres

grupos experimentales (n=10 para el grupo jóvenes AL, n=15 para el grupo viejas AL y n=12 para el grupo viejas RC) en el ZT 11-12. El objetivo de esta prueba es que la rata se mantenga en pie y camine a través de una viga estrecha (2.5 cm), de 1 m de longitud y elevada a 45 cm de una plataforma segura (Figura 3.4). Se coloca una caja negra al final de la viga como punto final. Las vigas y la caja se limpian de excrementos con toallas empapadas con etanol al 70%.

Esta prueba se lleva a cabo no más de 3 días consecutivos: 2 días de entrenamiento y 1 día de prueba. El rendimiento motor se grabó en video, y se cuantifica midiendo el tiempo que tarda la rata en atravesar la viga y el número de deslices de la pata que se producen en el proceso. La capacidad se midió usando una escala modificada [Urakawa y col., 2007]: puntaje 0, la rata atraviesa la viga sin deslizamiento del pie; puntaje 1, la rata atraviesa agarrando el lado lateral de la viga; puntaje 2, la rata muestra incapacidad para caminar sobre la viga pero puede atravesarla; puntaje 3, la rata tarda una cantidad considerable de tiempo en atravesar la viga debido a la dificultad para caminar; puntaje 4, la rata no puede atravesar la viga; puntaje 5, la rata no puede mover el cuerpo ni ninguna extremidad de la viga; puntuación 6, la rata no puede permanecer en la viga durante 10 s. En este caso, se realizará el registro de coordinación motora diaria de los grupos de animales jóvenes, viejos *ad-libitum* y viejos sometidos a RC.

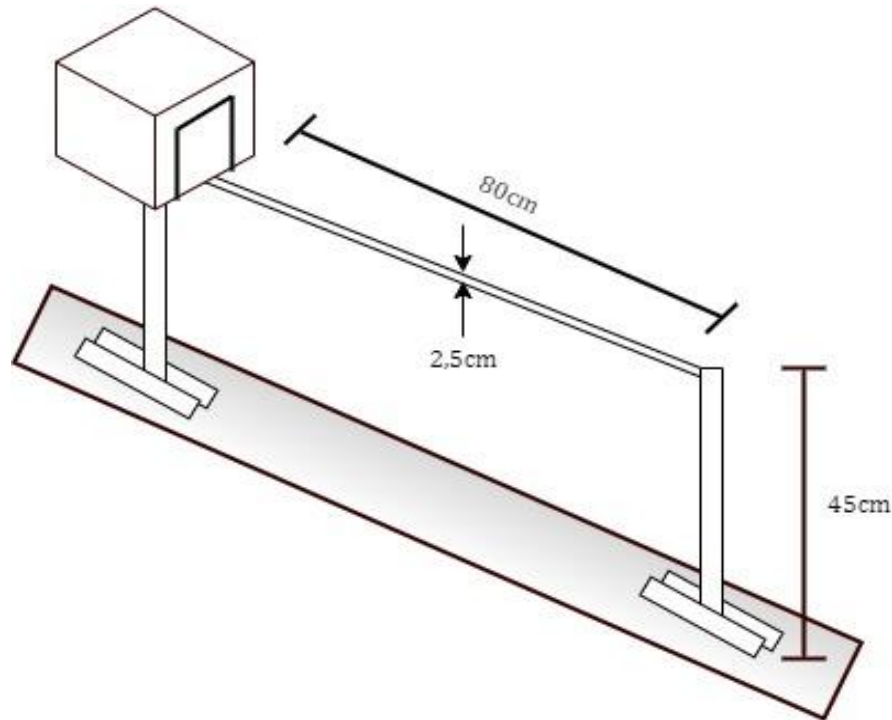


Figura 3.4: Esquema de la estructura para desarrollo de *Beam Walking Test*

6- ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DIARIA DEL APRENDIZAJE MOTOR

A fin de evaluar la variación diaria del aprendizaje motor, se realizó el procedimiento descrito por Klein y Dunnett [2012] y Chen y col. [2014]. Dicho test se realizó en ratas machos de los tres grupos experimentales (n=10 para cada grupo) en el ZT 11-12. La recuperación de objetos requiere movimientos motores precisos y coordinados en la extremidad anterior. Cuando las ratas son entrenadas para tomar y recuperar recompensas de comida posicionadas en un lugar específico en repetidas ocasiones, su rendimiento motor (que se define como la precisión y la velocidad) mejora progresivamente con el tiempo. El mismo consiste en el uso de una cámara de Plexiglas transparente hecho a medida (20 cm x 15 cm x 8.5 cm, medido desde el exterior, con el espesor del plexiglás 0.5 cm) que contiene tres ranuras verticales (una hendidura en el borde «dar forma», y dos ranuras en el borde opuesto "formación"), (Figura 3.5). Las ranuras verticales deben ser de 0.5

cm de ancho y 13 cm de altura y se encuentra en la pared frontal de la caja: en el centro, en el lado izquierdo, y en el lado derecho (Figura 3.5). Además, se utilizó una bandeja para mantener los pellets de alimento. Como punto de partida general, a las ratas se les dio 0.1 g de alimento por 1 g de peso corporal por día.

Este estudio conlleva 7 días de ejecución, comenzando en el primer día con el aclimatamiento del animal a la caja de plexiglás (duración de 10 min), con la bandeja llena de pellet, colocando el lado de la única rendija de la caja de entrenamiento hacia abajo y los pellets pegados a la rendija; el segundo día se continúa con el aclimatamiento del animal a la caja de plexiglás (duración de 10 min), con la bandeja llena de pellet, colocando el lado de la única rendija de la caja de entrenamiento hacia abajo y los pellets alejados de la rendija; los siguientes días (hasta el día del test) se continúa con el aclimatamiento del animal a la caja de plexiglás (duración de 10 min), con la bandeja sin pellet, colocando en el lado de la única rendija de la caja de entrenamiento hacia debajo, de a una unidad de pellet para el entrenamiento de recolección del pellet por parte del animal; finalmente el día del test se sitúa el animal en la caja de plexiglás (duración de 10 min), con la bandeja sin pellet, colocando el lado de las dobles rendijas de la caja hacia debajo ubicando de a una unidad de pellet para ser recolectado por la rata (variando de rendija hasta detectar preferencia de lado de la extremidad anterior de la rata).

Estudios previos han sugerido que una vez que un movimiento experto motor se domina a través de la práctica repetitiva, se puede almacenar como una forma de memoria motora, pudiéndose medir al detener el entrenamiento de las ratas después de que han llegado a un nivel meseta de las tasas de éxito, y se vuelve a probar su rendimiento después de un período de descanso extendido (por ejemplo, unos pocos meses); en el nuevo test las ratas, por lo general, comienzan

con tasas de éxito comparables a las observadas al final del test anterior, y mantienen una alta tasa de éxito en los siguientes días. Por el contrario, las ratas no entrenadas, de la misma edad, por lo general comienzan con tasas de éxito significativamente más bajas y mejoran progresivamente su rendimiento con práctica. Se realizó el registro de aprendizaje motor diario de los grupos de animales jóvenes, viejos *ad-libitum* y viejos sometidos a RC. La puntuación de los patrones de alcance requiere la grabación de video de los movimientos de alcance para comer para posterior evaluación de la calidad y morfología de los movimientos de alcance con una escala de calificación de componentes de movimiento: 1 - éxito del primer intento (pellet obtenido en el avance inicial de la extremidad); 2 - avance de la extremidad anterior (se toma el pellet pero no lo retiene); 3 - avance de la extremidad anterior sin conseguir tocar el pellet; 4 - la extremidad anterior avanzó, pero el pellet se cayó del estante; 5 - la rata se acercó a la ranura pero retrocedió sin avanzar su extremidad anterior y 6 - se obtuvo pellet usando su lengua. El alcance exitoso se definió como un alcance durante el cual la rata entra en contacto con el gránulo de comida y lo agarra para sacarlo de la plataforma. El porcentaje de alcances exitosos se calculó de la siguiente manera: (número de alcances exitosos/número de intentos de total de alcances) \times 100.

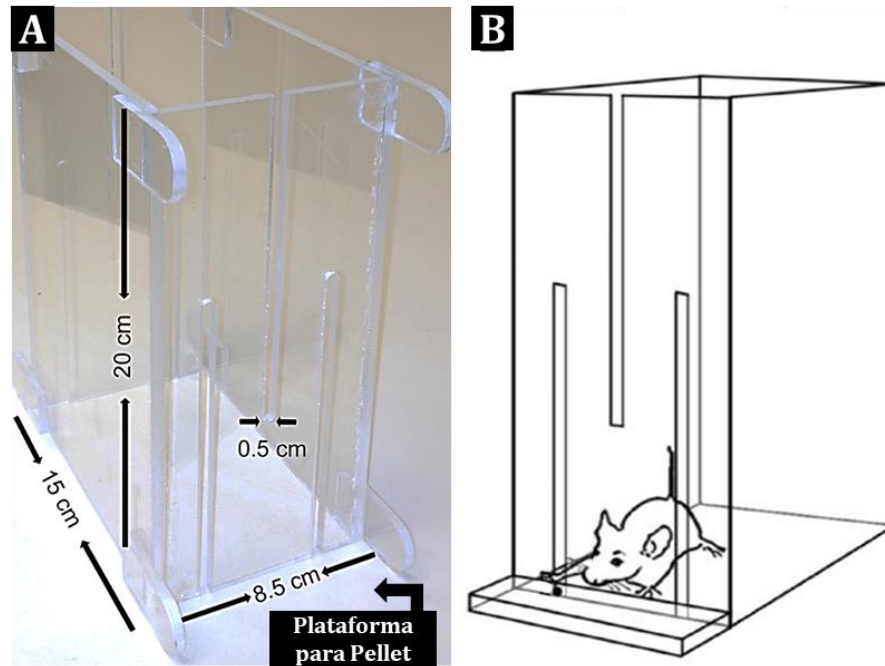


Figura 3.5: Esquema de la estructura para desarrollo de *Single Reaching Pellet Test*

7- ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES

Obtención de las muestras de cerebelo.

Para la obtención de las muestras, previa eutanasia por decapitación, procedimos a la apertura del cráneo, aislamiento del cerebro y separación del cerebelo, utilizando material de microcirugía estéril. El cerebelo, objeto de nuestro estudio, fue inmediatamente lavado en solución fisiológica fría, procediendo luego a la separación del lóbulo izquierdo, medio y derecho, en vidrio de reloj mantenido sobre hielo. Los lóbulos así obtenidos fueron almacenados a -80°C hasta su uso. Para las determinaciones se utilizaron *pools* de los tres cortes.

Determinación de la concentración de proteínas.

Las determinaciones se realizaron utilizando reactivo de Lowry [Lowry y col., 1951].

- *Preparación del homogenato de cerebelo.*

Los homogenatos se realizaron a partir de *pools* de los distintos segmentos de cerebelo y la solución de homogeneización (PBS 30 mM, con KCl 120 mM y Tritón X-100 1%), en relación 1/5, utilizando un homogeneizador (IKA Works, Inc.T 18 basic ULTRA-TURRAX®). Luego se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 min a 4°C. Del sobrenadante se tomaron varias alícuotas para la determinación de proteínas y actividades enzimáticas. Las mismas fueron almacenadas a -80°C.

- *Medición de la concentración de proteínas.*

Para realizar la determinación de la concentración de proteínas se colocaron 395 µL de agua destilada en un tubo de Kahn y se le añadieron 5 µL de muestra (sobrenadante de homogenato de tejido), previamente diluída 1/4 (v/v). Paralelamente, se trabajó con un blanco conteniendo 400 µL de agua bidestilada y con una serie de soluciones de concentración conocida utilizando de 20 – 100 µL de la solución testigo (Albúmina de suero bovino, 1 mg/mL – Sigma-Aldrich), a fin de construir una curva de calibración. A cada tubo se le adicionó 2 mL del reactivo de Lowry (Reactivo C: Se prepara en el momento de iniciar el ensayo, mezclando los reactivos A - Carbonato de sodio 2 %, en hidróxido de sodio 0.1 N (Biopack ®)-; B1 -Sulfato de cobre pentahidratado 1 % (Biopack ®)- y B2 -Tartrato doble de sodio y potasio 2 % (Biopack ®)- en proporciones 50:0.5:0.5, en volumen) y se mezcló con vórtex. Las soluciones se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente y luego se adicionaron 200 µL del reactivo de Folin-Cicocalteau (diluído ¼, v/v en agua bidestilada) a cada tubo y se mezcló con vórtex. Las soluciones se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se registraron los valores de absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro.

La concentración de proteínas en cada muestra se calculó a partir de la curva de calibración, tomando en consideración las diluciones realizadas.

Determinación de los niveles proteicos de BMAL1 por Western Blot

Los niveles proteicos de BMAL1, un componente clave de la maquinaria molecular del reloj celular, fueron analizados por Western Blot.

- *Electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia.*

Un volumen de extracto proteico conteniendo 25 µg de proteína se mezcló con 5 µL de Buffer de muestra, 2 µL de agente reductor (Invitrogen Co), se llevó a 20 µL con agua bidestilada estéril y se calentó a 70°C durante 10 min. Las muestras se sembraron y corrieron en geles de poliacrilamida al 15% (de acuerdo a los volúmenes indicados en las Tablas 3.1 y 3.2 para la preparación de los geles de apilamiento y de corrida) en paralelo con un marcador de peso molecular de 4-200 kDa (SeeBlue Plus 2 Invitrogen Co), durante 60 min a 150V, con un Buffer de corrida Tris-Glicina, pH 8.7. Las proteínas resueltas en el gel fueron luego transferidas a una membrana de PVDF (del inglés: Polyvinylidene fluoride, Immobilon) mediante el uso de una cuba de transferencia (Biorad) y Buffer de transferencia (Tris-Glicina-Metanol, pH 8.3) durante 2 h a 100V. Finalizada la transferencia, se tiñó la membrana con Ponceau S (Biopack ®) para corroborar la eficacia de la transferencia y luego se decoloró con agua destilada. Seguidamente, se procedió a realizar el revelado de las bandas.

Tabla 3.1: Soluciones para preparar gel de corrida (15%)

Componentes de la Solución con Vf de 5mL	Volumen en mL para 1 gel
Agua bidestilada	1.1
30% mix Acrilamida/Bisacrilamida (Sigma-Aldrich)	2.5
1.5M Tris (pH 8.8)(Biopack ®)	1.3
10% SDS (Sigma-Aldrich)	0.05
10% Persulfato de amonio (Promega)	0.05
TEMED (Merck)	0.002

Tabla 3.2: Soluciones para preparar gel de concentración (5%)

Componentes de la Solución con Vf de 3mL	Volumen en mL para 1 gel
Agua destilada	2.1
30% mix Acrilamida/Bisacrilamida (Sigma-Aldrich)	0.5
0.5M Tris (pH 6.8) (Biopack ®)	0.38
10% SDS (Sigma-Aldrich)	0.03
10% Persulfato de amonio (Promega)	0.03
TEMED (Merck)	0.003

- *Revelado de las bandas.*

La membrana de PVDF fue bloqueada con una solución de leche descremada (San Regim) al 3% en TBST 1X (20 mM Tris -Biopack ®-, pH 7.4 y 0.9% NaCl -Biopack ®-) durante toda la noche con agitación constante a 4°C. A fin de revelar las bandas específicas, se incubó con un primer anticuerpo IgG de conejo monoclonal anti-BMAL1 (Abcam) en dilución 1/8000 o IgG de conejo policlonal anti-ACTINA (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1/300 en TBST (TBS con 0.05% Tween 20 -Sigma-Aldrich-) durante toda la noche a 4°C con agitación constante. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBST. Seguidamente, se realizó una incubación con el segundo anticuerpo (Anti-IgG de conejo obtenido en cabra marcado con peroxidasa - Invitrogen-) a una dilución 1/8000 en TBST, durante 2 h, a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego, se realizaron cuatro lavados de 5 min cada uno con TBST.

La detección de nuestra proteína de interés fue realizada por el método de quimioluminiscencia, para lo cual la membrana se incubó con el reactivo luminiscente (Biolumina), durante 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó un film (Kodak X- Omat, Sigma Aldrich) sobre la membrana, se expuso por algunos segundos y luego se sumergió el film en la solución reveladora (Kodak), hasta la aparición de las bandas. A continuación, el film fue colocado en agua destilada y finalmente sumergido en la solución fijadora (Kodak). La intensidad de cada banda fue cuantificada utilizando el programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, USA), y se normalizó contra el valor de intensidad de las bandas de ACTINA.

Análisis de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativa.

- *Extracción de ARN de cerebelo.*

La extracción de ARN se realizó a partir 50-80 mg de cerebelo con 800 µL del reactivo comercial TRIzol (Invitrogen/life Technologies), incubando con el mismo 5 min. Se adicionó 200 µL de Cloroformo y se agitó vigorosamente el tubo por 15 s; incubando 3 min en baño de hielo, pasado este período, se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min a 4°C. Se removió 300 µL de fase acuosa y se traspasó a un nuevo tubo eppendorf, se añadió 500 µL de Isopropanol 100%, y se dejó incubar toda la noche en baño de hielo. Se centrifugó el tubo a 11000 rpm por 10 min a 4°C, seguidamente se removió el sobrenadante (SN) y se lavó el pellet de ARN con 1mL de Etanol 75% y se agitó. Se centrifugó a 11000 rpm por 5 min a 4°C y se realizó un spin para eliminar remanentes de etanol. Finalmente, se secó el pellet de ARN por 3 min y se resuspendió el pellet en 60 µL de agua libre de ARNasa, incubandose a 60°C por 10 min y se almacenó.

- *Cuantificación y determinación de la integridad del ARN.*

La cuantificación del ARN total obtenido se basó en la lectura espectrofotométrica a 260 nm, al mismo tiempo se hizo una estimación del grado de contaminación con proteínas realizando una lectura a 280 nm y calculando la relación A260/A280, que en todos los casos se mantuvo entre 1.8-2.0.

La integridad del ARN total se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando como colorante GelRed 0.01% v/v (Genbiotech SRL). La visualización se realizó utilizando un transiluminador UV.

- *Reacción de retrotranscripción.*

Esta reacción se llevó a cabo sobre 3 µg de ARN total, que se retrotranscribieron con 200 U de la enzima Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia

Murina, MMLV (Promega), utilizando n-hexámeros como cebadores. La reacción se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante.

- *Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).*

La reacción de PCR para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de los genes correspondientes a las regiones codificantes de 28S, Dnmt1, Bdnf, y TrkB, se llevó a cabo sobre una alícuota del cADN (2 μ L de la reacción de retro-transcripción), utilizando una mezcla de reacción conteniendo dNTPs 10 mM, MgCl₂ 50 mM, Buffer 10X y Taq ADN polimerasa (Invitrogen), según indicaciones del fabricante. Las concentraciones de cada cebador oligonucleótido específico utilizadas por muestra ensayada fueron las siguientes:

- 25 nM para los cebadores de 28S.
- 250 nM para los cebadores de Dnmt1.
- 250 nM para los cebadores de Bdnf
- 125 nM para los cebadores de TrkB

Las secuencias de los cebadores usados y los tamaños de fragmentos esperados se muestran en la Tabla 3.3.

Durante la reacción de PCR:

En todos los casos las muestras se desnaturalizaron a 94°C durante 2 min. Posteriormente, cada ciclo de amplificación se realizó de la siguiente manera: (1) desnaturalización a 94°C durante 1 min; (2) hibridación de cebadores a 59°C durante 1 min; (3) elongación a 72°C por 1min. La cantidad de ciclos de amplificación programados fueron: 33 ciclos para el gen de 28S; 27 ciclos para el gen de Dnmt1; 30 ciclos para el multiplex de genes Bdnf y TrkB.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, conteniendo GelRed 0.01% v/v (Genbiotech SRL) para visualizar las bandas. Los geles fueron observados y fotografiados bajo transiluminador UV. Las intensidades de banda fueron cuantificadas usando el programa ImageJ del NIH (procesador y analizador de imágenes en Java, de <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las cantidades relativas de ARNm se expresaron como el cociente entre la intensidad de banda del gen blanco y la intensidad de banda de la 28S.

Tabla 3.3: Secuencia de los cebadores usados en RT-PCR semicuantitativa

Gen	Secuencia de los cebadores (5' - 3')	Longitud del fragmento	Número de acceso en el Banco de Genes
28S	S: GTGAAAGCGGGCCTCACGATCC AS: GTACTGAGCAGGATTACCATGGC	280pb	NR_046246
Dnmt1	S: CTGAAAAGGGAAACGCAAATG AS: CCTGACACAGCTGGGTTTCCT	150pb	NM_053354.3
Bdnf	S: GGGTCACAGGGGCAGATAAA AS: CGATTGGGTAGTTCGGCATT	200pb	NM_001270630.1
TrkB	S: CTGGAGCCTGGGAGTTGTGT AS: GCCCTGGGTGATGCATTCTA	100pb	NM_012731.2

S: cebador sense; **AS:** cebador antisense; **pb:** pares de bases

Análisis de expresión de ADNc por RT-qPCR.

El análisis de expresión de los ARN se realizó mediante RT-qPCR utilizando el *kit* PrimeTimeqPCRassay (Integrated DNA Technologies). Estos ensayos

contienen cebadores específicos (Tabla 3.4) que permiten la amplificación y evaluación de la expresión del gen de interés.

Tabla 3.4: Secuencia de los cebadores usados en RT-qPCR

Gen	Secuencia de los cebadores (5' - 3')	Longitud del fragmento	Número de acceso en el Banco de Genes
28S	S: GTGAAAGCGGGCCTCACGATCC AS: GTACTGAGCAGGATTACCATGGC	280pb	NR_046246
Ogg1	S: CTATAGCCACTGGGCTTCGG AS: CTTGTCTCAGCAGCCTCACA	80pb	NM_030870.1
Ape1	S: CTCGTTGGGAGGCAGCG AS: GGCTCGGACTTGGGTTCTTC	127pb	NM_024148.1
Sirt1	S: ACCTCCTCATTGTTATTGGGTCT AS: TCGCAGTCTCCAAGAAGCTC	148pb	NM_001372090.1

Después de la síntesis, se usó 1 μ L del ADNc de cada gen para las reacciones RT-qPCR que se realizaron con *Syber Green Mix* (Promega) específico para los genes bajo análisis, en un volumen final de 20 μ L.

Esta reacción se llevó a cabo con los siguientes protocolos, según el fragmento a amplificar:

- **Ape1:** 95°C durante 10 min; seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 61°C durante 45 s.

- **Ogg1:** 95°C durante 10 min; seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s, 58°C durante 15 s y 60°C durante 15 s.

- **Sirt1**: 95°C durante 10 min; seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 59°C durante 45 s.
- **28S**: 95°C durante 10 min; seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 61°C durante 45 s.

Además de los genes de interés, se usó la evaluación del gen endógeno 28S para normalizar los datos de expresión de los genes de interés evaluados. La expresión normalizada de cada gen de interés en el estudio se calculó utilizando el modelo matemático $2^{-\Delta Ct}$, en el que el ΔCt corresponde al Ct del gen de interés sustraído por el Ct del gen normalizador. El análisis de expresión se realizó en el equipo 7900 HT Fast Real Time PCR System (AppliedBiosystems) y todas las reacciones se realizaron por duplicado.

Análisis de las regiones regulatorias de los genes Dnmt1, Sirt1, Ogg1 y Ape1 en busca de sitios de respuesta al reloj.

A fin de identificar posibles sitios reguladores sensibles al reloj (*E-box*), en las regiones regulatorias de los genes Dnmt1, Sirt1, Ogg1 y Ape1, escaneamos hasta 2000 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción, en busca de coincidencias significativas utilizando el *software* TFBIND (<https://tfbind.hgc.jp/>; Tsunoda y Takagi, 1999). Esta herramienta utiliza la matriz de peso de la base de datos de factores de transcripción TRANSFAC R.3.4 desarrollada por el Dr. Wingender y col. [1996], y los *cut-offs* originalmente estimados por Tsunoda y Takagi [1999].

Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Las series de datos temporales se analizaron, por un lado, por ANOVA de una vía, seguido por test de Tukey. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. En los estudios de variación temporal, los datos fueron ajustados por la siguiente función: $y = M + A \cdot \cos(f + \omega t)$, donde M es el mesor, A es la amplitud, f representa la acrofase y t el tiempo en horas (h); ω es la velocidad angular que, en el caso de un ritmo circadiano con el tiempo expresado en horas, equivale a $\pi/24 = 0,2618$ radianes/h. Para convertir f en horas se la divide por ω . El procedimiento estadístico consiste en hallar los valores de M, A y f, que minimizan la suma de cuadrados del residual no explicado por el modelo de ajuste a los valores experimentales de la variable "y" [Golombek, 2007].

El ajuste se realizó utilizando la regresión no lineal del software GraphPad Prism5.0 (CA, EE. UU.). La frecuencia se tomó como 1 ciclo de 24 h del régimen de luz. Dado que el ANOVA clásico evalúa si uno o más medias difieren significativamente de las demás, pero no confirma la presencia de ritmicidad circadiana en la variación temporal, incluimos el análisis cronobiológico para validar los cambios temporales observados como ritmos circadianos [Refinetti y col., 2007]. Por lo tanto, cada serie de datos temporales se analizó utilizando el software Chronos-Fit 1.06 de Zuther y col. [2009], y el método Cosinor (SEPTMR, 2000), un método estadístico inferencial que ajusta una (o varias) curvas de coseno a los datos por mínimos cuadrados, produciendo estimaciones para el mesor (una media ajustada al ritmo), la amplitud y la acrofase (medidas de la extensión y el momento del máximo valor que toma la variable dentro de un ciclo). Sobre la base de la suma residual de cuadrados, se obtuvo un valor P de la prueba de amplitud

cero (sin ritmo) y del cálculo de intervalos de confianza del 95% para los parámetros [Thaela y col., 1998]. Se tomó un $p \leq 0.05$ como indicativo de la presencia de un ritmo en el período de 24 h (a priori). El porcentaje de ritmo es un parámetro cronobiológico para el coeficiente de determinación, es decir, el coeficiente de correlación al cuadrado multiplicado por 100 ($\% \text{ ritmo} = r^2 * 100$). Representa el porcentaje de variación en los datos explicado por el modelo ajustado. En los casos que requerían la comparación de mesor, amplitud o acrofase, entre los tres grupos, se utilizó ANOVA de una vía, seguido por test de Tukey, con $p < 0.05$ para diferencias significativas, mientras que cuando la comparación de estos parámetros fue entre dos de los grupos, se utilizó la prueba *t* de Student, con $p < 0.05$ para diferencias significativas.

Ensayos de metilación del ADN

a. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se aisló de cerebelo de rata usando el Easy® Pure Genomic DNA Kit (TransGen Biotech). La muestra de tejido se resuspendió en 100 μL de Buffer de Lisis del fabricante. Luego, se añadieron 20 μL de Proteinasa K, homogeneizando e incubándose a 55°C durante 3 h, vortexeando 3 veces por hora transcurrida. Posteriormente, y a temperatura ambiente, se adicionaron 20 μL de ARNasa A, y se incubó 2 min. Los tubos se centrifugaron a 12000 xg durante 15 min, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregaron 500 μL de *Binding Buffer* mezclando 5 s con vórtex, e incubando 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó los tubos y se transfirió el lisado a la columna spin, centrifugándose la columna a 12000 xg durante 30 s, descartándose el fluido del tubo. Se adicionó a la columna 500 μL de Buffer de Limpieza, luego se centrifugó a 12000 xg durante 30s,

descartando el fluido del tubo (esto se repitió al menos una vez más). Se incorporó a las columnas 500 µL de Buffer de Lavado y se centrifugó a 12000 xg durante 30 s, descartándose el fluido del tubo (repetir al menos una vez más este paso). Las columnas se centrifugaron vacías a 12000 xg durante 2 min y se reemplazó el tubo de recolección por un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 200 µL de agua ultrapura Milli-Q®, incubando 1 min para finalmente centrifugar el tubo a 12000 xg durante 1 min. La calidad y la pureza del ADN extraído se determinaron mediante densidad óptica en un espectrofotómetro de longitud de onda de 200 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA) y los tubos se almacenaron a -20°C.

b. Tratamiento con Bisulfito de Sodio

Para los análisis de metilación, 500 ng del ADN obtenido se sometió a tratamiento con bisulfito de sodio usando el kit de bisulfito EpiTect® (Qiagen, Valencia, CA). Básicamente, cuando se incuba el ADN de interés con bisulfito de sodio, las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las metiladas permanecen como citosinas (Figura 3.6). De esta manera, es posible analizar el perfil de metilación del material genético en diferentes tejidos.

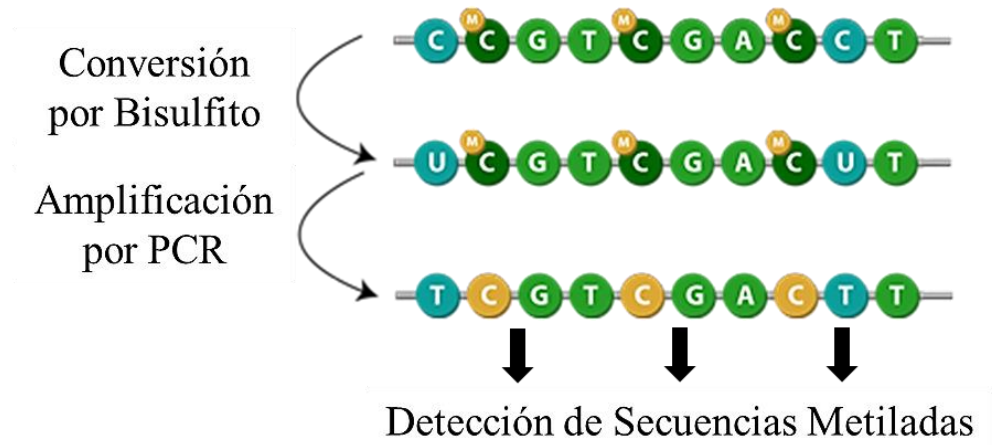


Figura 3.6: Representación de la reacción de conversión por Bisulfito de Sodio (modificado de https://www.epigentek.com/catalog/dna-bisulfite-conversion-c-75_21_47.html)

En resumen, en tubos Eppendorf de 200 μ L, se agregaron 500 ng de ADN en 20 μ L de agua ultrapura por muestra. Posteriormente, se añadieron 85 μ L de mezcla de bisulfito y 35 μ L de tampón de protección de ADN y 85 μ L de mezcla de bisulfito. La reacción de conversión se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, EE. UU.), de acuerdo con el siguiente ciclo (Tabla 3.5):

Tabla 3.5: Condiciones del termociclador para la conversión por Bisulfito

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	25 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	85 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	175 min	60°C
Infinito	∞	20°C

Cuando finalizó el proceso de conversión, se retiraron los tubos y la solución se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 560 μ L de solución de soporte de ARN y tampón BL, los tubos se agitaron en vórtex, el material se transfirió a columnas, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min y se desechó el líquido del tubo colector. Luego, se realizó una sucesión de lavados, primero con 500 μ L de tampón BW, luego con 500 μ L de tampón BD (con 15 min de descanso a temperatura ambiente) y nuevamente con 500 μ L de tampón BW. Se intercambiaron los tubos de recolección, se centrifugaron las columnas y se transfirieron a nuevos tubos de 1.5 mL, que se sometieron a un termobloque (agimaxx BSN20) a 56°C durante 5 min. Finalmente, el material se eluyó en 30 μ L de agua ultrapura Milli-Q® y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min.

Para evitar la degradación del material, los tubos se almacenaron a -80°C.

c. PCR

Después de la conversión de bisulfito, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el fragmento de interés del ADN convertido, con la ayuda de HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) y el termociclador Veriti (Applied Biosystems, EE. UU.). La reacción se compuso de los siguientes componentes (Tabla 3.6) y el ciclo se realizó de acuerdo con cada gen utilizado (Tabla 3.7).

Tabla 3.6: Composición de la reacción utilizando PyroMark PCR Kit

Componente	Cantidad
Agua RNAsa-free	8.5 µL
HotStarTaq Master Mix Kit	12.5 µL
Cebador sense (10 µM)	0.5 µL
Cebador antisense (10 µM)	0.5 µL
ADN molde	3 µL
Total	25 µL

Tabla 3.7: Secuencia de los cebadores utilizados y condiciones de reacción de PCR por gen

Gen	Primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)	Ciclos
<i>Región Regulatoria Bdnf exón 3</i>	Forward	ATTATTAATAGGATGGTTTTGGTAAAGTT	127pb	94 °C (30 s) 95 °C (15 min) 46 °C (30 s) 72 °C (30 s) x 50 ciclos 72 °C (10 min)
	Reverse	GTAGAGTTTATTAGTATTTGGATAGAGT		
	Sequencing	ATGGTTTTGGTAAAGTTAT		
	Secuencia a analizar	TC/TTAC/TTGATAAAAC/TTAAGGAAGTGAAGAAA		
<i>Cuerpo Génico Bdnf exón 9</i>	Forward	GTGAATGGGTTTAGGGTAGG	64pb	94 °C (30 s) 95 °C (15 min) 54 °C (30 s) 72 °C (30 s) x 45 ciclos 72 °C (10 min)
	Reverse	TGGATGAGGATTAGAAGGTTCCGGTT		
	Sequencing	GTTTTGGTTGATATTTTTGA		
	Secuencia a analizar	GTAC/TTGATC/TAAGAGTTGTTGGATGAGGATTAG		
<i>Región Regulatoria Trk β exón 1</i>	Forward	GGTCGGAGTTATAAATGGTGAGAGG	239pb	94 °C (30 s) 95 °C (15 min) 50 °C (30 s) 72 °C (30 s) x 45 ciclos 72 °C (10 min)
	Reverse	ATAGGGTAGGGGATAGGGG		
	Sequencing	ATTGAGATTTAGGGCGTTGTTAG		
	Secuencia a analizar	TATTC/TAC/TTTC/TGGAATTATTTTAC/TTGTTTT		

Finalmente, se usaron 5 µL del producto de reacción para confirmar su calidad en gel de agarosa al 1.5% con GelRed™ (Uniscience, São Paulo, SP) y los 20 µL restantes se usaron para cuantificar los sitios CpG metilados de cada uno de los genes involucrados en el proyecto, por pirosecuenciación.

d. *Inmovilización de productos de PCR en esferas de estreptavidina Sefarosa HP*

Para el análisis de pirosecuenciación, la cadena de ADN se inmovilizó en esferas de captura de ADN (perlas) capaces de unir la cinta biotinilada del material. Para esto, el producto de PCR se homogeneizó en una mezcla que contenía estreptavidina, tampón de unión y agua, como se indica a continuación (Tabla 3.8), en una placa de PCR de 96 pocillos.

Tabla 3.8: Componentes para inmovilización de ADN

Master mix	Volumen por muestra
Streptavidin Sepharose HP beads	3 μ L
<i>PyroMark Binding</i> Buffer (tampón de ligación)	40 μ L
Agua RNasa-free	17 μ L
Producto de PCR	20 μ L
Volumen total	80 μL

La placa se sometió a agitación constante durante 10 min a temperatura ambiente (15-25°C), a 1400 rpm. Durante la inmovilización, se prepararon la estación de trabajo de vacío PyroMark Q96 (compuesta por solución de etanol 70%, solución desnaturizante y solución de lavado 1X), la tarjeta de secuenciación PyroMark Q96 HS (conteniendo una solución de *annealing* y *sequencing* primer) y el cartucho; éste último contenía sustrato, dNTPs y enzima (volúmenes informados por el software).



Figura 3.7: Estación de trabajo de vacío PyroMark Q96. Las posiciones marcadas contienen: (1) etanol al 70%, (2) solución desnaturalizante PyroMark, (3) tampón de lavado PyroMark y (4/P) agua ultrapura.

e. Análisis de metilación por pirosecuenciamiento

Inicialmente, se encendió el vacío del dispositivo (Figura 3.7) y se aspiró el material de la placa de PCR. El fragmento de ADN se sumergió en etanol al 70%, solución desnaturalizante (tampón de desnaturalización Pyromark) y tampón de lavado 1X (tampón de lavado Pyromark) por 10 s y se dispensó en la placa a secuenciar conteniendo cebadores de secuenciación (Tabla 3.9) a una concentración de 0,4 μM en 40 μL de *Annealing* Buffer. La placa se incubó durante 3 min a 80°C y se enfrió de forma natural (temperatura ambiente), durante aproximadamente 5 min, de modo que los cebadores de secuenciación se unieron al producto de PCR, que luego se analizó por pirosecuenciamiento en el equipo PyroMark PSQ96ID (Qiagen, Valencia, CA).

Tabla 3.9: Secuencia de los cebadores utilizados en la Pirosecuenciación

<i>Cebadores de Secuenciación</i>	Secuencia de los cebadores
Bdnf exón 3	AS: ATGGTTTTGGTAAAGTTAT
Bdnf exón 9	AS: GTTTTTGGTTGATATTTTTGA
TrkB exón 1	S: CTAACAACCCCTAAAATCTCAAT

Este método de secuenciación considera cada sitio CpG como un polimorfismo C/T y genera datos cuantitativos que proporcionarán una proporción de alelos metilados versus no metilados. La reacción de pirosecuenciación comienza desde la región 3' del cebador de secuenciación. Los nucleótidos (A, T, C y G) se dispensan en cada muestra, uno a la vez. Cada vez que se agrega una base complementaria a la base del producto de PCR, se incorpora a la cadena de ADN en crecimiento, lo que resulta en una cascada enzimática y producción de luz (Figura 3.8). La intensidad de la luz se mide con cada dispensación y se presenta gráficamente en un pirograma. El orden de dispensación es generado automáticamente por Pyromark CpG Software a partir de la secuencia de interés, además de incluir bases negativas como control de reacción.

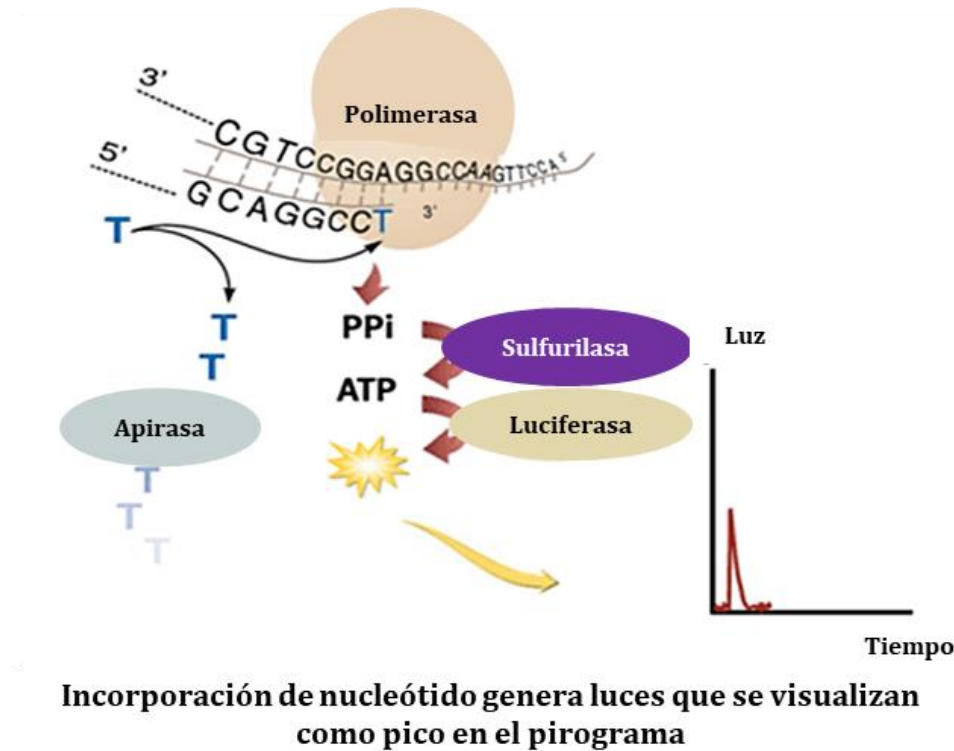


Figura 3.8: Cascada enzimática durante la reacción de pirosecuenciación (modificado de England y Pettersson, 2005)

Cuando se incorpora un nucleótido en la cadena de ADN, la enzima sulfurilasa libera un pirofosfato y se convierte en ATP. Esto proporciona energía a la luciferasa para oxidar la luciferina y generar luz, que se detecta como un pico en el pirograma. La enzima Apirasa degrada cualquier nucleótido no incorporado [England y Pettersson, 2005].

8-ESTUDIOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Ensayos celulares

La línea celular derivada de fibroblasto embrionario de ratón *Mus musculus* seleccionada para el estudio fue NIH-3T3 (ATCC® CRL1658™). La cepa se cultivó en medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco - código 12657-029) y

1% de penicilina/estreptomicina (PS) (Sigma-Aldrich - código P4333). Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda, que contenía CO₂ (5%), a 37°C, hasta un 90% de confluencia. Los pases se realizaron con tripsina 0.25% Tryplex express (código Gibco. 12604021), cuando las células alcanzaron la confluencia total de la superficie plateada. Para llevar a cabo los experimentos, la línea celular fue usada entre el tercer y quinto pasaje.

Reacción de extracción de ADNg

A fin de aislar y clonar los fragmentos de las regiones reguladoras de los genes en estudio, se procedió a la extracción de ADNg a partir 50-80 mg de cerebelo con 800 µL del reactivo comercial TRIzol (Invitrogen/life Technologies), incubando con el mismo 5 min. Se adicionó 200 µL de Cloroformo y se agitó vigorosamente el tubo por 15 s; incubándose 3 min en baño de hielo, pasado este período, se centrifugó a 11000 rpm por 15 min a 4°C. Se removió cualquier remanente de fase acuosa de la interfase con ADNg, añadiéndose 300 µL de Etanol 100% y se mezcló por inversión, incubándose 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó el tubo a 2500 rpm por 5 min a 4°C, seguidamente se removió el SN (aquí fue opcional re-precipitar con Etanol 100% una vez más) y se lavó el pellet de ADNg con 1mL de Citrato de sodio e incubó por 30 min a temperatura ambiente, mezclándose ocasionalmente por inversión. Se centrifugó a 2500 rpm por 5 min a 4°C, removiéndose el SN y se repitió el lavado una vez más. Se adicionó 1.5 mL de etanol 75% y se incubó toda la noche, centrifugándose a 2500 rpm por 5 min a 4°C, se removió el SN y se dejó secar el pellet de ADNg por 3 min. Se resuspendió el pellet en 300 µL de Hidróxido de sodio 8 mM, luego se centrifugó a 11000 rpm por 10 min a 4°C, transfiriéndose el SN a un tubo eppendorf nuevo y almacenándose.

Diseño de los cebadores y amplificación de los fragmentos

Una vez identificadas las regiones a clonar de los genes de interés, se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los genes seleccionados (ADN genómico) (Tabla 3.10).

Tabla 3.10: Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de los genes en la biblioteca de ADNc

<i>Cebadores</i>	<i>Secuencia de los cebadores</i>	<i>Amplicón</i>
Ogg1	S: AAGCTAAGAATTCACATGCCCC AS: CCTGTATATGGAGTTCACTG	954pb
Ape1	S: CAGGTCAGTGAGACCGTCTC AS: TGTTCACACGTGGGCGATT	929pb

Los marcos de lectura de los genes elegidos se amplificaron por PCR convencional *Phusion High Fidelity DNA pol* con cebadores específicos (Tabla 3.10), utilizando la enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England, Biolabs). Durante la reacción de PCR, en todos los casos las muestras se desnaturalizaron a 98°C durante 3 min. Posteriormente, cada ciclo de amplificación se realizó de la siguiente manera: (1) desnaturalización a 98°C durante 3 min; (2) hibridación de cebadores a 98°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s (3) elongación a 72°C por 10 min. La cantidad de ciclos de amplificación programados fueron: 35 ciclos para el gen de Ogg1 y 35 ciclos para el gen Ape1.

El producto de PCR se aplicó en un gel de agarosa al 1% para electroforesis y verificación de los fragmentos amplificados. Las bandas amplificadas se cortaron

del gel con la ayuda de un bisturí y se purificaron con NucleoSpin Gel y el kit PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Clonado en el plásmido de clonación

Los fragmentos purificados de ADN genómico de Ogg1 y Ape1, se clonaron en el plásmido de entrada comercial pCR-Blunt II TOPO (Thermo Scientific), utilizando 0.25 μ L del vector, 1 μ L de solución salina (NaCl 1,2 M y MgCl₂ 0,06 M) y 4.75 μ L del inserto (fragmento purificado). Para que se produzca la conexión, después de la homogeneización, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las ligaciones se transformaron en bacterias NEB® 5-alfa Competentes E. coli (Alta Eficiencia, Promega). Para que el plásmido penetre en las bacterias, los poros se abrieron en la membrana mediante choques térmicos, 30 min en hielo 30 s a 42°C seguido de otros 2 min en hielo, después de este estrés, las bacterias se recuperaron en SOC y se incubaron a 37°C, en placas de agar LB (Invitrogen) con kanamicina (50 μ g/mL), durante la noche para el crecimiento de clones.

Los clones aislados se seleccionaron y se cultivaron en medio LB líquido (Invitrogen) con kanamicina (50 μ g/mL), después del crecimiento bacteriano, la extracción de ADN se realizó utilizando la técnica de lisis alcalina. Para esta extracción, se utilizaron reactivos preparados en el laboratorio. Primero, se hace una alícuota de 1 mL con la suspensión de bacterias en medio LB, se aplica una centrifugación de 21000 xg a 4°C durante 5 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento formado se resuspendió en 200 μ L de solución P1 (Tris HCl 50 mM + EDTA 10 mM + 100 μ g/mL de ARNasa) homogeneizando con vortex, luego se agregaron 200 μ L de solución P2 (SDS al 10%, NaOH 0.2M) mezclando por

inversión (este reactivo es responsable de la lisis de las bacterias), después de una incubación durante 4 min, se añadieron 200 μ L de P3 (acetato de potasio 3 M), que neutraliza el tampón de lisis. La centrifugación se realizó a 21000 xg a 4°C durante 15 min. En este paso, los restos celulares deben adherirse al tubo y el sobrenadante, que contiene el ADN de interés, se transfiere a otro tubo para los pasos de purificación. Se agregan 600 μ L de isopropanol y se centrifuga a 21000 xg a 4°C durante 15 min, se precipita el ADN y se desecha el isopropanol, este paso se repite utilizando 500 μ L de etanol al 70%. Después de la evaporación del etanol, el ADN finalmente se eluye en 30 μ L de agua Milli-Q®.

Screening para la selección de clones

Después de la extracción de ADN, los clones se analizaron para determinar la orientación de inserción del fragmento, con enzimas seleccionadas para la digestión, basándose en análisis *in silico*.

Para el *screening*, se seleccionaron las siguientes enzimas:

- **pCR-Blunt_Ogg1**: PstI (Thermo Scientific)
- **pCR-Blunt_Ape1**: XbaI (Thermo Scientific)

Estas enzimas tenían regiones de corte dentro del inserto, por lo que fue posible inferir si el fragmento se había ligado en la dirección de sentido (*sense*) o en la dirección antisentido (*antisense*) dentro del plásmido. Después de esta digestión, se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1% y se seleccionó un clon *sense* para la amplificación de la bacteria, nuevamente en medio LB (Invitrogen) con Kanamicina (50 μ g/mL).

Después de la incubación durante la noche para el crecimiento bacteriano, la extracción de ADN se realizó esta vez con el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey

Nagel) que, a través de la filtración en columna a base de sílice, ofrece una mayor pureza del ADN extraído. Se preparó un sedimento bacteriano con una centrifugación de 30 s a una velocidad de 21000 xg, se eliminó el SN por inversión y se añadieron 250 µL de tampón A1 (contiene RNAsa) para resuspensión del sedimento bacteriano mediante agitación en vórtex. Se agregaron 250 µL de tampón A2 (hidróxido de sodio al 0.5-2%) para la lisis, el tubo se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y, después del tiempo de incubación, adicionar 250 µL de tampón de neutralización A3 (Hidroclorhidrato de guanidina 36-50%) mezclando por inversión y centrifugando a 21000 xg durante 10 min a temperatura ambiente.

Se traspasó el sobrenadante a una nueva columna, centrifugando nuevamente a 21000 xg durante 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 500 µL del tampón AW (Hidroclorhidrato de guanidina 36-50% + 20-50% de 2-propanol) con centrifugaciones en el medio de 2100 xg durante 1 min a temperatura ambiente. Luego se adicionó 600 µL del tampón A4 (Buffer de lavado con etanol) y se centrifugo a 21000 xg durante 1 min a temperatura ambiente. Descartado el fondo de la columna, se centrifugó a 21000 xg durante 3 min a temperatura ambiente, colocando la columna en un nuevo tubo de recolección, donde se eluyó el ADNp con 30 µL de agua Milli-Q®.

Screening para la confirmación de clones por Secuenciación de Sanger

La integridad de las secuencias de codificación se verificó mediante secuenciación Sanger, mediante purificación con etanol y EDTA-acetato de sodio en el secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para cada

plásmido usado, se realizaron dos reacciones, en cada una se usó un cebador para verificar el fragmento completo en ambas orientaciones.

Los cebadores utilizados fueron:

- **Seq_pCR2.1_F** (5' TGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3'), para secuenciación directa
- **Seq_T7** (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'), para secuenciación inversa.

Estos cebadores tienen anclaje en algunas bases antes de las regiones de clonación de los plásmidos pCR-Blunt_Ogg1 (s) (Thermo Scientific), pCR-Blunt_Ape1 (s) (Thermo Scientific), pCDNA3 (Invitrogen), pCDNA3_Clock (Invitrogen) y pCDNA3_Bmal1 (Invitrogen), para permitir la verificación completa del fragmento, así como la orientación correcta y la región de unión en el plásmido.

El protocolo utilizado, incluye la reacción de secuenciación con 0.3 µL de Big Dye, 2 µL de tampón de secuenciación, 1 µL de cebador (3.2 M) y 200 ng de ADN plasmídico. Para la reacción, se usó el termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) con temperaturas de 96°C durante 10 s, 50°C durante 5 s, 60°C durante 4 min, en 30 ciclos.

Una vez completado el ciclo, se inició la purificación donde la placa que contenía las muestras se centrifugó 180 xg durante 1 min. Se añadieron 25 µL de etanol al 100%, 1 µL de EDTA (125 mM), 1 µL de acetato de sodio (3 M), se homogeneizaron durante 2 min en un agitador orbital y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Después del período de incubación, se centrifugó a 2000 xg durante 45 min, y el sobrenadante se desechó por inversión inmediatamente. Se añadieron 35 µL de etanol al 70% y se centrifugaron durante 15 min a 1680 xg, se eliminó el sobrenadante y la placa se incubó durante 15 min para la evaporación del etanol. Se realizó un spin para asegurar un mejor secado de 190 xg durante 1

min a 20°C. La muestra se resuspendió en 10 µL de HiDye formamida (ABI) y se llevó al termociclador durante un ciclo único de 5 min a 90°C para la desnaturalización del ADN; posteriormente se realizó un spin e incubación en hielo durante 5 min, repetir spin y secuenciar.

Después de la secuenciación, el electroferograma se analizó mediante alineación utilizando el software Clustal X42, que compara la secuencia ensamblada en sílice con la secuencia generada por la secuenciación de Sanger.

Clonación en el plásmido reportero

Después de la confirmación por secuenciación capilar, los genes recombinantes seleccionados se eliminaron de los plásmidos pCR-Blunt_Ogg1 y pCR-Blunt_Ape1 de entrada mediante digestión con enzimas específicas para cada gen:

- **pCR-Blunt_Ogg1** → BamHI (Thermo Scientific) y EcoRV (Thermo Scientific)

- **pCR-Blunt_Ape1** → se sometió a PCR convencional Phusion High Fidelity DNA Pol (New England, Biolabs) con los cebadores de la Tabla 3.10, posteriormente se trató el producto con la enzima PNK (Thermo Scientific).

Se realizó electroforesis, las bandas con los fragmentos se cortaron y purificaron, como se describió anteriormente.

Los fragmentos de Ogg1 se subclonaron en el plásmido reportero psi.CHECK2 (New England Biolab), con la enzima modificada (corresponde a una digestión enzimática con NheI (New England Biolab), seguida purificación del vector se trató con la enzima Klenow (New England Biolab), a continuación se digirió con la enzima BglIII (New England Biolab), y finalmente se sometió a una

fosfatasa CIP (New England Biolab). Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, donde 8 μ L del inserto (ADN purificado en banda), 0.5 μ L enzima ADN ligasa T4 (Thermo Scientific), 1 μ L de tampón T4, 0.5 μ L de psi.CHECK2.

psi.CHECK2 vector. Los pasos de transformación y selección de los clones correctos (*screening* con las enzimas AseI (Thermo Scientific) y SmaI (Thermo Scientific) fueron idénticos al ítem anterior, excepto por el antibiótico utilizado, ya que el plásmido psi.CHECK2 (New England Biolab) confiere resistencia a la ampicilina (100 μ g/mL).

Los fragmentos de Ape1 se subclonaron en el plásmido reportero pGL3 (Promega; Figura 3.9), con la enzima modificada (corresponde a una digestión enzimática con SmaI (Thermo Scientific) y AvrII (Thermo Scientific), seguida de incubaciones diferenciales de temperatura y seguida purificación del vector se trató con la enzima Klenow (New England Biolab). Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo de 5 μ L del inserto, 1 μ L enzima ADN ligasa T4 (Thermo Scientific), 1 μ L de tampón T4, y 3 μ L de pGL3.

pGL3 vector. Los pasos de transformación y selección de los clones correctos -*screening* con las enzimas SmaI (Thermo Scientific) y NheI (Thermo Scientific)- fueron idénticos al ítem anterior, excepto por el método de transformación utilizado, ya que el plásmido pGL3.promoter (Promega; Figura 3.9) incorporó 1 μ L del producto de ligación pGL3.promoter_Ape1 por electroporación (Biorad Gen Pulser xcell) en 50 μ L de bacterias electrocompetentes c2989 TOP10ec frescas (Thermo Scientific) a 1800V, 25F, 200 Ω durante 5.1 ms. Posteriormente se recuperó en medio SOC y se plaqueo en agar con ampicilina (100 μ g/mL).

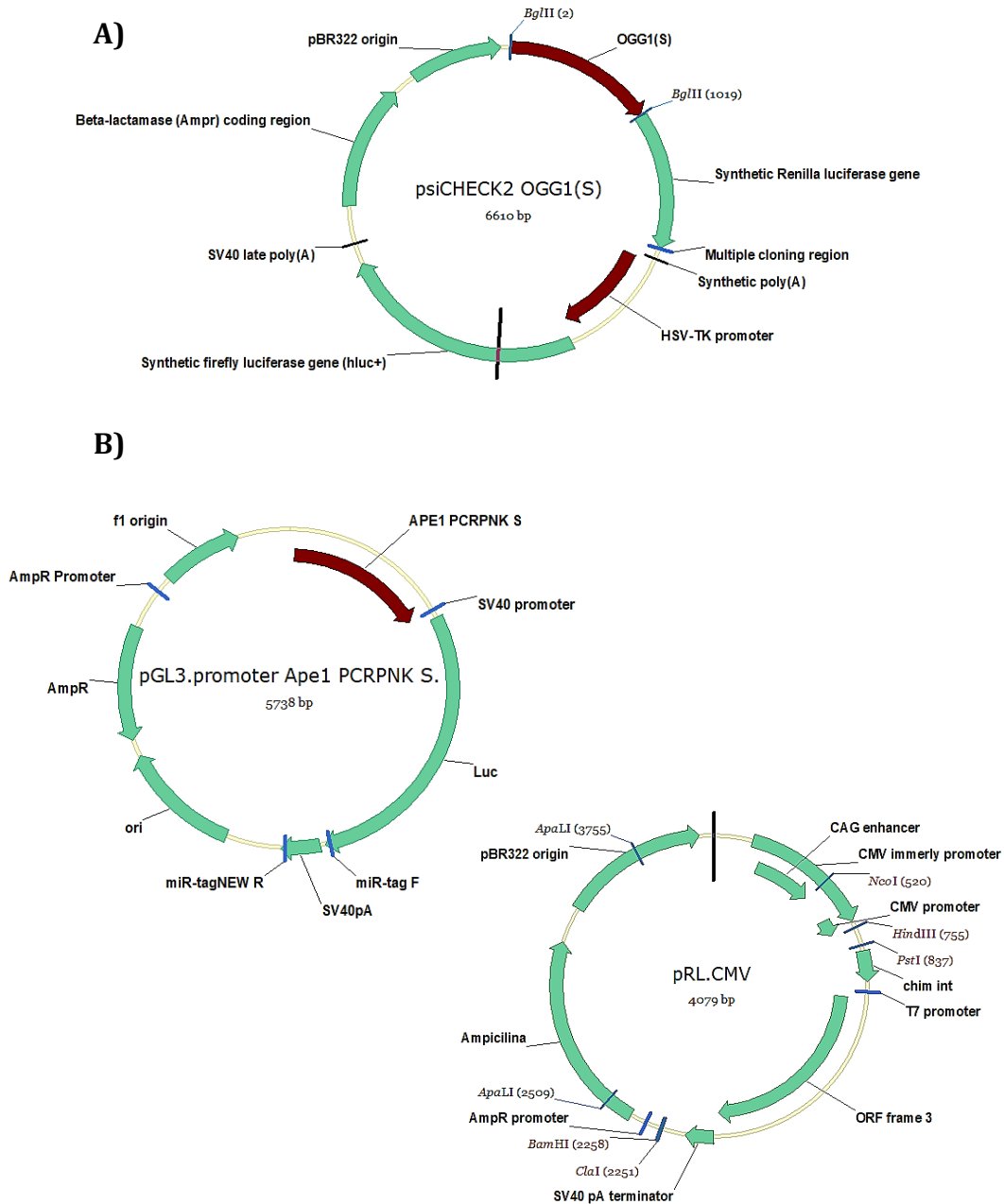


Figura 3.9: Diseño *in silico* de los plásmidos reporteros psiCHECK_Ogg1 (A) y pGL3promoter_Ape1 junto a pRL.CMV (B), a través del software Vector NTI Advanced 10.3.0.

MIDI PREP

Una vez confirmada la construcción correcta de los vectores, se realizó una extracción de ADNp de psi.CHECK2, psi.CHECK2_Ogg1, pGL3.promoter, y pGL3.promoter_Ape1, y además de pCDNA3, pCDNA3_Clock y pCDNA3_Bmal1 (estos tres últimos donados por el Dr. Rubén Baler de la Unidad de Expresión

Temporal, del Laboratorio de Regulación Celular y Molecular del Instituto Nacional de Salud Mental, NIMH, NIH, USA), para la obtención de concentraciones de entre 200 a 3000 ng/ μ L.

Después de la incubación durante la noche para el crecimiento bacteriano, la extracción de ADNp se realizó con el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel), comenzando por una centrifugación de 400 mL medio LB (Invitrogen), con el plásmido de interés, a 6000 rpm durante 15 min a 4°C y posterior descarte del SN. Se adicionó al pellet 8 mL de Buffer RES (libre de RNA), agitándose vigorosamente hasta disolver el pellet; se transfirió el volumen total a un tubo Falcon de 50 mL y se adicionó 8 mL de Buffer de Lisis (NaOH 0.5-2%), mezclándose por inversión e incubándose 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 8 mL de Buffer de Neutralización, mezclándose por inversión y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min a 4°C.

Se armó, en un vaso de precipitado de 2 L, la estructura con jeringa y se filtró para continuar el procedimiento. Se humedeció con 12 mL por los laterales de la membrana del filtro de la jeringa con el Buffer EQU. Se adicionó el SN con pipeta por los laterales del filtro de la jeringa, se añadió 5 mL de Buffer EQU, retirándose y descartándose el filtro. Seguidamente, se agregó 8 mL de Buffer *Wash* (etanol 5-20%) y se colocó la columna en un tubo Falcon de 15 mL, adicionándose a la misma 5 mL de Buffer ELU (2-propanol 10-15%) y posteriormente se desechó la columna.

Se añadió al tubo Falcon 3.5 mL de Isopropanol 100%, agitándose e incubándose 2 min a temperatura ambiente. Según instrucciones del fabricante se procedió al armado de la jeringa con filtro de aire, colocándose en la misma el producto del procedimiento que se describió previamente, y se filtró en un nuevo tubo Falcon de 15 mL (esto se realizó con cuidado y según manual de fabricante).

Se adicionó 2 mL de Etanol 70% y se volvió a filtrar. Se secó el filtro para evaporación del etanol (esto con repeticiones de seis veces), luego se añadió 400 µL de H₂O Milli-Q® a la jeringa y se eluyó en un tubo eppendorf de 2 mL (este paso se puede repetir una vez más). Finalmente, se cuantificó el ADNp y se almacenó.

Transfección

Para la expresión de proteínas, se seleccionó una línea celular comúnmente utilizada para este propósito. La línea celular derivada de fibroblasto embrionario de ratón *Mus musculus* seleccionada para el estudio fue NIH-3T3 (ATCC® CRL-1658™). Los plásmidos contruidos con las secuencias de genes que codifican las proteínas seleccionadas se transfectaron con liposomas, utilizando el reactivo de lipofectamina.

Concentraciones y combinación de plásmidos usados en la transfección transitoria de los vectores reporteros y de expresión, para estudiar la regulación transcripcional de Ogg1:

1. pSI.CHECK2 (200 ng) + pCDNA3 (800 ng)
2. pSI.CHECK2_Ogg1 (200 ng) + pCDNA3 (800 ng)
3. pSI.CHECK2_Ogg1 (200 ng) + pCDNA3 (400 ng) + pCDNA3_Bmal1 (400 ng)
4. pSI.CHECK2_Ogg1 (200 ng) + pCDNA3 (400 ng) + pCDNA3_Clock (400 ng)
5. pSI.CHECK2_Ogg1 (200 ng) + pCDNA3_Bmal1 (400ng) + pCDNA3_Clock (400 ng)
6. NTC
7. pCI.Neo.EGFP

Concentraciones y combinaciones de plásmidos usados en la transfección transitoria de los vectores reporteros y de expresión, para estudiar la regulación transcripcional de Ape1:

1. pRL.CMV (20ng) + pGL3.promoter (192ng) + pCDNA3 (768 ng).
2. pRL.CMV (20ng) + pGL3.promoter_Ape1 (192ng) + pCDNA3 (768 ng).
3. pRL.CMV (20ng) + pGL3.promoter_Ape1 (192ng) + pCDNA3 (384 ng) + pCDNA3_Bmal1 (384 ng).
4. pRL.CMV (20ng) + pGL3.promoter_Ape1 (192ng) + pCDNA3 (384 ng) + pCDNA3_Clock (384 ng).
5. pRL.CMV (20ng) + pGL3.promoter_Ape1 (192ng) + pCDNA3_Bmal1 (384 ng) + pCDNA3_Clock (384 ng).
6. NTC
7. pCI.Neo.EGFP

La cepa NIH-3T3 se sembró en placa 24 h antes de la transfección, se sembraron 3.0×10^3 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, y debían alcanzar una confluencia celular del 90-100% en el momento de la transfección. El protocolo seguido fue el recomendado por la compañía de Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific), donde es aconsejable optimizar la reacción para la transfección de dos pozos. Primero, se identificaron dos tubos, se añadieron 5 μ L de medio de transfección Opti-MEM (Thermo Scientific) a cada tubo. En uno de los tubos, se añadieron 0.2 μ L de reactivo P3000 (Thermo Scientific) y 100 ng del ADN de interés. En el otro tubo que ya contenía el medio de transfección, 0.3 μ L de lipofectamina 3000, fue hidratada durante 5 min. Después de este período de incubación, los tubos se combinaron, se agitaron en vórtex durante 3 s y se incubaron durante 20

min a temperatura ambiente para formar las esferas liposomales contenedoras del ADN. Se goteó 10 μ L de esta mezcla sobre las células NIH-3T3 previamente plaqueadas y se llevó nuevamente a la incubadora.

Ensayo de prueba de Luciferasa

Para confirmar si el plásmido construido cuando se transfectó en una línea celular genera la expresión de *Luciferase*, se realizó una transfección de prueba para un ensayo de *Luciferase* (Promega).

Primero, se sembraron 44 pocillos con triplicados que contenían 10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, divididos en 4 grupos, cada uno transfectado por el protocolo lipofectamina 3000 (Thermo Scientific) y un control negativo. Los plásmidos utilizados fueron: el plásmido de control de transfección que expresa EGFP (pCI.Neo.EGFP), el plásmido de control del ensayo Luciferase (pSI.CHECK2 para el inserto Ogg1 y pGL3.promoter para el inserto Ape1), pGK.FRT.Luc y el control negativo.

El protocolo Luciferase se realizó 48 h después de la transfección, eliminando primero el medio DMEM (Sigma-Aldrich) y lavando con 100 μ L de DPBS 1X para la eliminación completa del medio. Luego, se agregaron 20 μ L de tampón de lisis PLB 1X (*Passive lysis Buffer - Kit Luciferase Assay - Promega*) a cada pocillo. Finalmente, se agregaron 100 μ L de LARII (*Luciferase assay reagent - Kit Luciferase Assay - Promega*) y se midió la actividad *Firefly luciferase* por Varioskan, luego se adicionó 100 μ L del reactivo Stop&Glo y se midió la actividad *Renilla luciferase* por Varioskan.

Parte III

RESULTADOS

Capítulo 4

Evaluación fisiológica y comportamental del modelo experimental

En este capítulo, procedimos, en primer lugar, a caracterizar nuestro modelo experimental, a través de la evaluación de parámetros fisiológicos y comportamentales, tales como: apariencia, peso corporal, calidad del sentido olfatorio, estado ansiogénico y de habituación, de los tres grupos en estudio: ratas de 3 meses de edad, alimentadas *ad-libitum* (jóvenes AL), ratas de 22 meses de edad, alimentadas AL (viejas AL) y ratas viejas sometidas a un protocolo de restricción calórica (viejas con RC).

Primeramente, realizamos la evaluación observacional de la apariencia y la estimación del peso corporal, de los tres grupos de animales, según los parámetros descritos por Phillips y cols. [2010] en su método de evaluación observacional de envejecimiento de animales de laboratorio.

A continuación, para determinar la calidad en la función olfativa utilizamos el *Buried Food Pellet test*, que tiene en cuenta la “latencia del hallazgo” de un anillo azucarado por parte de cada animal [Yang y Crawley, 2009; Ye y col., 2014; Sun y col., 2018]. Para evaluar el estado ansiogénico en el ambiente donde, posteriormente, desarrollamos los test comportamentales, se midieron parámetros como “número de esquinas visitadas”, “latencia del primer levantamiento” y “número total de levantamientos” de cada roedor, utilizando el *Corner test* [Arranz y col., 2009]. Posterior a la evaluación del sentido olfativo y estado de ánimo de los

animales, realizamos el estudio de habituación de las ratas a ambientes novedosos a través del *Open Field test* [Walsh y Cummins, 1976; Hughes y Hancock, 2017]. A partir de este estudio se pueden analizar diversos parámetros, nosotros nos focalizamos en la “distancia recorrida” y “cantidad de micciones y defecaciones” de los grupos experimentales.

Una vez finalizados los controles necesarios para la realización de los test comportamentales, procedimos a la evaluación de la coordinación motora y equilibrio, a través de *Beam Walking test*, y la evaluación de aprendizaje motor mediante el *Single Reaching Pellet test* [Urakawa y col., 2007; Luong y col. 2011; Klein y Dunnett, 2012; Chen y col., 2014], en los tres grupos experimentales. Es importante aclarar que, todas las caracterizaciones y pruebas comportamentales ser realizaron entre las 17:00 y 18:00 h, con el fin de trabajar en el período conocido como *actividad anticipatoria de alimentación*, cuando los animales pueden predecir el momento de disponibilidad de alimento diario; además, teniendo en cuenta que Mendoza y col. [2010] proponen a cerebelo (estructura cerebral objeto de nuestro estudio) como oscilador circadiano necesario para el óptimo desarrollo de esta función. Con el tiempo, el cerebelo ha ido captando mayor atención en cuanto a sus funciones, siendo una de las razones la propuesta por Watson y col. [2019], quienes cuestionan la divergencia de las funciones conductuales, como, por ejemplo, la navegación espacial (hipocampo) por un lado, y el control motor (cerebelo), por el otro, y sugieren que cerebelo e hipocampo interactúan dinámicamente.

1- Estudio observacional de apariencia

En este trabajo, comenzamos evaluando la apariencia de los grupos experimentales a través de parámetros del método observacional propuesto por Phillips y col. [2010]. Observamos que los animales de 22 meses de edad presentan características fenotípicas como: pelaje amarillento, opaco, piloerección, cola con hiperqueratosis, descamación, y materia fecal, en comparación con los adultos jóvenes de 3 meses de edad (Figura 4.1). Llamativamente, las ratas viejas sometidas durante tres (3) meses a una dieta con RC, recuperan las características de pelaje y piel saludables, observadas en el grupo de ratas jóvenes (Figura 4.1).



Figura 4.1- Estudio observacional de apariencia. En la figura se visualiza imágenes tomadas fotográficamente de todos los grupos experimentales en estudio (en color negro las ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*, en color rojo las ratas viejas alimentadas *ad-libitum* y en color azul las ratas viejas sometidas a RC).

2- Pesos corporales

Previo a los últimos 15 días del tratamiento, cuando los animales son sometidos a condiciones de oscuridad constante (OO), realizamos la estimación del peso corporal de los grupos de ratas estudiados, tomando registro de los mismos en balanza durante ZT2-ZT4 (con ZT0= momento en que se enciende la luz en el Bioterio). El grupo de ratas viejas AL presentó un aumento significativo, en comparación con el grupo de jóvenes AL (** $p < 0.001$, Figura 4.2). La RC ocasionó una disminución significativa del peso corporal en comparación con el grupo de

ratas viejas AL (** $p < 0.001$), retornando al peso observado en los animales jóvenes AL (Figura 4.2).

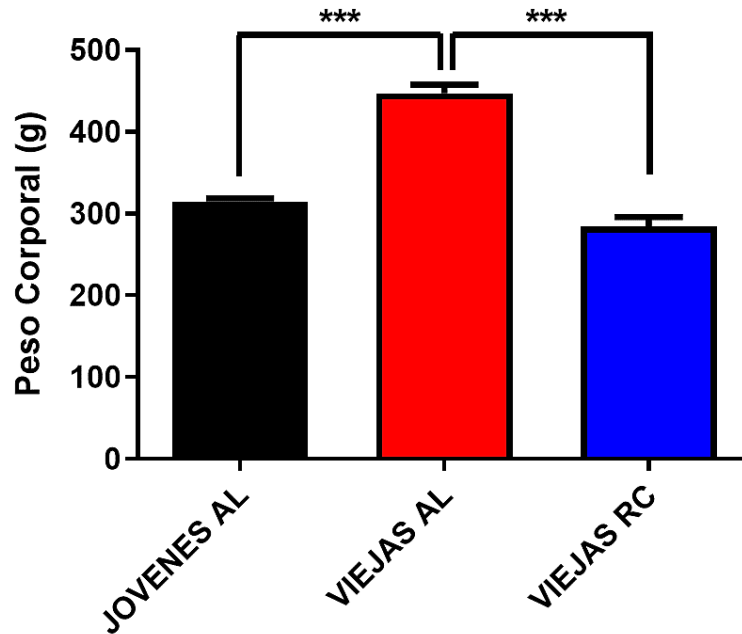


Figura 4.2- Estimación del Peso Corporal. En la figura se representa en gráfico de barras, la media±error estándar de los pesos corporales de los grupos estudiados (en color negro las ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*, en color rojo las ratas viejas alimentadas *ad-libitum* y en color azul las ratas viejas sometidas a RC). El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía, seguido por test de Tukey, con *** $p < 0.001$ cuando la diferencia entre las medias fue significativa.

3- Función Olfativa

Cuando evaluamos la función olfativa, observamos un aumento significativo en el tiempo de búsqueda de las ratas viejas alimentadas *ad-libitum*, en comparación a los animales jóvenes alimentados *ad-libitum* (** $p < 0.001$, Figura 4.3), mientras que los animales viejos sometidos a RC mostraron una disminución significativa en la “latencia de hallazgo” del pellet en comparación con el grupo de ratas viejas alimentadas *ad-libitum* (** $p < 0.001$), y ninguna diferencia con el grupo de jóvenes AL (Figura 4.3).

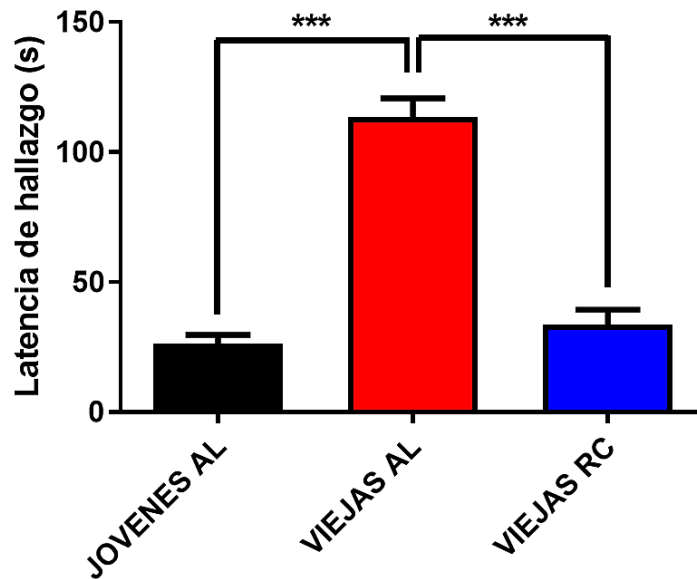


Figura 4.3- Calidad de la función olfativa. En la figura se representa en gráfico de barras la media±error estándar de la Latencia de hallazgo de los grupos experimentales en estudio (en color negro las ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*, en color rojo las ratas viejas alimentadas *ad-libitum* y en color azul las ratas viejas sometidas a RC). El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía seguido por test de Tukey, con *** $p < 0.001$ cuando la diferencia entre las medias fue significativa.

4- Neofobia

Al evaluar la neofobia a través del *Corner test*, no observamos diferencias significativas entre el grupo de ratas viejas AL y jóvenes AL, en los parámetros “número de esquinas visitadas” y “número de levantamientos”. Sin embargo, el grupo de ratas viejas con RC, presentó un mayor estado de ansiedad en comparación a los otros dos grupos (Figura 4.4 A-C), evidenciado por un mayor “número de esquinas visitadas” (** $p < 0.01$ y # $p < 0.05$; Figura 4.4 A) y mayor “número de levantamientos” (** $p < 0.001$ y # $p < 0.05$; Figura 4.4 C) en la caja de prueba. No observamos diferencias significativas en la “latencia del primer levantamiento” entre los tres grupos experimentales (Figura 4.4 B).

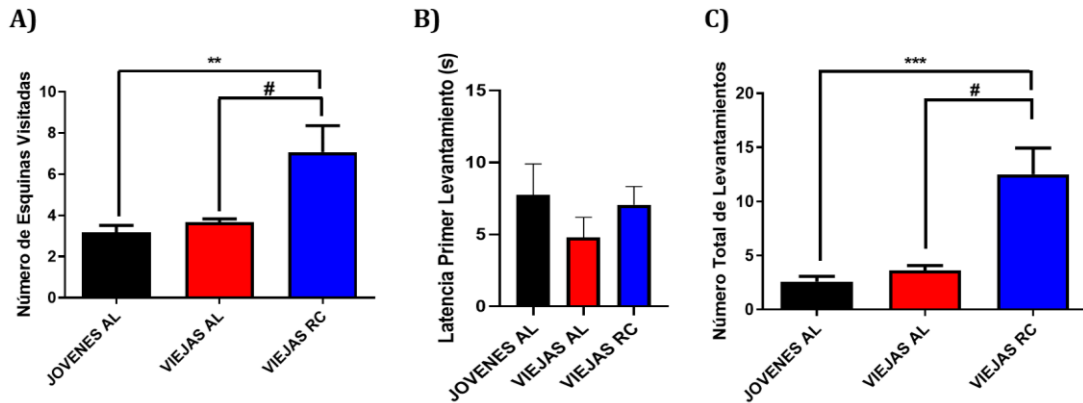


Figura 4.4- Evaluación del estado ansiogénico. (A) Número de esquinas visitadas. (B) Latencia del primer levantamiento. (C) Número total de levantamientos. Las barras representan la media \pm error estándar de los grupos experimentales en estudio (en color negro las ratas jóvenes AL, en color rojo las ratas viejas AL y en color azul las ratas viejas con RC). El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía seguido por test de Tukey, o Kruskal-Wallis seguido por test de Dunn, según se cumplieron o no los supuestos de homocedasticidad, con $\#p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ cuando la diferencia entre las medias fue significativa.

5- Habitación en respuesta al entorno

En este caso, evaluamos la habituación en respuesta al entorno a través de los parámetros distancia recorrida, número de micciones, y número de defecaciones. Nosotros no observamos diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros, cuando comparamos los grupos de ratas viejas AL y jóvenes AL. El grupo experimental de ratas viejas sometidas a RC presentó mayores niveles de alerta y curiosidad al ser colocados en un ambiente nuevo, dados por el aumento significativo en la “distancia recorrida” en comparación con los grupos de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum* ($\#p < 0.05$ y $***p < 0.001$, respectivamente; Figura 4.5 A), a pesar de la disminución significativa en la “cantidad de defecaciones” en comparación a las ratas jóvenes ($\#p < 0.05$; Figura 4.5 C). No observamos diferencias significativas en el “número de micciones” entre los tres grupos experimentales (Figura 4.5 B).

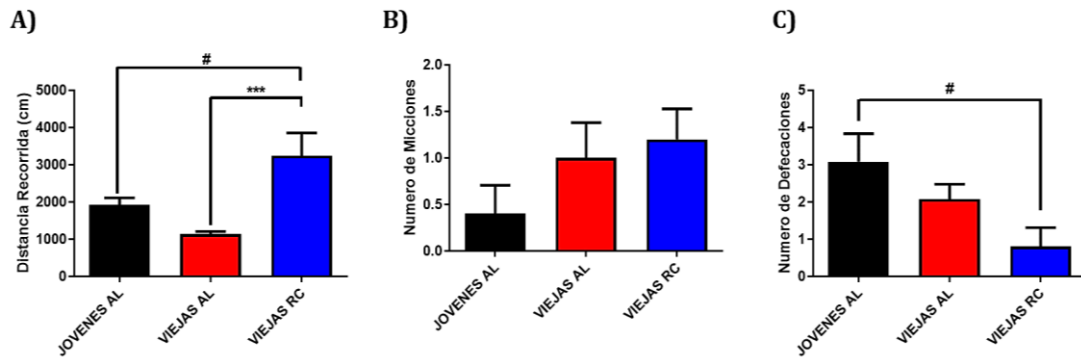


Figura 4.5- Habitación a ambientes novedosos. Las figuras corresponden a (A) Distancia recorrida, (B) Número de micciones, y (C) Número de defecaciones. Las barras representan la media \pm error estándar de los grupos experimentales en estudio (en color negro las ratas jóvenes AL, en color rojo las ratas viejas AL y en color azul las ratas viejas con RC). El análisis estadístico se realizó usando Kruskal-Wallis seguido por test de Dunn, según no se cumplieron los supuestos de homocedasticidad, con # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando la diferencia entre las medias fue significativa.

6- Coordinación motora y Equilibrio

Cuando evaluamos la función de coordinación motora y equilibrio, los parámetros que analizamos fueron: “latencia inicial, latencia total, número total de deslizamientos, número total de caídas, número total de pasos, y *performance* del primer intento”. En este caso, observamos que el envejecimiento incrementa la “latencia inicial, latencia total, número total de deslizamientos y número total de caídas”, en las ratas viejas AL en comparación con las jóvenes AL (** $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$ y # $p < 0.05$, respectivamente; Figura 4.6 A-D); mientras que disminuye significativamente el “número total de pasos y la calidad en la *performance*”, respecto al grupo jóvenes AL (*** $p < 0.001$ en ambos casos; Figura 4.6 E-F). Al analizar el efecto de la RC en los animales de 22 meses, no observamos cambios respecto al grupo viejas AL, en los parámetros estudiados (Figura 4.6 B-F).

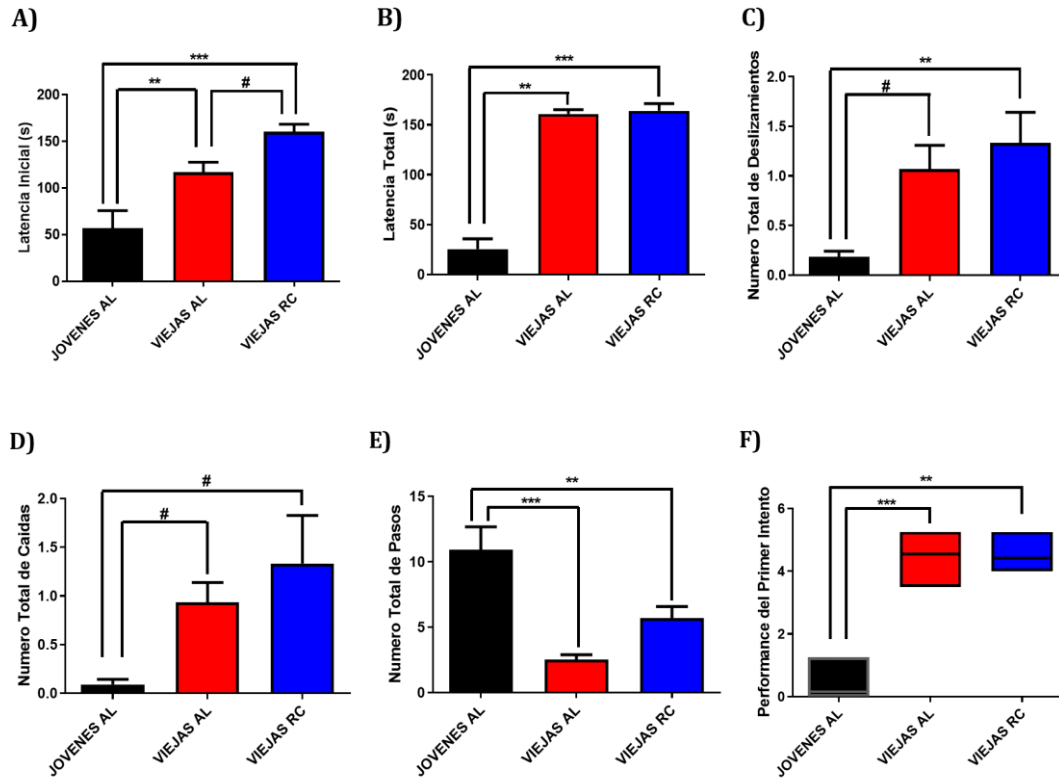


Figura 4.6- Evaluación de la coordinación motora y equilibrio. Las figuras corresponden a (A) Latencia inicial, (B) Latencia total, (C) Número total de deslizamientos, (D) Número total de caídas, (E) Número total de pasos y (F) Performance del primer intento. Las barras y cajas representan la media±error estándar de los grupos experimentales en estudio de todos los grupos experimentales en estudio (en color negro las ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*, en color rojo las ratas viejas alimentadas *ad-libitum* y en color azul las ratas viejas sometidas a RC). El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía seguido por test de Tukey, o Kruskal-Wallis seguido por test de Dunn, según se cumplieron o no los supuestos de homocedasticidad, con # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando la diferencia entre las medias fue significativa.

7- Aprendizaje motor

Desarrollando la prueba de Pellet Único, observamos que la “calidad de la totalidad de intentos, del primer intento y el porcentaje de la tasa de éxito total”, durante el rendimiento de la prueba es significativamente menor en las ratas viejas alimentadas *ad-libitum*, en comparación con las ratas jóvenes AL (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, respectivamente; Figura 4.7 A-C). A pesar de que el grupo de ratas de 22 meses sometidas a RC muestra un aumento significativo de la “tasa de éxito total” en comparación al grupo de ratas viejas AL (** $p < 0.01$; Figura 4.7 C), la

“calidad de la *performance*” de la prueba fue significativamente menor en la totalidad de intentos, como también en el primer intento, en comparación al grupo de ratas jóvenes AL (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, respectivamente; Figura 4.7 A y B).

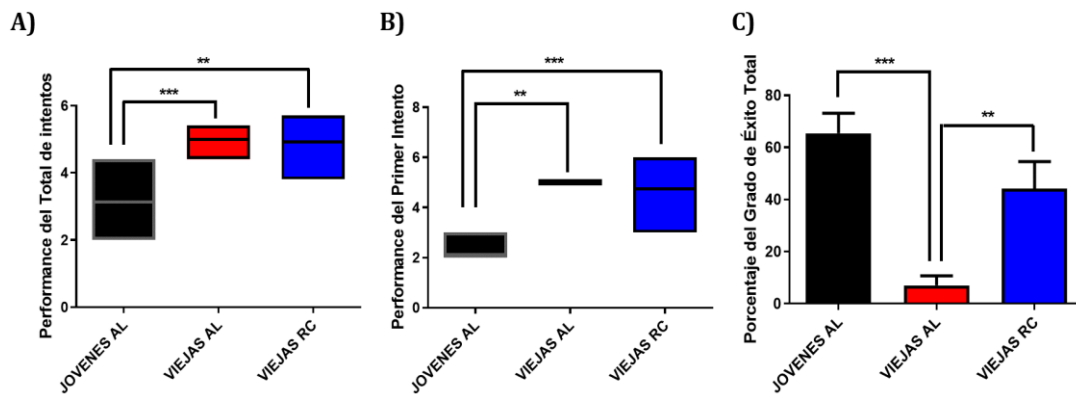


Figura 4.7- Evaluación del Aprendizaje Motor. Las figuras corresponden a (A) Performance del total de intentos, (B) Performance del primer intento y (C) Porcentaje del grado de éxito total de todos los grupos experimentales en estudio. Las barras y cajas representan la media ± error estándar de los grupos experimentales en estudio de todos los grupos experimentales en estudio (en color negro las ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*, en color rojo las ratas viejas alimentadas *ad-libitum* y en color azul las ratas viejas sometidas a RC). El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía seguido por test de Tukey, o Kruskal-Wallis seguido por test de Dunn, según se cumplieron o no los supuestos de homocedasticidad, con ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ cuando la diferencia entre las medias fue significativa.

8- Conclusiones

A partir de los resultados descriptos en este capítulo, podemos concluir:

- Las características de la apariencia y el peso corporal de los animales, afectados por el envejecimiento, se recuperan con la RC a corto plazo (3 meses).
- Si bien el envejecimiento incrementa significativamente la latencia de hallazgo del pellet, tal incremento no llega a ser suficiente para indicar un déficit de la función olfativa de los animales viejos AL. La RC a corto plazo restauró los niveles de latencia de hallazgo al valor observado en el grupo de ratas jóvenes AL.

- El estado ansiogénico y la capacidad de habituación a un ambiente nuevo, no mostraron diferencia significativa entre los grupos de animales jóvenes AL y viejas AL, sin embargo, el grupo de ratas viejas con RC presentó un mayor estado ansiogénico y menor capacidad de habituación, en comparación a los otros dos grupos.

- En general el envejecimiento disminuyó la coordinación motora y el equilibrio. Contrariamente a lo esperado, la RC durante 3 meses, no mejoró la coordinación motora ni el equilibrio, en el grupo de ratas de 22 meses.

- El rendimiento cognitivo motor es significativamente menor en el grupo de ratas viejas AL, en comparación a las ratas jóvenes AL. A pesar de que el grupo de ratas sometidas a RC muestra un aumento significativo de la tasa de éxito total, en comparación al grupo de ratas viejas AL, la calidad de la performance fue significativamente menor, en comparación al grupo de ratas jóvenes AL.

Capítulo 5

Análisis de los patrones temporales de los niveles de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, Bdnf, y de su receptor TrkB, en cerebelo y su posible regulación circadiana y epigenética

Luego de evaluar la función de aprendizaje motor, determinamos los niveles de expresión circadiana de los genes, Bdnf y su receptor TrkB, en el cerebelo de los grupos de ratas jóvenes AL, viejas AL y viejas con RC. La elección de estos factores surge del hecho, ampliamente conocido, de que esta vía interviene en la regulación de funciones cognitivas superiores como el aprendizaje y la memoria.

El sistema circadiano controla la oscilación de procesos fisiológicos y comportamentales en un ciclo de 24 h. Entre las regiones cerebrales que participan en la función circadiana del cerebro, el cerebelo alberga un reloj celular, como lo demuestran las oscilaciones autosostenidas que se observan cuando se aísla *in vitro* [Plumel y col., 2019]. Los patrones diarios de expresión génica del reloj en el cerebelo y otros relojes periféricos, como el hígado, muestran una organización temporal muy cercana a la del reloj supraquiasmático, aunque la

importancia funcional del reloj circadiano en el cerebelo aún no se ha dilucidado completamente [Plumel y col., 2019].

Otros y nosotros hemos demostrado que la expresión de Bdnf y TrkB oscila en forma circadiana en diferentes regiones cerebrales, tales como la corteza prefrontal o el hipocampo de rata [Dolci y col., 2003; Coria-Lucero y col., 2016], sin embargo, hasta el momento, no existen evidencias acerca de la expresión circadiana de dichos genes en cerebelo o de su relación temporal con factores del reloj como, BMAL1. Tampoco se han evaluado las consecuencias de situaciones fisiológicas, como el envejecimiento o el sometimiento a regímenes de restricción calórica.

La expresión de Bdnf y TrkB está regulada también por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN [Gomez-Pinilla y col., 2011; Izquierdo y col 2021]. A la fecha, al menos en nuestro conocimiento, no existen estudios de variación temporal de este tipo de regulación sobre factores involucrados en las funciones cognitivas, ni de la expresión circadiana de la metiltransferasa de mantenimiento, Dnmt1, en cerebelo.

Dados estos antecedentes y los descriptos en la Introducción de la Tesis (Parte I), en este capítulo estudiamos la variación circadiana de la expresión de Bdnf y su receptor de máxima afinidad, TrkB, de los niveles proteicos del factor de transcripción del reloj, BMAL1, de la expresión de Dnmt1 y la variación día/noche de los niveles de metilación relativa de sitios CpG en regiones regulatorias y exones de Bdnf y TrkB, en cerebelo de ratas jóvenes AL, viejas AL y viejas con RC.

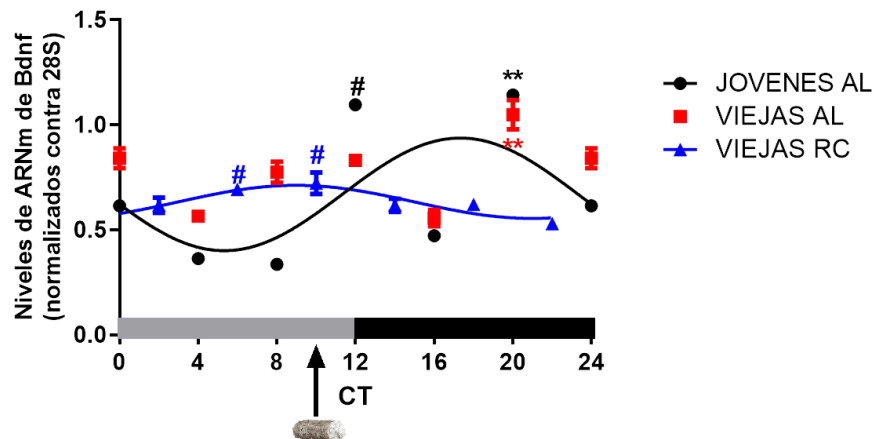
1- Ritmo circadiano de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (Bdnf), en cerebelo.

Los niveles de ARNm de Bdnf presentan un ritmo circadiano, en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum* (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo=32.89), con su acrofase a CT $17:20 \pm 00:01$; Fig. 5.1 A-B y Tabla 5.1). El envejecimiento ejerce un efecto supresor sobre la expresión circadiana de Bdnf en el cerebelo, sin embargo, encontramos un incremento de expresión significativo a CT20 (Kruskal-Wallis $**p < 0.01$; Figura 5.1, A-B). La RC restaura la ritmicidad circadiana de Bdnf (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo = 45,66). Sin embargo, no recupera la acrofase, ni el mesor, ni la amplitud del ritmo de expresión de Bdnf presente en cerebelo de los animales jóvenes AL (Fig. 5.1, A-B y Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Bdnf en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC.

Parámetros del Ritmo	Jóvenes <i>Ad-Libitum</i>	Viejas <i>Ad-Libitum</i>	Viejas con RC	p
Mesor (media \pm ES)	0.67 \pm 0.004	-	0.63 \pm 0.01	<0.01
Amplitud (media \pm ES)	0.27 \pm 0.003	-	0.09 \pm 0.01	<0.01
Acrofase (media \pm ES)	17:20 \pm 00:01	-	08:45 \pm 01:10	<0.01
% Ritmo	32.89	-	45.66	

A)



B)

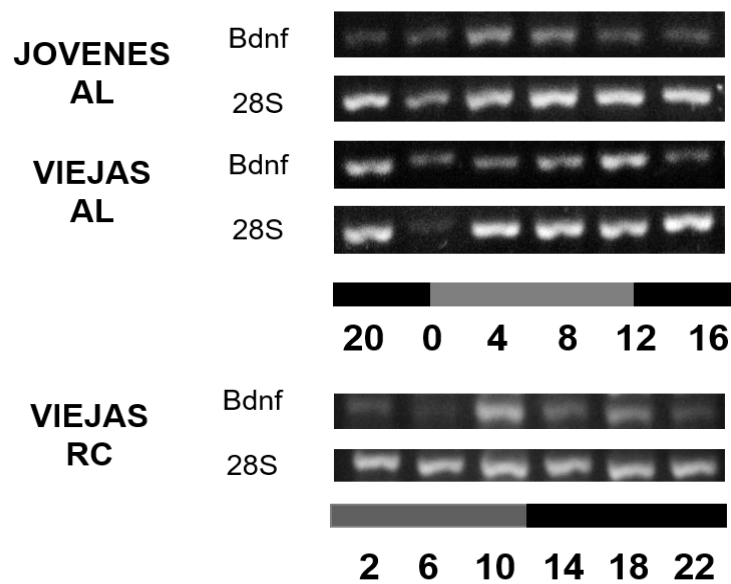


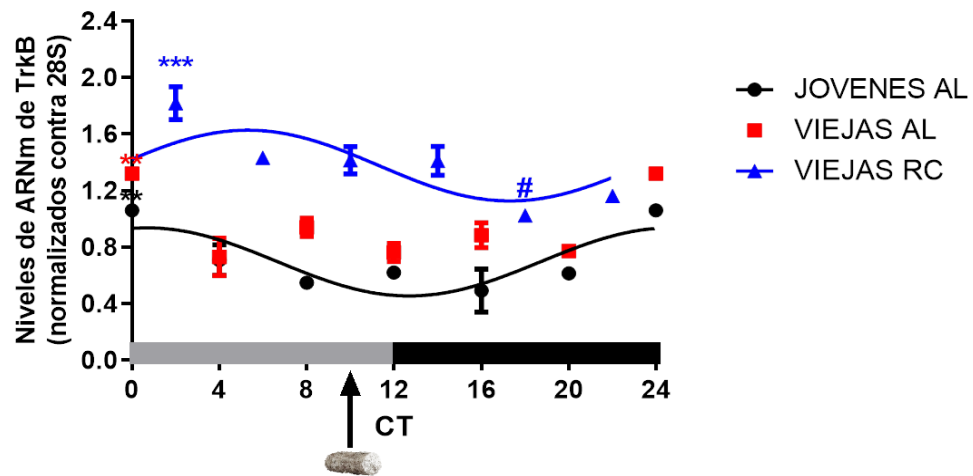
Figura 5.1- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Bdnf en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. (A) Las curvas de ajuste a la función coseno representan la expresión relativa de Bdnf normalizada contra la expresión de 28S a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Cada punto en la curva representa la media \pm SEM de cuatro muestras de cerebelo para cada CT. El análisis estadístico se realizó usando Kruskal-Wallis seguido por test de Dunn, con # $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, cuando las medias indicadas se compararon con el valor máximo correspondiente en cada grupo. (B) Patrones representativos de productos de PCR a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Las barras horizontales representan la distribución de las fases de 12h-oscuridad:12h-oscuridad (OO) en un período de 24 h (CT0-CT24), con barras grises que representan el día subjetivo y barras negras que simbolizan la noche subjetiva.

2- Ritmo circadiano de expresión del receptor de tropomiosina quinasa B (TrkB), en cerebelo.

Los niveles de expresión de TrkB también mostraron una variación circadiana en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum* (Chronos-FIT, $p < 0.05$; %ritmo = 42.51), con su acrofase a comienzos del día subjetivo (CT 01:26 \pm 00:38; Fig. 5.2 A-B y Tabla 5.2). Al igual que en la expresión de su ligando, el envejecimiento suprime la expresión circadiana de TrkB en el cerebelo, no obstante, presenta un incremento significativo a CT0 (ANOVA, $**p < 0.01$; Figura 5.2 A-B).

El ritmo de expresión circadiana de TrkB también se restablece en el grupo de animales viejos sometidos a RC (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo = 43.36). Si bien su acrofase ocurre durante el día subjetivo, está desfasada respecto a la acrofase del ritmo de expresión observada en los animales jóvenes AL. Además, presenta un aumento significativo en el mesor, comparado con el grupo de ratas de jóvenes AL (1.37 ± 0.02 vs 0.67 ± 0.01 ; $p < 0.01$; Tabla 5.2).

A)



B)

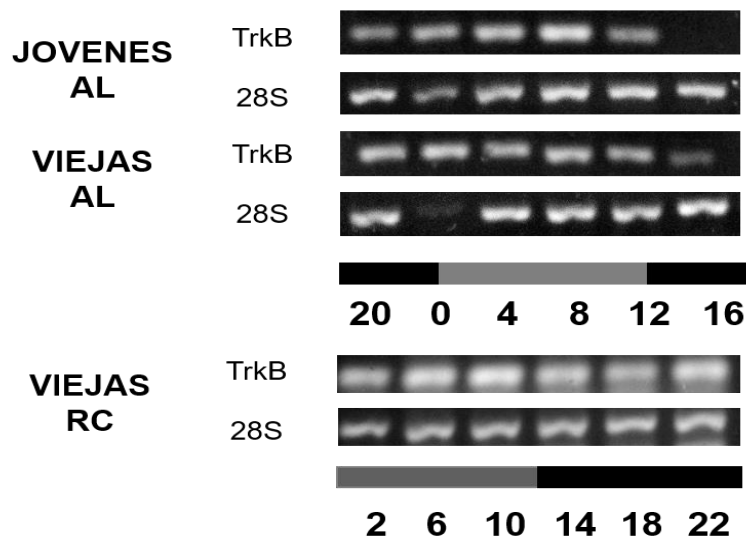


Figura 5.2- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de TrkB en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. (A) Las curvas de ajuste a la función coseno representan la expresión relativa de TrkB normalizada contra la expresión de 28S a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Cada punto en la curva representa la media \pm SEM de cuatro muestras de cerebelo para cada CT. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA seguido de Tukey test, con $^{\#}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ cuando las medias indicadas se compararon con el valor máximo correspondiente en cada grupo. (B) Patrones representativos de productos de PCR a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Las barras horizontales representan la distribución de las fases de 12h-oscuridad:12h-oscuridad (00) en un período de 24 h (CT0-CT24), con barras grises que representan el día subjetivo y barras negras que simbolizan la noche subjetiva.

Tabla 5.2: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de TrkB en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC.

Parámetros del Ritmo	Jóvenes <i>Ad-Libitum</i>	Viejas <i>Ad-Libitum</i>	Viejas con RC	p
Mesor (media ± ES)	0.67±0.01	-	1.38±0.02	<0.01
Amplitud (media ± ES)	0.22±0.04	-	0.25±0.05	NS
Acrofase (media ± ES)	01:26±00:38	-	05:24±00:25	<0.01
% Ritmo	42.51	-	43.36	

3- Ritmo circadiano de los niveles proteicos de BMAL1, en cerebelo.

En este estudio observamos que los niveles de la proteína BMAL1 muestran un ritmo circadiano en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum* (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo=54.37), con niveles máximos que ocurren en la transición entre el día subjetivo y la noche subjetiva (acrofase del ritmo a CT 12:41 ± 00:25; Fig. 5.3 A-B y Tabla 5.3). Los niveles de proteína en el cerebelo se vieron afectados por la edad. El envejecimiento produce un adelanto de fase en la oscilación circadiana de BMAL1 (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo=45.79; acrofase del ritmo a CT 01:33 ± 00:31; Fig. 5.3 A-B y Tabla 5.3), en el cerebelo. Además, las ratas viejas AL muestran una disminución del mesor del ritmo de los niveles de proteína BMAL1, en comparación con los animales de tres meses (0.96 ± 0.01 vs 1.08 ± 0.01 , respectivamente; $p < 0.01$; Fig. 5.3 A-B y Tabla 5.3).

Finalmente, cuando analizamos el efecto de la RC, observamos un retraso de fase en comparación a las ratas viejas alimentadas *ad-libitum* (07:27 ± 01:03 vs 01:33 ± 00:31, respectivamente; $p < 0.01$; Fig. 5.3 A-B y Tabla 5.3). Al mismo tiempo, las ratas viejas sometidas a RC muestran un aumento en el mesor del ritmo de los

niveles proteicos de BMAL1, en comparación con los animales de 22 meses (1.19 ± 0.04 vs 0.96 ± 0.01 , respectivamente; $p < 0.01$; Fig. 5.3 A-B y Tabla 5.3).

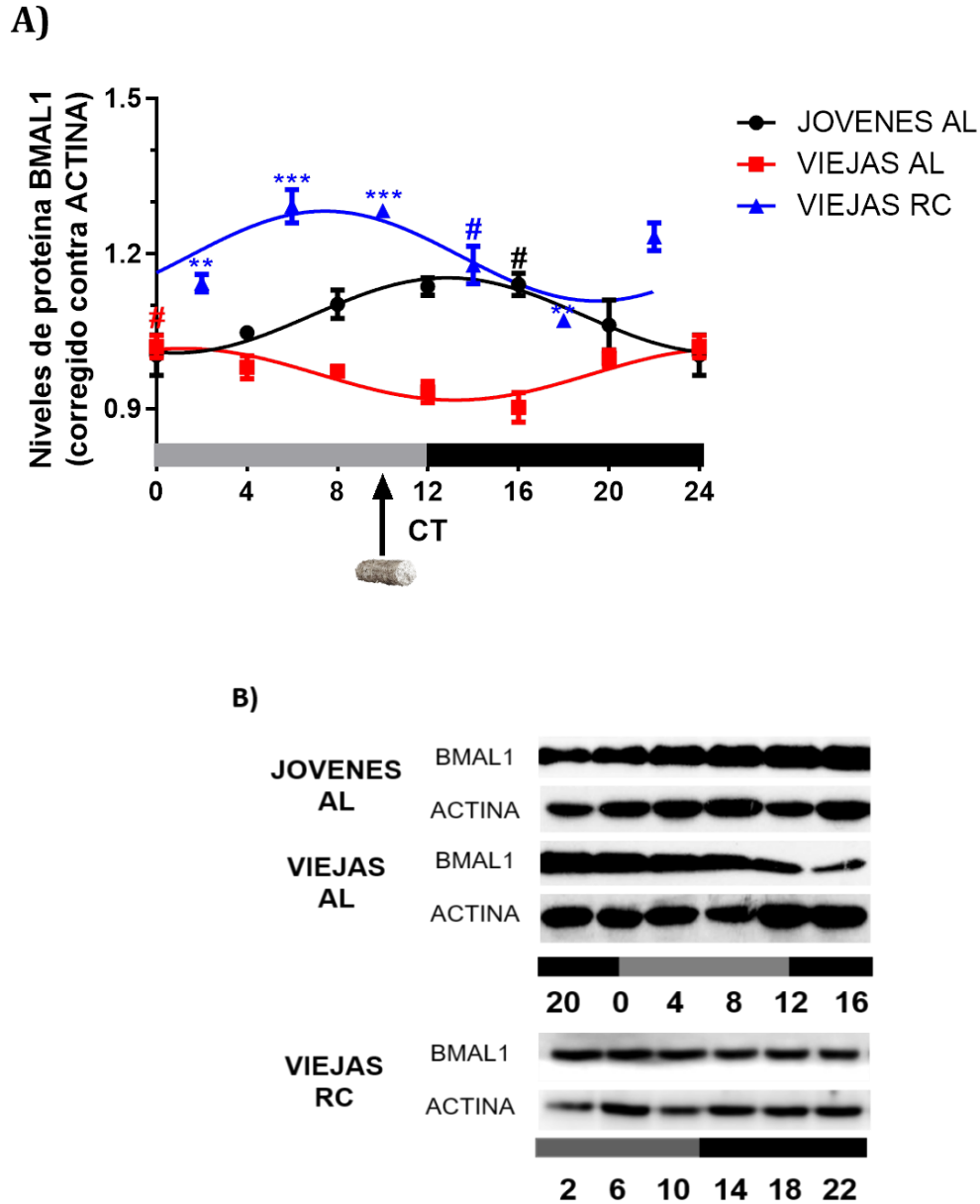


Figura 5.3- Ritmo circadiano de la proteína BMAL1 en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. (A) Las curvas de ajuste a la función coseno representan niveles de proteína BMAL1 normalizada contra niveles de proteína ACTINA a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Cada punto en la curva representa la media \pm SEM de cuatro muestras de cerebelo para cada CT. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía seguido por test de Tukey, con # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando las medias indicadas se compararon con el valor máximo correspondiente en cada grupo. (B) Análisis de transferencia Western representativo de la proteína extraída del cerebelo de ratas de todos los grupos experimentales aisladas a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Las barras horizontales representan la distribución de las fases de 12h-oscuridad:12h-oscuridad (OO) en un período de 24 h (CT0-CT24), con barras grises que representan el día subjetivo y barras negras que simbolizan la noche subjetiva.

Tabla 5.3: Parámetros característicos del ritmo circadiano de proteína de BMAL1 en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC.

Parámetros del Ritmo	Jóvenes <i>Ad-Libitum</i>	Viejas <i>Ad-Libitum</i>	Viejas con RC	p
Mesor (media ± ES)	1.08±0.01 ^{a,b}	0.97±0.01 ^{a,c}	1.20±0.04 ^{b,c}	a,b,c,p<0.01
Amplitud (media ± ES)	0.07±0.01	0.05±0.01	0.09±0.01	NS
Acrofase (media ± ES)	12:41±00:25 ^a ,b	01:33±00:31 ^a c	07:27±01:03 ^b c	a,b,c,p<0.01
% Ritmo	54.37	45.79	42.00	

4- Ritmo circadiano de expresión de la enzima ADN metiltransferasa 1 (Dnmt1), en cerebelo.

Los niveles de expresión de Dnmt1 muestran un ritmo circadiano en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum* (Chronos-FIT, $p<0.01$; %ritmo=38.48), con niveles máximos al final de la noche subjetiva (acrofase del ritmo a CT 22:19 ± 00:33; Fig. 5.4 A-B y Tabla 5.4). Durante el envejecimiento se produce un aumento en el porcentaje de ritmo (Chronos-FIT, $p<0.01$; %ritmo=57.59) y un adelanto de fase en la variación circadiana de la expresión de Dnmt1, en comparación con el grupo de ratas jóvenes AL (CT 01:28 ± 00:32 vs CT 22:19 ± 00:33, respectivamente; Fig. 5.4 A-B y Tabla 5.4). En el caso del grupo de ratas sometidas a RC, mantiene una variación circadiana en los niveles de expresión de la metiltransferasa en cerebelo (Chronos-FIT, $p<0.01$; %ritmo=56.5), acompañada de un retraso de fase en comparación a las ratas viejas AL (09:16 ± 01:21 vs 01:28 ± 00:32, respectivamente; $p<0.01$; Fig. 5.4 A-B y Tabla 5.4). No observamos diferencias significativas en parámetros como el mesor o amplitud entre los diferentes grupos experimentales (Tabla 5.4).

Dado que no encontramos hasta la fecha antecedentes de ritmos circadianos de *Dnmt1* y una vez que observamos que sus niveles de expresión exhibían ritmo circadiano en cerebelo, usando una herramienta bioinformática exploramos la región regulatoria del gen de la metiltransferasa para buscar potenciales sitios de respuesta al reloj. La exploración de 2000 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción del gen *Dnmt1*, usando el software TFBIND (Tsunoda y Takagi, 1999), reveló once sitios *E-box-like* (CANNTG) en la región regulatoria del gen (Figura 5.4 C).

Tabla 5.4: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de *Dnmt1* en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC.

Parámetros del Ritmo	Jóvenes <i>Ad-Libitum</i>	Viejas <i>Ad-Libitum</i>	Viejas con RC	p
Mesor (media ± ES)	0.37±0.01	0.41±0.01	0.37±0.02	NS
Amplitud (media ± ES)	0.11±0.01	0.15±0.01	0.16±0.02	NS
Acrofase (media ± ES)	22:19±00:33 ^{a,b}	01:28±00:32 ^{a,c}	09:16±01:2 ^{b,c}	^{a,b,c} p<0.01
% Ritmo	38.48	57.59	56.25	

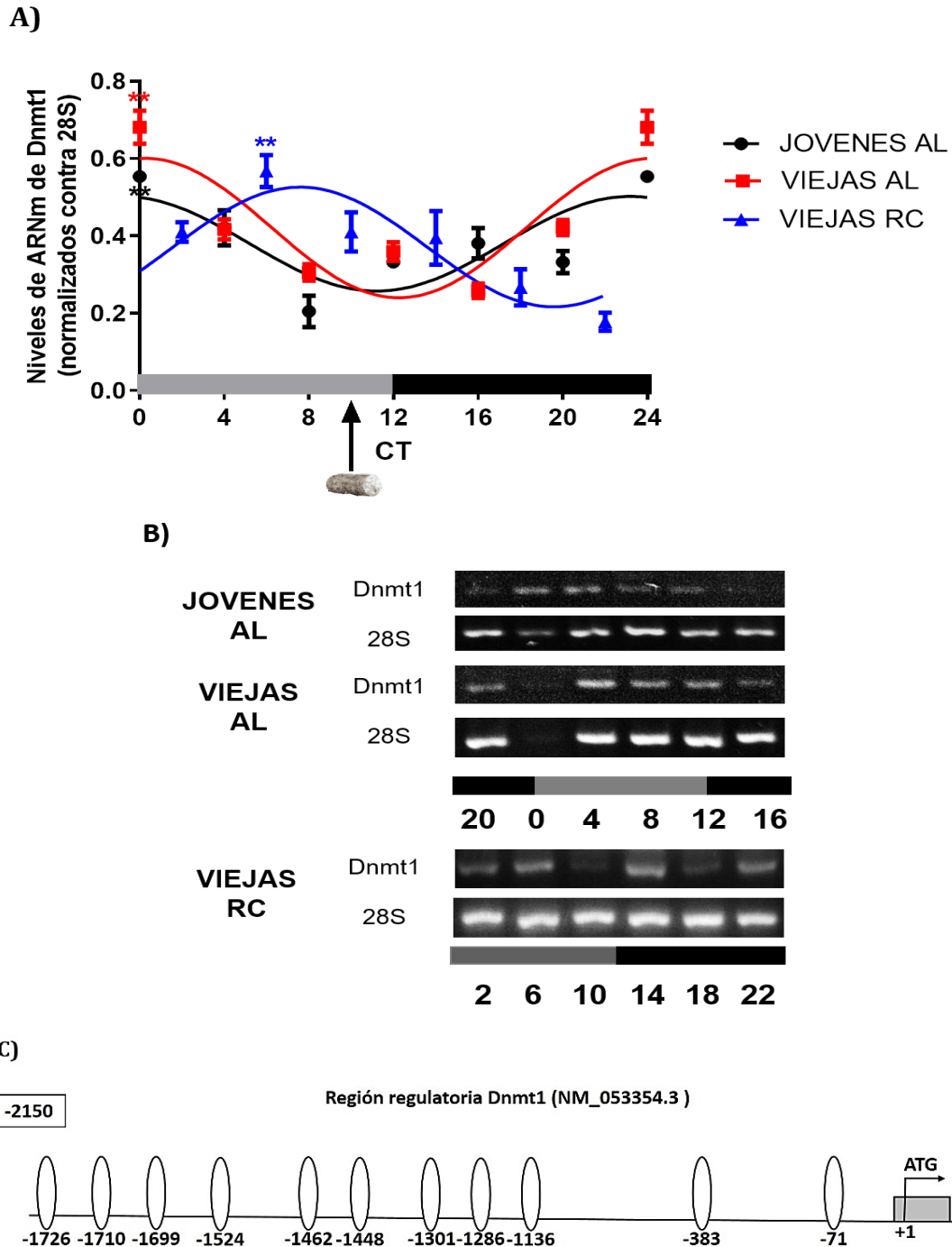


Figura 5.4- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Dnmt1 en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. (A) Las curvas de ajuste a la función coseno representan la expresión relativa de Dnmt1 normalizada contra la expresión de 28S a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Cada punto en la curva representa la media \pm SEM de cuatro muestras de cerebelo para cada CT. El análisis estadístico se realizó usando Kruskal-Wallis seguido por test de Dunn, con # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando las medias indicadas se compararon con el valor máximo correspondiente en cada grupo. (B) Patrones representativos de productos de PCR a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Las barras horizontales representan la distribución de las fases de 12h-oscuridad:12h-oscuridad (OO) en un período de 24 h (CT0-CT24), con barras grises que representan el día subjetivo y barras negras que simbolizan la noche subjetiva. (C) Mapa de sitios *E-box-like* (representados como óvalos blancos) en la región regulatoria del gen Dnmt1, sus posiciones son relativas al punto de inicio de la transcripción (representada como rectángulo gris).

5- Niveles de metilación en región regulatoria y exónica de los genes cognitivos, Bdnf y TrkB, en cerebelo.

Posterior a la evaluación de la expresión de la metiltransferasa, analizamos la variación día/noche del porcentaje de metilación de sitios CpG, localizados en, o próximos a sitios *E-box*, en la región regulatoria del exón III de Bdnf, en el cuerpo génico del exón IX de Bdnf y en la región regulatoria del exón I de TrkB, en el cerebelo de los grupos experimentales. Observamos niveles de metilación relativa, de 89 al 100%, en los sitios CpG del cuerpo génico del exón IX del gen Bdnf en cerebelo de ratas (Figura 5.5 A); no encontramos diferencias significativas entre el día y la noche en los niveles de metilación de dicho exón, así como tampoco observamos diferencias en la metilación relativa entre los tres grupos experimentales. Por otro lado, no detectamos metilaciones relativas relevantes en los sitios CpG de la región regulatoria del exón III de Bdnf, ni en la región regulatoria del exón I del gen TrkB en cerebelo de rata, en ninguno de los grupos estudiados, así como tampoco observamos diferencias en los niveles de metilación entre el día y la noche (Figura 5.5 B y C).

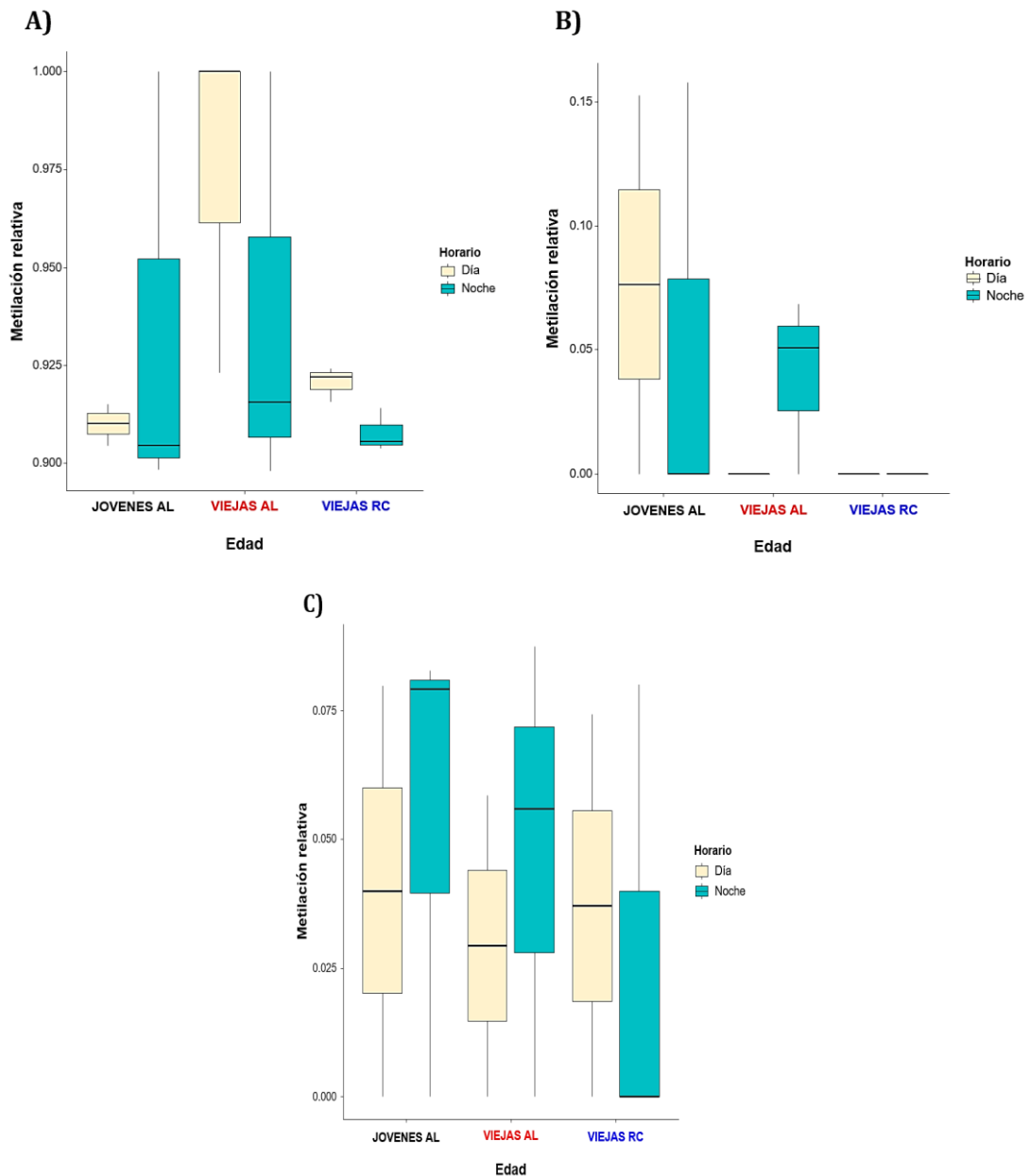


Figura 5.5- Niveles de metilación en región regulatoria y exónica de Bdnf y su receptor TrkB en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. Las figuras corresponden a (A) Metilación relativa de la región regulatoria del exón IX de Bdnf, (B) Metilación relativa del cuerpo génico del exón III de Bdnf y, (C) Metilación relativa de la región regulatoria del exón I de TrkB, de los tres grupos experimentales en estudio. El análisis estadístico se realizó usando Kruskal-Wallis seguido por test de Dunn.

6- Conclusiones

Los resultados mostrados en este capítulo revelan:

- Los niveles de expresión de factores que participan en la plasticidad sináptica, Bdnf y su receptor de alta afinidad TrkB, oscilan en forma

circadiana, con sus acrofases a la mitad de la noche y principio del día subjetivo, respectivamente, en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*. El envejecimiento ejerce un efecto supresor sobre la expresión circadiana de estos genes. Si bien la RC a corto plazo restaura la ritmicidad circadiana en las ratas viejas, no alcanza a restituir la fase de los ritmos.

- Los niveles proteicos de uno de los componentes principales del reloj celular, BMAL1, muestran un ritmo circadiano con su acrofase en la transición día subjetivo-noche subjetiva, en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*. El envejecimiento adelanta la fase y reduce el mesor del ritmo de este factor del reloj. Cuando durante la vejez aplicamos el protocolo de RC a corto plazo, se restauran los parámetros cronobiológicos.

- Los niveles del transcrito de la ADN metiltransferasa, Dnmt1, muestran un ritmo circadiano con su máximo al final de la noche, en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*. Durante el envejecimiento se produce un aumento en el porcentaje de ritmo y adelanto de la acrofase del mismo. En el caso del grupo de ratas sometidas a RC, se mantiene la variación circadiana en los niveles de expresión de Dnmt1, con retraso de su acrofase en comparación a las ratas viejas alimentadas *ad-libitum*.

- De alguna manera, contrariamente a lo esperado, no encontramos diferencias día/noche significativas en la metilación de los exones estudiados de Bdnf y TrkB. Sin embargo, tal como esperábamos, detectamos un elevado porcentaje de metilación activadora en el exón IX de Bdnf, y ausencia de metilación inhibitoria en la región regulatoria del exón III de Bdnf y exón I de TrkB, dado que ambos genes se expresan, ya sea rítmica o arrítmicamente, en el cerebelo de los tres grupos de animales.

Capítulo 6

Análisis de la expresión circadiana de enzimas que participan en la reparación del ADN por escisión de base y estudio de su regulación temporal, en cerebelo de rata

Estudios recientes han demostrado que el sistema *BER* es necesario para la reparación de intermediarios mutagénicos formados durante la desmetilación activa de la citosina del ADN. Recientemente, los investigadores Oh y col. [2019], propusieron que oscilaciones circadianas de la modificación de citosina en humanos, contribuyen a la variabilidad epigenética, el envejecimiento y enfermedades complejas. Así, en este trabajo, nos dispusimos a analizar si existe una variación circadiana en la expresión de las principales enzimas que conforman a esta vía, Ogg1 y Ape1. Es importante recordar que, como se mencionó en la Introducción (Parte I), además de funciones de reparación, la glicosilasa OGG1 podría modular la expresión génica por reclutamiento de remodeladores y modificadores de cromatina, así como también de factores de transcripción, de allí también la importancia de estudiar su variación temporal. Posterior a las reparaciones catalizadas por Ogg1, se obtiene como resultado un sitio AP, que ejercería efectos citotóxicos si no es reparado por la endonucleasa Ape1, por lo que también estudiamos la expresión temporal de esta enzima. La reparación eficiente

del ADN ha mostrado ser protectora contra la neurodegeneración asociada con la edad, de allí que evaluamos las consecuencias del envejecimiento sobre la expresión de estas enzimas, y los efectos de un protocolo de RC a corto plazo.

La sirtuina SIRT1, es una histona desacetilasa que se activa durante períodos de ayuno prolongado, situación fisiológica que ocurre durante la RC. Es conocido que SIRT1 tiene como objetivo la desacetilación de APE1, promoviendo la actividad endonucleasa de esta enzima, esta interacción física y funcional aumenta cuando la demanda de *BER* aumenta, como ocurre con los insultos genotóxicos [Yamamori y col., 2010]. Sin embargo, Sarga y col. [2013] proponen que dicha sirtuina también modula los niveles de Ogg1 acetilado, en células neurales. Por estos motivos, analizamos la expresión temporal de Sirt1 en cerebelo de rata, y las consecuencias del envejecimiento, tanto con régimen alimenticio *ad-libitum* como con RC.

Finalmente, para confirmar la posible regulación por parte del heterodímero BMAL1:CLOCK del reloj celular sobre la expresión de Ogg1 y Ape1, realizamos ensayos de cotransfección *in vitro*.

1- Variación temporal de la expresión de la enzima de reparación del ADN, 8-Oxoguanina ADN glicosilasa 1 (Ogg1).

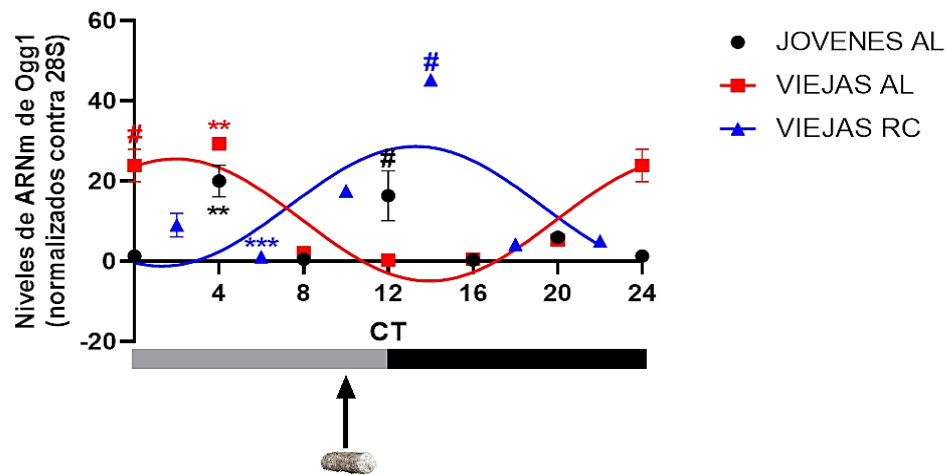
Cuando estudiamos la variación de los niveles de ARNm de Ogg1 a lo largo de un ciclo de 24 hs en condiciones de OO, observamos que dicha expresión presenta un patrón arrítmico, en el cerebelo de rata joven. Sin embargo, detectamos un incremento significativo de la expresión a CT4, correspondiente al día subjetivo (Kruskal-Wallis, ** $p < 0.01$). Llamativamente, los niveles de expresión de Ogg1 muestran un ritmo circadiano en el cerebelo de ratas de 22 meses alimentadas *ad-*

libitum (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo=77.62), con niveles máximos ocurriendo al comienzo del día subjetivo (acrofase del ritmo a CT 01:57 ± 00:11; Fig. 6.1 A-B y Tabla 6.1). Cuando las ratas viejas fueron sometidas a RC se mantuvo la ritmicidad circadiana de los niveles de ARNm de Ogg1 (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo=48.20), pero con un retraso de fase, en comparación con las ratas viejas *ad-libitum* (CT 13:17 ± 00:03 vs CT 01:57 ± 00:11; Fig. 6.1, A-B y Tabla 6.1). Cuando analizamos el valor del nivel medio de expresión relativa de Ogg1, entre los tres grupos experimentales, observamos un incremento significativo en el cerebelo del grupo de ratas viejas con RC en comparación con las ratas jóvenes y viejas AL (ANOVA, ** $p < 0.01$; Figura 6.1 B).

Tabla 6.1: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Ogg1 en cerebelo de ratas viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC.

Parámetros del Ritmo	Jóvenes <i>Ad-Libitum</i>	Viejas <i>Ad-Libitum</i>	Viejas con RC	P
Mesor (media ± ES)	-	10.25±0.69	13.75±0.49	<0.01
Amplitud (media ± ES)	-	15.17±1.16	14.87±0.96	NS
Acrofase (media ± ES)	-	01:57±00:11	13:17±00:03	<0.01
% Ritmo	-	77.62	48.20	

A)



B)

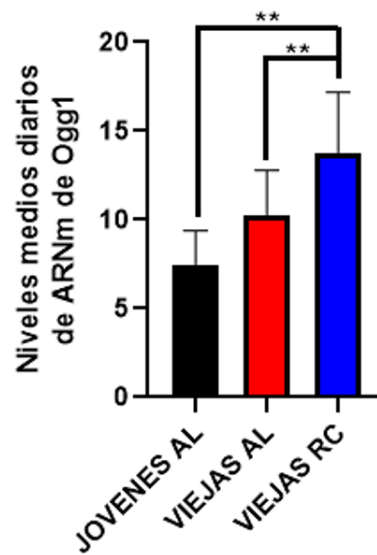


Figura 6.1- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Ogg1 en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. (A) Las curvas de ajuste a la función coseno representan la expresión relativa de Ogg1 normalizada contra la expresión de 28S, a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Cada punto en la curva representa la media \pm SEM de cuatro muestras de cerebelo para cada CT. Las barras horizontales representan la distribución de las fases de 12h-oscuridad:12h-oscuridad (OO) en un período de 24 h (CT0-CT24), con barras grises que representan el día subjetivo y barras negras que simbolizan la noche subjetiva. El análisis estadístico se realizó usando Kruskal-Wallis seguido por test de Dunn, con # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando las medias indicadas se compararon con el valor máximo correspondiente en cada grupo. (B) Niveles medios diarios de ARNm de Ogg1 en cerebelo de todos los grupos experimentales. Los valores promedio de cada grupo fueron obtenidos promediando los valores individuales de los CT. La comparación entre los grupos se realizó por ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, con ** $p < 0.01$.

2- Variación temporal de la expresión de la enzima de reparación del ADN, endonucleasaapurínica/apirimidínica 1 (Ape1).

Al igual que la expresión de la glicosilasa Ogg1, el análisis de la variación temporal del transcripto de Ape1, reveló que su expresión es arrítmica a lo largo de un período de 24 hs, en el cerebelo de ratas jóvenes, alimentadas AL y mantenidas en condiciones de OO. En este caso, observamos un incremento significativo de su expresión a CT20, correspondiente a la segunda mitad de la noche subjetiva (Kruskal-Wallis, # $p < 0.05$). Similar a lo observado con Ogg1, los niveles de ARNm de Ape1 muestran un marcado ritmo circadiano en el cerebelo de ratas viejas alimentadas *ad-libitum* (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo=70.06), con una acrofase al comienzo del día subjetivo (CT 01:09 \pm 00:10; Fig. 6.2 A-B y Tabla 6.2). En tanto, las ratas de 22 meses sometidas a RC, si bien mantienen la ritmicidad circadiana (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo=30.49), presentan un retraso de fase de los niveles de expresión de Ape1 en el cerebelo, en comparación con el grupo de ratas viejas AL (CT 07:41 \pm 00:35 vs CT 01:09 \pm 00:10; Fig. 6.2 A-B y Tabla 6.2). En este caso, también detectamos una disminución significativa del mesor y la amplitud del ritmo de expresión de Ape1, en las ratas viejas con RC, en comparación con las ratas viejas AL (13.29 \pm 0.94 vs 92.73 \pm 10.71 y 12.31 \pm 1.80 vs 141.95 \pm 19.92, respectivamente, con ** $p < 0.01$ en ambos casos; Tabla 6.2).

Finalmente, cuando analizamos los niveles medios de expresión relativa de Ape1 en cerebelo de los grupos experimentales, observamos un aumento significativo en las ratas viejas AL, en comparación con las ratas jóvenes AL y las ratas viejas sometidas a RC (ANOVA, ** $p < 0.01$ en ambos casos; Figura 6.2 B).

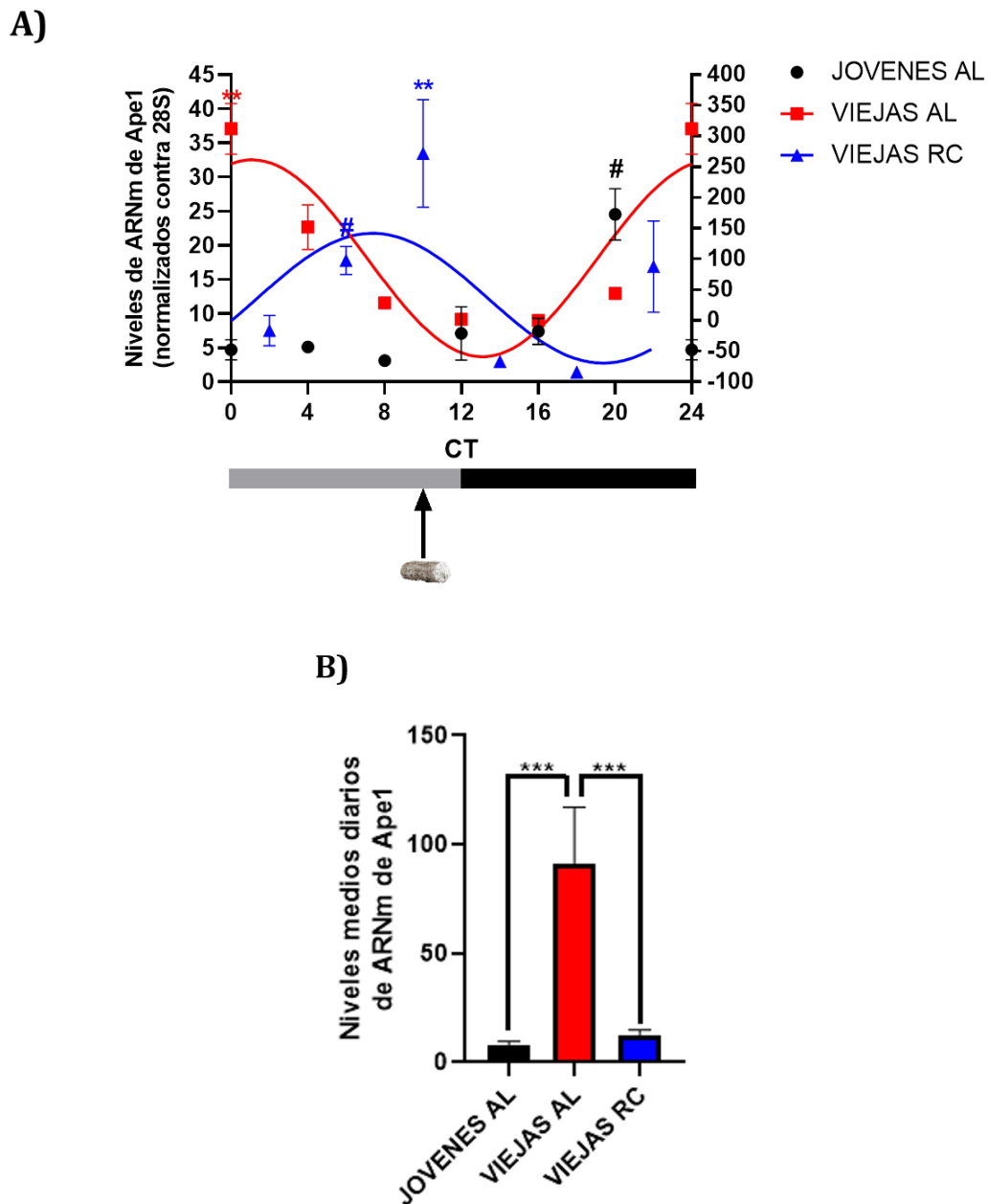


Figura 6.2- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Ape1 en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. (A) Las curvas de ajuste a la función coseno representan la expresión relativa de Ape1 normalizada contra la expresión de 28S, a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Cada punto en la curva representa la media \pm SEM de cuatro muestras de cerebelo para cada CT. El eje y de la derecha, corresponde a la ordenada para la curva del grupo de viejas AL. Las barras horizontales representan la distribución de las fases de 12h-oscuridad:12h-oscuridad (OO) en un período de 24 h (CT0-CT24), con barras grises que representan el día subjetivo y barras negras que simbolizan la noche subjetiva. El análisis estadístico se realizó usando Kruskal-Wallis con $\#p<0.05$ y $**p<0.01$ cuando las medias indicadas se compararon con el valor máximo correspondiente en cada grupo. (B) Niveles medios diarios de ARNm de Ape1 en cerebelo de todos los grupos experimentales. Los valores promedio de cada grupo fueron obtenidos promediando los valores individuales de los CT. La comparación entre los grupos se realizó por ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, con $***p<0.001$.

Tabla 6.2: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Ape1 en cerebelo de ratas viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC.

Parámetros del Ritmo	Jóvenes <i>Ad-Libitum</i>	Viejas <i>Ad-Libitum</i>	Viejas con RC	p
Mesor (media ± ES)	-	92.73±10.71	13.29±0.94	<0.01
Amplitud (media ± ES)	-	141.95±19.92	12.31±1.80	<0.01
Acrofase (media ± ES)	-	01:09±00:10	07:41±00:35	<0.01
% Ritmo	-	70.06	30.49	

4- Control de la expresión circadiana de la enzima glicosilasa del sistema de reparación por escisión de bases, Ogg1, por parte del reloj celular

Para este estudio, en primer lugar, aislamos la región regulatoria del gen de Ogg1 de rata, entre las posiciones -432 a -1385 respecto al inicio de la traducción. Previamente, a fin de identificar los potenciales sitios reguladores blancos del factor de transcripción del reloj, escaneamos el fragmento de 1.8 kb de la región de Ogg1 corriente arriba del sitio de inicio de la traducción (Figura 6.3 A-B) en busca de coincidencias significativas, usando el software *TFBIND* [Tsunoda y Takagi, 1999]. Este procedimiento reveló la presencia de trece (13) sitios *E-box-like*, dos (2) elementos de unión a PPAR α (PPRE) y siete (7) sitios de reconocimiento en respuesta a esteroides (SRE), en la región regulatoria de Ogg1.

Para determinar si los vínculos entre el reloj y la expresión del gen Ogg1 operan directa o indirectamente, y siguiendo la sugerencia del Dr. Matías Meléndez (Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Barretos, Brasil, comunicación personal) en colaboración con su grupo de investigación, evaluamos la capacidad de una región de 955pb, entre las posiciones -432 a -1385, corriente arriba de dicho gen, para responder a la acción del heterodímero circadiano BMAL1:CLOCK. Para

ello, clonamos dicha región en el vector psi.CHECK2 Ogg1/LUC y cotransfectamos transitoriamente con vectores de expresión de BMAL1 y/o CLOCK, en una línea celular de fibroblastos murinos (NIH-3T3). Así, observamos que esta región participa en la activación transcripcional *in vitro* de Ogg1 en respuesta a la sobreexpresión de BMAL1, de CLOCK y del heterodímero BMAL1:CLOCK (ANOVA, *** $p < 0.001$; Figura 6.3 C).

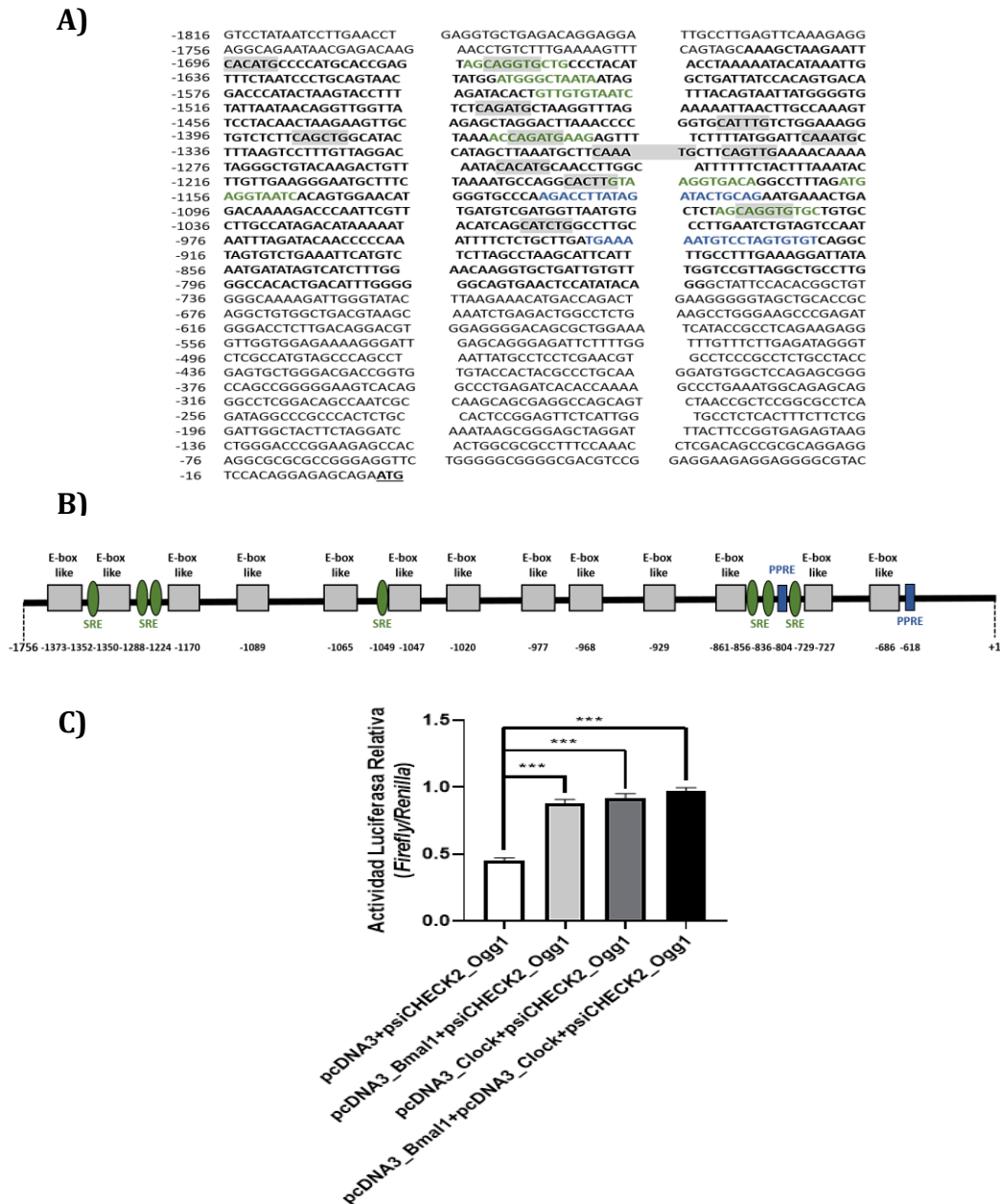


Figura 6.3- Arquitectura propuesta y análisis funcional de la región reguladora proximal de Ogg1 de rata. Se aisló una región genómica de rata 955pb mediante PCR de alta fidelidad. La secuencia se corroboró y se escaneó en busca de sitios de unión putativos para factores de transcripción relevantes. El punto de inicio de la traducción se representa en negrita como +1. A) y B) Los posibles elementos de respuesta al reloj (*E-box-like*) están representados por rectángulos grises claros, los de respuesta a esteroides (SRE) por texto y óvalos verdes y los de respuesta a PPARs (PPRE) por texto y rectángulos azules. (B) También se representan esquemáticamente a lo largo de la región regulatoria sus posiciones, relativas al inicio de la traducción. C) La respuesta del constructo Ogg1/LUC se cuantificó luego de su cotransfección en células NIH-3T3 junto con los vectores diseñados para sobreexpresar BMAL1, CLOCK y BMAL1:CLOCK. Las barras representan la media de la actividad relativa de luciferasa \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La actividad de luciferasa de luciérnaga impulsada por la región reguladora de Ogg1 se normalizó a la actividad generada por un indicador de control de luciferasa de Renilla impulsado por el promotor de citomegalovirus. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía, seguido de test de Tukey, con *** $p < 0.001$.

5- Control de la expresión temporal de la enzima endonucleasa del sistema de reparación por escisión de bases, Ape1, por parte del reloj celular.

A continuación, aislamos la región regulatoria del gen de Ape1 de rata, entre las posiciones -288 y -1216 respecto al inicio de la traducción. Previamente, a fin de identificar los potenciales sitios reguladores blancos del factor de transcripción del reloj, escaneamos un fragmento de 1.2 kb de la región de Ape1 corriente arriba del sitio de inicio de la traducción (Figura 6.4 A-B) en busca de coincidencias significativas, usando el software *TFBIND* [Tsunoda y Takagi, 1999]. Este procedimiento reveló la presencia de cinco (5) sitios *E-box* perfectos (CACGTG), dos (2) elementos de unión a PPAR α (PPRE) y nueve (9) sitios de reconocimiento en respuesta a esteroides (SRE), en la región regulatoria de Ape1.

Para determinar si los vínculos entre el reloj y la expresión del gen Ape1 operan directa o indirectamente, y siguiendo la sugerencia del Dr. Matías Meléndez (Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Barretos, Brasil, comunicación personal) en colaboración con su grupo de investigación, evaluamos la capacidad del fragmento de 929pb, entre las posiciones -288 y -1216, corriente arriba del sitio de inicio de la traducción en dicho gen, para responder a la acción del heterodímero circadiano BMAL1:CLOCK. Para ello, clonamos dicha región en el vector pGL3 promoter Ape1/LUC y cotransfectamos transitoriamente con vectores de expresión de BMAL1 y/o CLOCK, en una línea celular de fibroblastos murinos (NIH-3T3). Contrariamente a lo esperado, dada la presencia de varios sitios *E-box* perfectos en la secuencia regulatoria, en el caso de Ape1, no observamos activación después de la sobreexpresión del heterodímero del reloj, BMAL1:CLOCK (Figura 6.4 A-C), sino una represión significativa de la actividad basal de luciferasa, impulsada

por la región regulatoria estudiada del gen de *Ape1*, tras la expresión forzada de *BMAL1:CLOCK* (ANOVA, ** $p < 0.01$).

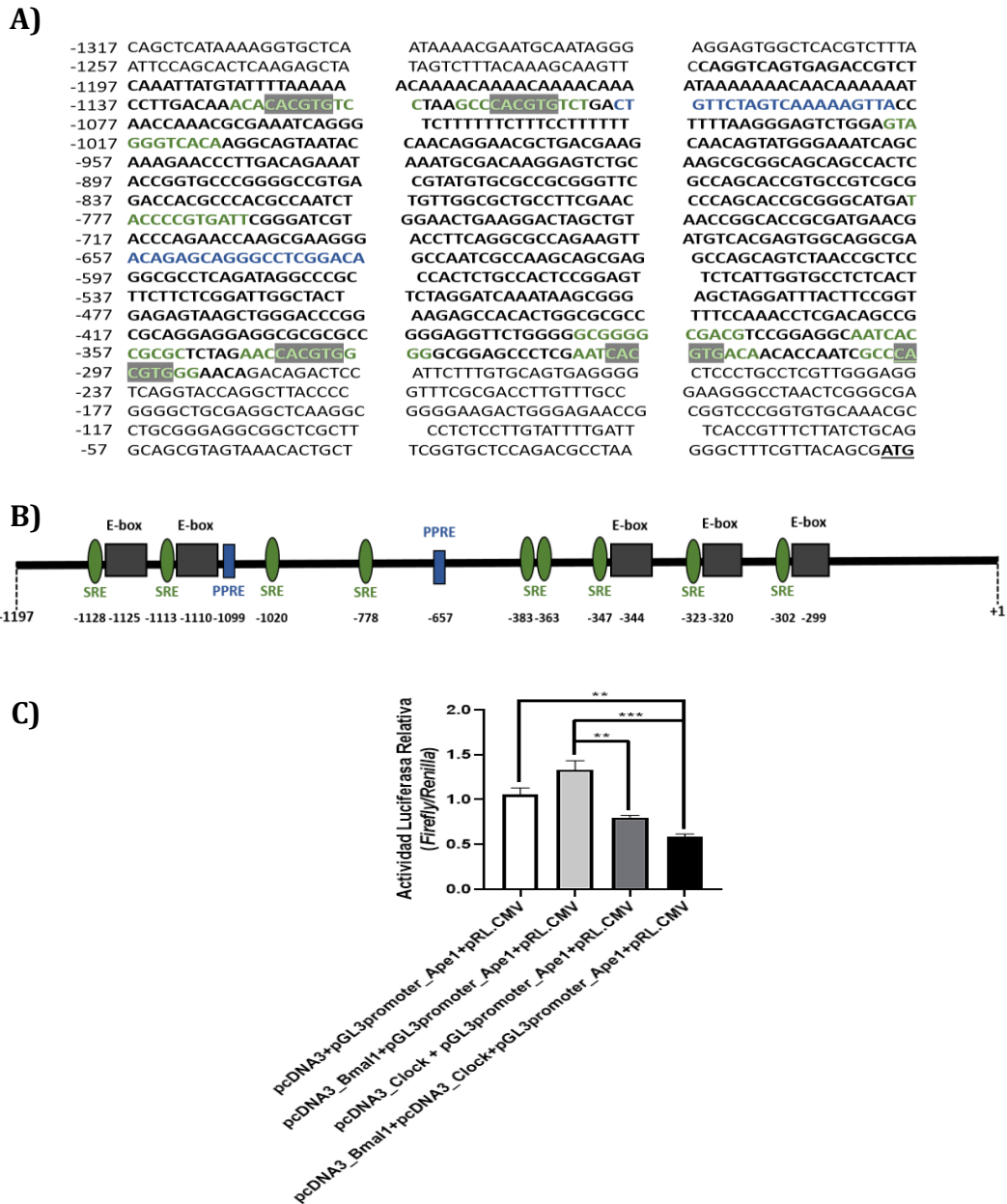


Figura 6.4- Arquitectura propuesta y análisis funcional de la región reguladora proximal de *Ape1* de rata. Se aisló una región genómica de rata 929pb mediante PCR de alta fidelidad. La secuencia se corroboró y se escaneó en busca de sitios de unión putativos para factores de transcripción relevantes. El punto de inicio de la traducción se representa en negrita como +1. A) y B) Los posibles elementos de respuesta al reloj (*E-box*) están representados por rectángulos grises oscuros, los de respuesta a esteroides (SRE) por texto y óvalos verdes y los de respuesta a PPARs (PPRE) por texto y rectángulos azules. (B) También se representan esquemáticamente a lo largo de la región regulatoria sus posiciones, relativas al inicio de la traducción. C) La respuesta del constructo *Ape1/LUC* se cuantificó luego de su cotransfección en células NIH-3T3 junto con los vectores diseñados para sobreexpresar *BMAL1*, *CLOCK* y *BMAL1:CLOCK*. Las barras representan la media de la actividad relativa de luciferasa \pm SEM de tres experimentos independientes realizados

por triplicado. La actividad de luciferasa de luciérnaga impulsada por la región reguladora de Ape1 se normalizó a la actividad generada por un indicador de control de luciferasa de Renilla impulsado por el promotor de citomegalovirus. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía, seguido de test de Tukey, con *** $p < 0.001$.

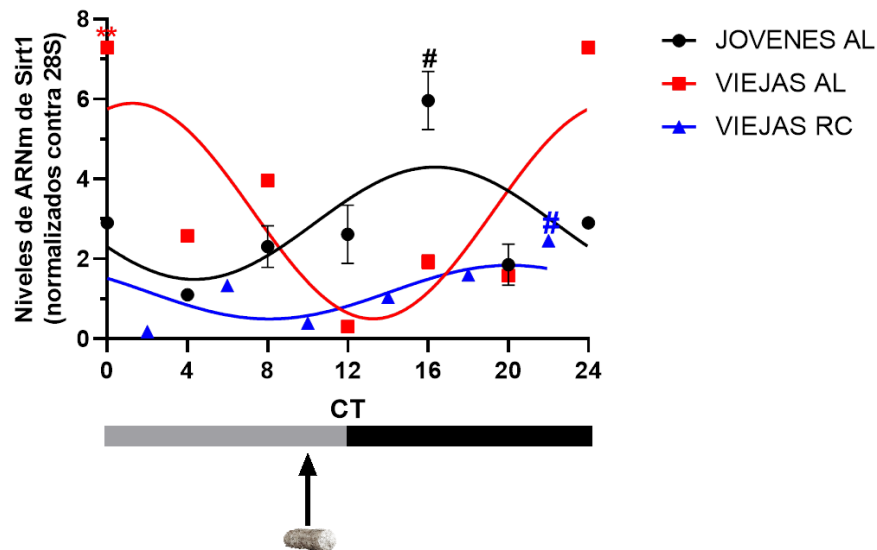
6- Ritmo circadiano de expresión de la enzima modificadora de histonas, sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD (Sirt1).

Los niveles de ARNm de Sirt1 muestran una oscilación circadiana en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum* (Chronos-FIT, $p < 0.05$; %ritmo=38.98), con niveles máximos en la primera mitad de la noche subjetiva (acrofase del ritmo a CT $16:07 \pm 00:37$; Fig. 6.5 A y Tabla 6.3). Nosotros observamos que con la senectud se produce un adelanto de fase del ritmo circadiano de los niveles de expresión de Sirt1 en el cerebelo (Chronos-FIT, $p < 0.01$; %ritmo=49.21; acrofase del ritmo en CT $01:31 \pm 00:07$; Fig. 6.5 A y Tabla 6.3).

El grupo de ratas viejas sometidas a RC, también presenta una variación circadiana en los niveles de expresión de la desacetilasa en cerebelo (Chronos-FIT, $p < 0.05$; %ritmo=38.7), aproximando su acrofase a la del ritmo observado en el grupo de ratas jóvenes (CT $20:07 \pm 00:06$; Fig. 6.5 A y Tabla 6.3). Además, observamos una disminución significativa en parámetros como el mesor (1.16 ± 0.02 vs 2.94 ± 0.04 , $p < 0.01$) y la amplitud (0.67 ± 0.03 vs 2.21 ± 0.04 , $p < 0.01$), en comparación al grupo de animales envejecidos alimentados *ad-libitum* (Tabla 6.3).

Una vez que observamos que los niveles de expresión de Sirt1 exhibían ritmo circadiano en cerebelo, exploramos la región regulatoria del gen de la desacetilasa para buscar sitios de respuesta al reloj. La exploración de 2000 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción del gen Sirt1 en la base de datos Genomatix se muestra en la Figura 6.3 B. Este análisis reveló diez sitios *E-box-like* (CANNTG) en la región corriente arriba del gen Sirt1.

A)



B)

Región regulatoria Sirt1 (NM_001372090.1)



Figura 6.5- Ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Sirt1 en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. (A) Las curvas de ajuste a la función coseno representan la expresión relativa de Sirt1 normalizada contra la expresión de 28S, a diferentes CT en un ciclo de 24 h. Cada punto en la curva representa la media \pm SEM de cuatro muestras de cerebelo para cada CT. Las barras horizontales representan la distribución de las fases de 12h-oscuridad:12h-oscuridad (OO) en un período de 24 h (CT0-CT24), con barras grises que representan el día subjetivo y barras negras que simbolizan la noche subjetiva. El análisis estadístico se realizó usando Kruskal-Wallis con # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ cuando las medias indicadas se compararon con el valor máximo correspondiente en cada grupo. (B) Mapa de sitios *E-box-like* (representados como óvalos blancos) en la región regulatoria del gen Sirt1, sus posiciones son relativas al punto de inicio de la transcripción (representada como rectángulo gris).

Tabla 6.3: Parámetros característicos del ritmo circadiano de ARNm de Sirt1 en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC.

Parámetros del Ritmo	Jóvenes <i>Ad-Libitum</i>	Viejas <i>Ad-Libitum</i>	Viejas con RC	p
Mesor (media ± ES)	2.79±0.07 ^b	2.94±0.05 ^c	1.17±0.02 ^{b,c}	^{b,c} p<0.01
Amplitud (media ± ES)	1.53±0.35	2.21±0.04 ^c	0.67±0.03 ^c	^c p <0.01
Acrofase (media ± ES)	16:07±00:37 _{a,b}	01:31±00:07 ^{a,c}	20:07±00:06 _{b,c}	^{a,b,c} p <0.01
% Ritmo	38.98	49.21	38.70	

7- Conclusiones

- Contrariamente a lo esperado, dada la presencia de sitios de respuesta al factor de transcripción del reloj en las regiones regulatorias de los genes *Ogg1* y *Ape1*, la expresión de estas enzimas del sistema *BER* es arrítmica en el cerebelo de ratas jóvenes AL. Llamativamente, el envejecimiento vuelve rítmica dicha expresión, presentando, en ambos casos, picos máximos al principio del día subjetivo. También en este caso, la RC retrasó las acrofases de los ritmos de expresión de *Ogg1* y *Ape1*, en el cerebelo de las ratas viejas. Además, incrementó significativamente el nivel medio de expresión diaria de *Ogg1* y disminuyó el de *Ape1*, respecto al grupo de ratas viejas AL.

- Cuando estudiamos la respuesta de regiones reguladoras de *Ogg1* y *Ape1*, conteniendo 13 sitios *E-box-like* y 5 sitios *E-box* perfectos, respectivamente, en experimentos *in vitro*, observamos que el heterodímero del reloj, BMAL1:CLOCK, ejerce una regulación diferencial, activando la expresión de luciferasa conducida por la región reguladora de *Ogg1*, y reprimiendo la expresión conducida por la región reguladora de *Ape1*.

- Los niveles de ARNm de Sirt1 muestran una oscilación circadiana en cerebelo de ratas jóvenes alimentadas *ad-libitum*. Con la senectud, se produce un adelanto de fase del ritmo circadiano de expresión de Sirt1 en el cerebelo. La RC a corto plazo, aproximó la acrofase al momento de la acrofase del ritmo observado en los animales jóvenes AL y disminuyó el mesor, en comparación con el grupo de ratas viejas AL.

Parte IV

CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

Capítulo 7

Conclusión y Discusión

CONCLUSIÓN

Los resultados y hallazgos del presente trabajo pueden resumirse en los siguientes:

1) Constatación de un déficit de funciones cognitivas y motoras dependientes del cerebelo, en ratas de 22 meses, y recuperación parcial de las mismas cuando animales de la misma edad se sometieron a un protocolo de alimentación con restricción calórica del 40%, durante 3 meses (corto plazo).

2) Evidencia de una expresión rítmica circadiana, controlada por el reloj celular endógeno, de diferentes factores celulares tales como: el propio factor activador del reloj, BMAL1, factores claves en la plasticidad sináptica, Bdnf y su receptor TrkB, y factores que participan en la regulación epigenética, Sirt1 y Dnmt1, en el cerebelo de ratas jóvenes alimentadas AL y mantenidas en condiciones de oscuridad constante (OO). Estas condiciones constituyen un enfoque mecanicista para demostrar que las oscilaciones de 24 h, mostradas en nuestro trabajo, son impulsadas endógenamente por el sistema de temporización interno, y poder definir las, estrictamente, como ritmos circadianos [Aschoff, 1967].

3) Expresión arrítmica de las enzimas de reparación del ADN, Ogg1 y Ape1, en cerebelo del mismo grupo experimental.

4) Localización de sitios de respuesta a los factores de transcripción del reloj en las regiones reguladoras de los genes de: Sirt1, Dnmt1, Ogg1 y Ape1, y

sitios CpG de metilación en regiones reguladoras y exónica de los genes *Bdnf* y *TrkB*.

5) Aparición de ritmos circadianos de expresión de *Ogg1* y *Ape1* y disrupción de los patrones de expresión circadiana de *BMAL1*, *Bdnf*, *TrkB*, *Dnmt1* y *Sirt1*, en el cerebelo de ratas de 22 meses alimentadas AL y mantenidas en condiciones de OO, con recuperación parcial o total de los mismos en los animales sometidos a un protocolo de restricción calórica del 40% a corto plazo, y mantenidas en idénticas condiciones de OO.

6) Evidencia *in vitro* del control transcripcional de la expresión de las enzimas implicadas en el sistema BER, *Ogg1* y *Ape1*, por parte del factor de transcripción del reloj, el heterodímero *BMAL1:CLOCK*.

7) Construcción de un mapa de fases que da cuenta de la organización temporal de los factores estudiados, en los tres grupos experimentales (Figura 7.1).

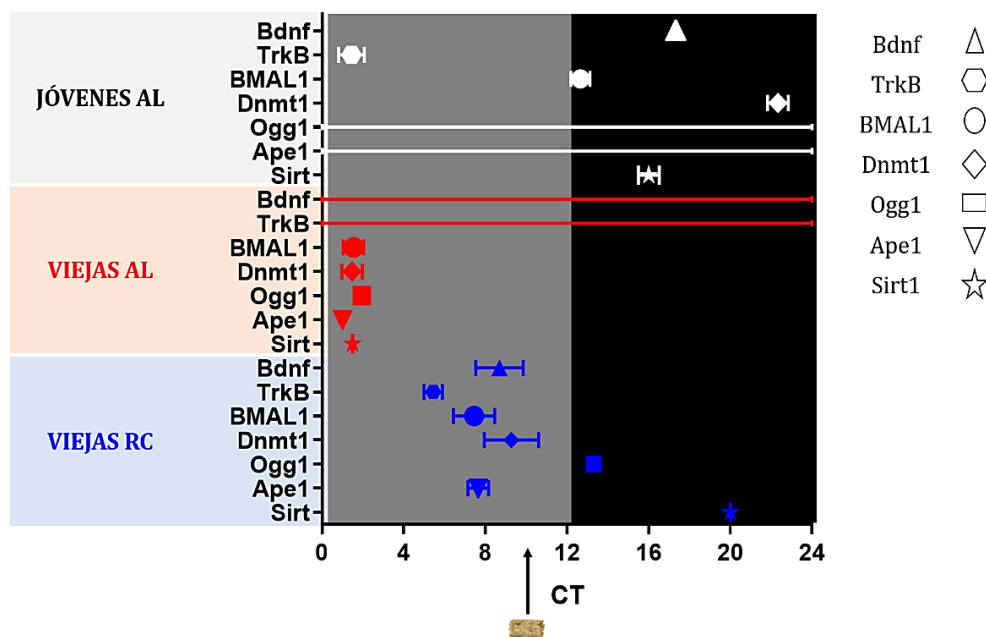


Figura 7.1- Mapa de Fases de la expresión circadiana de los diferentes genes estudiados en cerebelo de ratas jóvenes y viejas alimentadas *ad-libitum*, y ratas viejas sometidas a RC. Acrofasas promedio (tiempo de ocurrencia del valor máximo de mejor ajuste) de los ritmos analizados. Los valores medios de las acrofasas se grafican \pm SEM.

Este mapa de fases pone en evidencia: 1) que existe una organización temporal BMAL1-Sirt1-Bdnf-Dnmt1 en el cerebelo de ratas jóvenes alimentadas AL, 2) que la expresión de Ogg1 y Ape1 es arrítmica en este grupo etario, 3) que el envejecimiento adelanta la fase de BMAL1, 'arrastrando' las acrofases de los ritmos de expresión de Dnmt1, Ogg1, Ape1 y Sirt1 hacia el inicio del día subjetivo y, probablemente así, volviendo arrítmica la expresión de los factores cognitivos, Bdnf/TrkB, y 4) que la RC a corto plazo restaura parcialmente los patrones y la relación temporal entre los picos de expresión de los factores epigenéticos, de reparación del ADN, y cognitivos, respecto a BMAL1, en cerebelo.

DISCUSIÓN

Evaluación fisiológica y comportamental del modelo experimental

En primer lugar, en este trabajo, comenzamos evaluando el modelo experimental a través de parámetros fisiológicos y comportamentales. Así, observamos que los animales de 22 meses presentan un peso corporal significativamente mayor y una apariencia que muestra un pelaje amarillento, opaco, piloerección, cola con hiperqueratosis, descamación y materia fecal, en comparación con los adultos jóvenes de 3 meses de edad (Figuras 4.1 y 4.2). Estas observaciones coinciden con los parámetros descritos y evaluados por Phillips y cols. [2010], en ratas viejas de la cepa Brown Norway, en su método de evaluación observacional de envejecimiento de animales de laboratorio. Llamativamente, cuando sometimos a nuestras ratas viejas a la dieta con RC, observamos una disminución del peso corporal y recuperación de las características de pelaje y piel saludables, tal como los observados en el grupo de ratas jóvenes.

Otra característica fisiológica de los individuos es su sistema de temporización interno. Este sistema les permite anticiparse a los cambios ambientales, desde una perspectiva de homeostasis predictiva, a través de variaciones temporales rítmicas generadas endógenamente [Toni y col., 2004; Golombek, 2007]. En el caso de los roedores con hábitos nocturnos, la locomoción está circunscripta a las horas de oscuridad y el descanso a las horas de luz. En mamíferos, se ha demostrado que en ausencia de señales temporales externas (*zeitgebers*), los ritmos generados endógenamente persisten, entre ellos, la variación circadiana de la actividad locomotora [Ashoff, 1967]. Así, una forma de evaluar la ritmicidad endógena y la sincronización temporal interna en modelos animales, es el registro temporal de la actividad locomotora, en condiciones ambientales constantes [Ashoff, 1967]. Previamente, nuestro grupo de investigación, evaluó la actividad locomotora de las ratas de 3 meses de edad, en condiciones de 12h-luz:12h-oscuridad (LO) y 12h-oscuridad:12h-oscuridad (OO), a lo largo de un período de 24 h. Como era de esperar, dado que las ratas son de hábitos nocturnos, la actividad estuvo circunscripta al periodo nocturno, cuando los animales fueron mantenidos en LO. Además, dado que previamente, también habíamos determinado y caracterizado el período endógeno de nuestras ratas de la cepa Holtzman ($\tau=24.5 \pm 0.16$, Navigatore-Fonzo y col., 2014), el patrón temporal de actividad locomotora también respondió según lo esperado, desplazándose a la derecha, luego de 15 días de mantenimiento en oscuridad constante [Lacoste y col., 2017]. Ha sido demostrado que, a través de los años, el sistema circadiano se deteriora progresivamente, poniéndose en evidencia una mayor tendencia hacia la desincronización interna, tanto en humanos como en otros mamíferos [Hofman y Swaab, 2006]. Así, en Lacoste y col. [2017] reportamos

una disminución y fragmentación de la actividad locomotora en las ratas de 22 meses, mantenidas en OO, con ausencia de una diferencia significativa entre el día y la noche subjetivas, como sí sucede con las ratas jóvenes. Esta observación sugiere que el envejecimiento daría lugar a la pérdida de la ritmicidad circadiana endógena mediada por los NSQ en mamíferos. Estos estudios previos constituyen una base importante para nuestro trabajo de tesis, ya que caracterizan el modelo animal de envejecimiento, en idénticas condiciones ambientales en las que desarrollamos nuestra investigación.

Las señales metabólicas también funcionan como potentes *zeitgebers* de relojes circadianos periféricos y, tanto la RC como la alimentación restringida en el tiempo, se han relacionado con la reorganización de la expresión génica circadiana periférica [Brewer y col., 2005, Sato y col., 2017]. Cuando los roedores son alimentados con una cantidad de dieta limitada, diariamente y a la misma hora, muestran un aumento de la actividad locomotora y de la temperatura corporal, regularmente, justo antes del tiempo de alimentación programado, lo que sugiere que la restricción alimentaria a un momento determinado del día, puede actuar como un regulador circadiano [Assali y col., 2018]. Esto justificó nuestra elección de la hora del día en que alimentamos nuestro grupo de ratas viejas sometidas a RC, a ZT11-ZT12, momento que antecede la noche subjetiva, y coincide con la actividad anticipatoria del alimento descrita por varios autores [Mistlberger, 1994; Shibata y col., 1994; Gavrila y col., 2017; Power y Mistlberger, 2020].

Dado nuestro interés en las funciones cognitivas del cerebelo, continuamos estudiando la coordinación motora, el equilibrio y el aprendizaje motor, en los animales de los tres grupos experimentales. Debido a las características de estos

estudios comportamentales, previamente, debimos estimar parámetros como la calidad de la función olfatoria, necesaria para la búsqueda del alimento usado como recompensa en algunas de las pruebas, y el estado ansiogénico y de habituación por parte de los roedores.

El *Buried Food test* es el método de elección para la detección del comportamiento olfativo [Alberts y Galef, 1976; Ye y col., 2014]. Nuestra evaluación del sentido olfatorio del grupo de ratas jóvenes, mostró que las mismas hallaron con éxito el anillo azucarado en menos de 300 segundos (Figura 4.3), lo que indica una función olfativa normal en este grupo de animales, según lo establecido por Ye y col. [2014]. Existen antecedentes de déficits de la función olfativa relacionados con la edad [Mencio-Wszalek y col., 1992]. En parte, este interés deriva de datos que demuestran relaciones significativas entre la disfunción olfativa y varios síndromes neurológicos, incluida la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y de Huntington [Mencio-Wszalek y col., 1992]. Además de estas patologías, en condiciones de envejecimiento humano no patológico, los mismos autores informan que se producen déficits sustanciales en las capacidades de identificación y reconocimiento olfatorio después de los 70 años de edad. Es por estos antecedentes que evaluamos la función olfatoria en las ratas de 22 meses de edad alimentadas *ad-libitum*. Las mismas mostraron una latencia de hallazgo del anillo azucarado aumentada en comparación con las ratas jóvenes, sin embargo, la latencia de hallazgo no superó los 300 segundos (Figura 4.3), por lo que, según Ye y col., [2014], nuestro grupo de ratas viejas no presentaría disfunción olfatoria. Es de notar que, cuando evaluamos el sentido olfatorio de los animales viejos sometidos a RC, observamos una disminución significativa de la latencia de

hallazgo, en comparación con las ratas viejas alimentadas *ad-libitum*, con recuperación de valores similares a los de los animales jóvenes (Figura 4.3).

Otro de los parámetros evaluados fue el estado ansiogénico y de habituación por parte de los roedores, para ello utilizamos las pruebas de esquina (*Corner test*) y de campo abierto (*Open Field test*), que proporcionan medidas de ansiedad y habituación. En este caso, observamos que tanto las ratas jóvenes, como las de 22-meses de edad alimentadas *ad-libitum*, no muestran diferencias significativas en los valores de los parámetros del *Corner test* que evalúan curiosidad y ansiedad, como tampoco en los parámetros del *Open field test* que evalúa habituación (Figuras 4.4 y 4.5 A-C). Sin embargo, sí observamos que las ratas viejas alimentadas *ad-libitum* visitaban frecuentemente la zona central del campo abierto y escasas veces lo hacían con las esquinas en la caja nueva, igualmente existen pocos antecedentes acerca del estado ansioso de roedores envejecidos con este tipo de ensayos, que nos permitan contrastar nuestros resultados. Llamativamente, nuestros ensayos comportamentales mostraron que las ratas viejas con RC presentan un incremento significativo en los valores de los parámetros evaluados para ambos test, en comparación con los grupos de ratas jóvenes y viejas AL (Figuras 4.4 y 4.5 A-C). Esto daría cuenta de un estado ansioso y dificultad en la habituación ante la presencia de un ambiente novedoso, en contraste con lo reportado por Abbott y col [2009], quienes reportaron que los estímulos olfativos y la RC reducen el comportamiento similar a la ansiedad y alteran los mecanismos neuroquímicos relacionados con la ansiedad en ratas. Probablemente, nuestras observaciones estén en congruencia con otras observaciones del mismo grupo, que demuestran, llamativamente, que los roedores sometidos a RC perciben

olfativamente las feromonas de otros grupos experimentales mantenidos en un régimen alimenticio diferente (por ej. *ad-libitum*) aumentando esta condición el estado ansioso de los roedores con RC [Abbott y col., 2009].

Una vez evaluados los parámetros anteriormente mencionados, nuestros estudios se centraron en la evaluación de funciones propias de la zona del cerebro que nos interesa, el cerebelo, que juega un papel clave en la coordinación y los movimientos finos, así como en el aprendizaje motor [Rodrigues y col., 2017]. Se ha demostrado que el papel del cerebelo va más allá de la coordinación motora y se extiende a la función cognitiva [Rodrigues y col., 2017]. Es por ello que, para evaluar las funciones de coordinación motora y equilibrio en las ratas jóvenes, comprobamos la capacidad de estos roedores para atravesar una viga estrecha hasta alcanzar una plataforma de seguridad cerrada a través del *Beam Walking test*. Esta prueba, califica como exitosas las habilidades motoras y de balance, no solo por las cortas latencias de tiempo en atravesar la viga, sino por los escasos deslizamientos y caídas. Como era de esperar, la prueba *Beam Walking test* mostró que el grupo de ratas viejas AL presentan un rendimiento errático, mayor latencia para desarrollar la prueba y mayor número de deslizamientos y caídas, denotando el deterioro en las funciones motrices durante la vejez, en comparación con los animales jóvenes (Figura 4.6 A-F). Es sabido, que el envejecimiento conduce al deterioro de la función física, con disminuida fuerza de los músculos de las extremidades inferiores y menor capacidad de equilibrio, que constituyen las principales causas de caídas [Lee y col., 2020]. Cunha-Santos y col. [2016] encontraron que la RC rescata dramáticamente la incoordinación motora, el desequilibrio y la neuropatología asociada, en ratones transgénicos con

enfermedad de Machado-José, sin embargo, no existe actualmente evidencia, acerca de los efectos de la RC en el comportamiento motor durante el envejecimiento. Nosotros observamos que, bajo condiciones de RC, la coordinación motora y el equilibrio evaluados por el *Beam Walking test* no mejoraron en las ratas viejas RC, incluyendo parámetros como la cantidad de deslizamientos o caídas, ni presentaron mejores tiempos de latencia en comparación con las ratas viejas AL (Figura 4.6 A-F). El número de animales que utilizamos en este caso, fue n=12, el valor mínimo requerido para las pruebas comportamentales, sin embargo, probablemente, sea necesario aumentar la cantidad de animales para terminar de confirmar estos resultados. El escenario pandémico mundial (COVID-19), durante el período 2020-2021, impidió la posibilidad de aumentar el número de ratas para esta prueba.

A fin de evaluar las funciones de aprendizaje motor y movimiento fino usamos la prueba de recuperación de un único *pellet* (*Single Reaching Pellet test*); en este caso, como era de esperar, las ratas jóvenes mostraron el mejor rendimiento, dado el reducido puntaje en su *performance*, y una tasa de éxito elevada en la captura del *pellet* con la extremidad anterior dominante, demostrando así un óptimo movimiento fino de ésta extremidad, y adquisición del aprendizaje motor (Figura 4.7 A-C). Como esperábamos, nuestros ensayos mostraron deterioro cognitivo en el grupo de ratas viejas AL, evidenciado por el bajo rendimiento durante la actividad, asociado a un elevado puntaje en su *performance*, y el disminuido porcentaje de éxito en la ejecución de la prueba comportamental (Figura 4.7 A-C). Es sabido que con el pasar del tiempo, existe un deterioro progresivo de la función cognitiva y motora, siendo éste un fenotipo

representativo del envejecimiento [Lee y col., 2020]. Es de notar, que el grupo de ratas viejas sometidas a RC, mostró un aumento significativo de la tasa de éxito total en la recuperación del *pellet* único, en comparación al grupo de ratas viejas AL, aproximándose a los valores correspondientes de los individuos jóvenes (Figura 4.7 A-C). A pesar de la tasa de éxito elevada, no observamos una mejora en la calidad de *performance* durante la prueba en los animales con RC respecto a las ratas viejas AL (Figura 4.7 A-C), coincidiendo estos resultados con lo reportado por Smith y Metz [2005] en ratas con restricción dietaria. Estos autores proponen que, posiblemente, la mejoría en la tasa de éxito total se debe, al menos en parte, al comportamiento frenético que se observa en los animales restringidos alimentariamente [Smith y Metz, 2005]. No encontramos a la fecha estudios que avalen una mejoría del aprendizaje motor por la RC per sé.

La pérdida de memoria y el deterioro cognitivo son una de las principales características del envejecimiento y el efecto de la RC sobre estas funciones cognitivas aún está en estudio. Dada la relación cerebelo-hipocampo a través del tracto cerebelar-hipocampal, una red neuronal a través de la cual el cerebelo puede influir en la actividad neuronal del hipocampo y funciones relacionadas, como la navegación espacial [Watson y col., 2019], es importante mencionar que, además de la evaluación de las funciones cerebelares, objeto del presente estudio y que hemos descrito precedentemente, estos mismos grupos de animales, fueron utilizados para evaluar el aprendizaje espacial y la función hipocampal [Altamirano y col., 2019 y 2020].

Inmediatamente a continuación de nuestros estudios de comportamiento motor con reforzamiento positivo, con Altamirano y col. [2019 y 2020] evaluamos

las funciones de aprendizaje y memoria espacial en roedores, a través del test de Barnes (*Barnes Maze test*) y de exploración de objeto novedoso (*Novel Object Recognition test*). En la prueba de Barnes, observamos que las ratas viejas con RC presentan una menor distancia recorrida en la plataforma, comportamiento similar al grupo joven. En este caso, tampoco encontramos diferencias significativas entre los animales de 22 meses, AL y RC, en el resto de los parámetros analizados con la prueba de Barnes (frecuencia exploratoria de la región objetivo, actividad exploratoria total, número de errores en alcanzar alrededor del agujero objetivo, latencias de la caja de escape, porcentaje de exploración de los agujeros meta). En el caso de la prueba de exploración de objeto novedoso, tampoco observamos diferencias significativas entre los animales viejos AL y los sometidos a RC. Hasta la fecha, los estudios realizados sobre los efectos de la RC en las funciones cognitivas no son concluyentes y dependerían del protocolo utilizado.

Tomados en conjunto los resultados de las pruebas *Single Reaching Pellet*, *Barnes-Maze* y *Novel Object Recognition test*, que evalúan el aprendizaje motor y aprendizaje y memoria espacial, respectivamente, podemos decir que la RC no genera efectos significativos en los diferentes parámetros de dichas pruebas evaluados en ratas viejas. Nuestros resultados estarían en línea con los hallazgos reportados por Watson y col. [2019], quienes cuestionan funciones conductuales divergentes, a saber, la navegación espacial (hipocampo) por un lado, y el control motor (cerebelo), por el otro, sino que sugieren que cerebelo e hipocampo interactúan dinámicamente.

Los efectos de la RC dependen de su intensidad, el período de vida en el que se inicia el tratamiento, su duración y, teniendo en cuenta los principios

cronobiológicos, el momento del día en que el alimento está disponible. En las condiciones de mantenimiento y RC de nuestro modelo, no vimos mejoras significativas en las ratas viejas sometidas a RC, respecto al grupo de animales viejos AL, en las pruebas comportamentales utilizadas. Sin embargo, existen antecedentes del efecto positivo de la RC sobre la regulación transcripcional y epigenética de la expresión de factores involucrados en las funciones cognitivas, tales como Bdnf, PSD-95, y sinaptofisina [Kaptan y col., 2015; Kishi y col., 2015; Wang y col., 2021]. Es de notar que esos y otros estudios fueron realizados principalmente, en hipocampo y corteza prefrontal y no exploran el efecto de la RC sobre la variación temporal de los factores cognitivos. Esto nos llevó a continuar nuestra investigación sobre los patrones circadianos de los niveles de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, Bdnf, y de su receptor TrkB, en el cerebelo de los tres grupos experimentales, y su posible regulación circadiana y epigenética.

Análisis de los patrones temporales de los niveles de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, Bdnf, y de su receptor TrkB, en cerebelo y su posible regulación circadiana y epigenética

Es bien sabido que el cerebelo participa en la coordinación motora; sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, existe evidencia creciente que respalda el papel del cerebelo también en las funciones cognitivas [Koziol y col., 2014; Nagao, 2021]. Por primera vez, en nuestro conocimiento, observamos que la expresión de Bdnf y TrkB muestra una ritmicidad circadiana, generada endógenamente, alcanzando sus picos máximos a la mitad de la noche y comienzo del día subjetivo, respectivamente, en el cerebelo de ratas jóvenes AL (Figura 5.1 y

5.2 A; Tabla 5.1 y 5.2). De manera similar, otros y nosotros hemos reportado variaciones diarias y ritmos circadianos de la expresión de Bdnf y TrkB, en hipocampo y corteza prefrontal de rata [Dolci y col., 2003; Golini y col., 2012; Coria-Lucero y col., 2016; Navigatore-Fonzo y col., 2017]. Nuestros resultados son congruentes con los de Pollock y col. [2001] quienes informaron una mayor concentración de proteína BDNF durante la noche en el cerebelo de rata. Por otro lado, encontramos que el incremento en la expresión cerebelar de TrkB sigue al pico de expresión de Bdnf (Figura 5.2 A; Tabla 5.2). El aumento de los niveles de proteína BDNF durante la noche, informado por Pollock y col. [2001], podría estimular la posterior expresión de su receptor, TrkB, para mediar la plasticidad neuronal. Estos datos sugieren que la expresión de ambos genes, Bdnf y TrkB, aumentaría en relación con la activación neuronal de la vigilia en condiciones fisiológicas (noche en animales de hábitos nocturnos), cuando las interacciones entre un organismo y su entorno activan mecanismos de aprendizaje.

Si bien existe evidencia de que el envejecimiento afecta la neuroplasticidad del hipocampo y sus funciones cognitivas moduladas por BDNF/TrkB [Tsai y col., 2018], hasta la fecha, las consecuencias del envejecimiento sobre la expresión de Bdnf y TrkB en el cerebelo, o las alteraciones en sus patrones circadianos, no se han investigado a fondo. En nuestro estudio, observamos que el envejecimiento anula el ritmo circadiano de expresión de Bdnf y TrkB en el cerebelo de rata (Figura 5.1 y 5.2 A; Tabla 5.1 y 5.2). Sin embargo, dicha expresión aumenta significativamente a CT20 y CT0, respectivamente. La RC se promueve como un modelo de senescencia desacelerada ya que prolonga la vida útil y atenúa una variedad de procesos degenerativos y enfermedades relacionados con el envejecimiento [Masoro, 2000]. La RC también limita la pérdida de memoria relacionada con el envejecimiento en

algunas cepas de roedores [Newton y col., 2005]. Si bien, se desconocen los mecanismos por los cuales la RC protege la memoria, una teoría sugiere que regula positivamente los niveles de Bdnf y la consiguiente activación de las vías de transducción de señales neuroprotectoras en las neuronas dopaminérgicas [Mattson y col., 2001; Maswood y col., 2004]. Los escasos estudios existentes acerca del efecto de RC sobre Bdnf se centran en la existencia de una mayor o menor expresión de la neurotrofina en tejidos como hipocampo o hígado, y no existe evidencia hasta el momento del efecto de RC sobre los ritmos circadianos de Bdnf ni de su receptor de alta afinidad, TrkB. En nuestra investigación, observamos que las ratas viejas sometidas a RC restauran la ritmicidad circadiana de los niveles de expresión de Bdnf y de TrkB, en el cerebelo (Figura 5.1 A), en coincidencia con lo reportado por Altamirano y col. [2020] en hipocampo de ratas viejas sometidas a RC. Por lo que nuestro trabajo no solo muestra este tipo de variación temporal de la expresión de estos genes cognitivos en cerebelo de rata, sino cómo la RC modula estos ritmos. Los niveles de expresión de Bdnf y TrkB en las ratas viejas con RC presentan un adelanto y retraso de fase, respectivamente, en comparación a los animales jóvenes AL (Figuras 5.1 A y 5.2 A). En nuestro modelo, también observamos un aumento significativo del mesor del ritmo de TrkB, en los animales viejos sometidos a la RC, con respecto a los jóvenes (Figura 5.2 A). Probablemente, este incremento en la expresión del receptor favorezca una mayor captación del ligando BDNF y activación de sus funciones en cerebelo. Si bien no existe evidencia del efecto de RC sobre los patrones temporales de Bdnf y TrkB en cerebelo de rata, Kishi y col. [2015] reportaron que la RC protege contra disminución cognoscitiva por regulación positiva de BDNF/TrkB con un efecto antioxidante, en el hipocampo de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa.

Nuestras investigaciones previas, y los ritmos circadianos de expresión de *Bdnf* y su receptor *TrkB* mostrados aquí en cerebelo, nos llevaron a continuar analizando los niveles proteicos del factor activador del reloj celular, *BMAL1*, y su relación temporal con la expresión de los genes cognitivos, en esta área cerebral. Si bien es sabido que el cerebelo alberga un reloj circadiano, según lo demuestran las oscilaciones autosostenidas cuando se aísla *in vitro*, su importancia funcional aún no se comprende completamente [Plumel y col., 2019]. Es por ello que en este trabajo analizamos la variación circadiana del factor central del reloj celular, observando que los niveles de proteína de *BMAL1* muestran un ritmo circadiano en el cerebelo de la rata joven, con niveles máximos que ocurren al comienzo de la noche subjetiva (Figura 5.3 A), coincidiendo con el inicio del período de actividad en este tipo de roedores. Hasta la fecha, este sería el primer informe sobre el ritmo circadiano de la proteína *BMAL1* en el cerebelo. Este hallazgo es similar a lo que observamos en el hipocampo de las ratas jóvenes, donde el pico de *BMAL1* antecede el período de actividad, y está de acuerdo con el pico de expresión de *Bmal1* en el reloj central de los NSQ de ratas macho, también observado, por otros autores, en la noche subjetiva [Honma y col., 1998; Lacoste y col., 2017]. La importancia de la ocurrencia del pico de *BMAL1* al inicio del período de actividad, tiene que ver con su participación en la modulación de la expresión rítmica circadiana de genes blanco del reloj involucrados en funciones cerebelares.

Hay evidencia de que el envejecimiento conduce a una alteración de la sincronización circadiana interna en los mamíferos. En particular, en cerebelo, vimos que el envejecimiento cambia el patrón circadiano de los niveles de proteína de *BMAL1*. Nuestros resultados muestran un adelanto de fase y reducción del

mesor del ritmo de los niveles de proteína de BMAL1, en las ratas viejas AL (Figura 5.3 A; Tabla 5.3). Con base en nuestros hallazgos en otros tejidos [Lacoste y col., 2017], esperábamos que el ritmo de BMAL1 desapareciera con el envejecimiento. Sin embargo, encontramos que éste ejerce un efecto diferencial sobre el patrón circadiano del factor del reloj en el cerebelo, adelantando su fase. Ambas observaciones son congruentes con los efectos de la edad sobre los ritmos circadianos que incluyen: *reducción de la amplitud* (hasta pérdida de la ritmicidad) y *adelanto de fase* [Weinert, 2000]. Por ejemplo, el envejecimiento en humanos se caracteriza por un adelanto de fase de los ritmos de melatonina y temperatura corporal, hábitos de sueño y despertar más tempranos, y alteraciones en el sueño de los adultos mayores [Duffy y col., 2002; Yoon y col., 2003]. Nuestros resultados podrían deberse a la posibilidad de que la comunicación circadiana del reloj central a los osciladores periféricos cambie con la edad, o que la capacidad de los relojes extra-supraquiasmáticos para responder a las señales de los NSQ, se vea alterada por el envejecimiento, como podría ser el caso del cerebelo. También, algunos cambios relacionados con la edad podrían residir en propiedades intrínsecas de este reloj periférico como, por ejemplo, su participación en las funciones motoras y cognitivas [Ebner, 1998; Shadmehr y Krakauer, 2008; Watson y col., 2019]. Así, la alteración de la ritmicidad circadiana de BMAL1 en el cerebelo podría explicar, al menos en parte, algunos de los cambios observados en los patrones de expresión circadiana de los genes *Bdnf* y *TrkB*, en el cerebelo. En este sentido, es de notar que *Bdnf* posee 13 sitios de respuesta al factor de transcripción del reloj, *E-box* perfectos (CACGTG), en su región reguladora [Coria-Lucero y col., 2016] y que, como vemos en nuestro mapa de fases (Figura 7.1), la acrofase del ritmo de BMAL1 precede el pico de expresión de *Bdnf*. La posible activación de la expresión de *Bdnf*

por parte de BMAL1, podría sumarse a la activación de este gen mediada por el ejercicio físico durante la noche, en las ratas jóvenes [Johnson y Mitchell, 2003] y explicar el pico de expresión en esa fase; mientras que en las ratas viejas AL, BMAL1 adelanta su fase a las primeras horas del día subjetivo lo que podría llevar, al menos en parte, a la pérdida de la ritmicidad de la expresión de Bdnf y, consecuentemente, de TrkB, en este grupo de animales.

Patel y col. [2016] demostraron que la deficiencia del factor de transcripción del reloj circadiano, BMAL1, da como resultado un envejecimiento acelerado. Los mismos autores también proponen que BMAL1 es un mediador importante de la RC, y que su activación podría vincular los mecanismos de la RC con los relojes periféricos [Patel y col., 2016]. En nuestro trabajo, observamos que en cerebelo de las ratas viejas sometidas a RC, el ritmo de la proteína BMAL1 incrementa su mesor y amplitud, en comparación con los animales de 22 meses AL. Por otro lado, si bien no llega a recuperar la fase del ritmo observado en los animales jóvenes, su acrofase se retrasa en 6 horas respecto al grupo viejas AL (Figura 5.3 A; Tabla 5.3). Es interesante observar que la acrofase del ritmo de BMAL1, anticipa el momento de disponibilidad restringida de alimento (ZT11-12) y precedería la actividad anticipatoria del alimento descrita en la literatura [Power y Mistlberger, 2020]. Por otro lado, se ha evidenciado que, junto con la actividad anticipatoria de la comida, los animales sometidos a RC muestran un aumento en la temperatura corporal [Froy y Miskin, 2007]. Por lo tanto, debido al componente temporal de la ingesta de alimentos, es posible que la RC sincronice los relojes periféricos e influya en los sistemas de salida controlados por el reloj, como el comportamiento anticipatorio y la temperatura corporal [Froy y Miskin,

2007]. Por lo tanto, Froy y Miskin [2007] sugieren que la sincronización de los osciladores periféricos durante la RC podría lograrse, directamente, debido a la alimentación temporal o, indirectamente, sincronizando los NSQ, que, a su vez, envían señales humorales o nerviosas para sincronizar los tejidos periféricos; en ambos casos, el *zeitgeber* sería el alimento, por lo que el CT11 de los grupos de ratas mantenidos con alimentación AL y en OO, correspondería a ZT0 para el grupo de animales viejos con RC.

Otro modulador de la plasticidad sináptica, que se sumaría al control circadiano en cerebelo, es Dnmt1. DNMT1, es una enzima que desempeña un papel importante en la regulación dinámica de la metilación del promotor o región regulatoria de genes o cuerpo génico [Dong y col., 2015]. Nosotros observamos que los niveles de expresión de Dnmt1 muestran un ritmo circadiano (generado endógenamente) en el cerebelo de las ratas jóvenes AL, con su acrofase al final de la noche subjetiva, posterior al pico de la proteína del reloj, BMAL1 (Figura 7.1). A la fecha, no hemos encontrado ningún informe sobre el ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Dnmt1 en cerebelo, ni en otras áreas cerebrales. Únicamente la base de datos CGBD [Li y col., 2017], muestra evidencia experimental de la variación diaria de la expresión de Dnmt1 en muestras de hígado humano, con un pico de expresión a ZT16. La expresión rítmica de las Dnmts nos haría pensar en la variación temporal de su actividad catalítica, que metila o no metila sus genes blancos, modulando epigenética y temporalmente su expresión. En general, el envejecimiento se asocia a un aumento significativo en la expresión génica de Dnmt1 [Izquierdo y col., 2021]. Si bien, nuestros resultados no muestran una diferencia significativa en el mesor o amplitud de la expresión de Dnmt1 en

cerebelo de ratas viejas AL en comparación con las ratas jóvenes AL (Figura 5.4 A; Tabla 5.4), sí observamos, un adelanto de fase de los niveles máximos de ARNm de Dnmt1, en las ratas viejas AL respecto a las jóvenes AL, que sigue el cambio de fase de BMAL1 (Figura 7.1).

Con el tiempo se ha propuesto que los efectos beneficiosos de la RC funcionan a través de procesos epigenéticos, pero esto está en gran parte inexplorado. Estudios recientes han mostrado un efecto epigenético protector de las intervenciones anti-envejecimiento de la RC, en hígado y riñón [Hadad y col., 2018]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, continuamos investigando si la ADN metiltransferasa 1 mantiene oscilación circadiana en el grupo de ratas viejas RC; es de notar que la RC retrasó la fase del ritmo de expresión de Dnmt1 en cerebelo de ratas de 22 meses respecto al grupo de la misma edad alimentado AL (Figura 5.4 A; Tabla 5.4), siguiendo nuevamente el cambio de fase de los niveles proteicos de BMAL1, en el cerebelo del grupo con RC (Figura 7.1).

Los animales y los seres humanos contienen un enorme potencial de variabilidad genética, lo que les confiere la capacidad de adaptar su fenotipo de acuerdo con las demandas ambientales [Gomez-Pinilla y col., 2011]. Se ha demostrado que mecanismos epigenéticos que implican modificaciones posteriores a la replicación del ADN y las proteínas nucleares, modulan el gen Bdnf [Gomez-Pinilla y col., 2011]. Recientemente, Izquierdo y col [2021] vincularon el incremento en la expresión de Dnmt1 con una regulación negativa del promotor de Bdnf. En línea con esas observaciones y desde la perspectiva de una homeostasis predictiva, en nuestro estudio de expresión temporal, observamos que el pico del transcripto de Dnmt1 precede el nadir o el mínimo de la expresión de Bdnf en los

grupos de ratas jóvenes y viejas AL, respectivamente (Figura 5.4 A y 5.1 A). Esta observación es menos evidente en el grupo de animales viejos sometidos a RC. Probablemente, esto se deba a que estamos comparando fases de ritmos de expresión y no de los niveles de proteína o actividad de DNMT1, que será objeto de estudios futuros.

Los investigadores Karpova y col. [2010] demostraron que la privación de la luz induce metilación represiva del ADN, en las regiones promotoras de *Bdnf* en el hipocampo de rata, aunque no observaron cambios en los niveles de expresión o proteína de BDNF. Existe también evidencia de regulación epigenética por metilación de exones; particularmente, Boersma y col. [2014], mostraron que el estrés prenatal modifica el nivel de metilación del exón IV de *Bdnf* en hipocampo y amígdala de rata. Dados estos antecedentes, sumados a la presencia del ritmo de expresión de *Dnmt1* descrito más arriba, en este trabajo, decidimos estudiar la variación día/noche de la metilación relativa de sitios CpG, localizados en, o próximos a, sitios *E-box*, en el cuerpo génico del exón IX y la región regulatoria de los exones III de *Bdnf* y exón I de *TrkB*, dado que éstos serían los exones de los genes mencionados que se expresan mayormente en cerebelo [Aid y col., 2007]. También es de destacar que el motivo de selección para el estudio de la regulación del exón III de *Bdnf* en cerebelo, se debe a que existe evidencia que muestra a dicha región más susceptible a cambios en su expresión debido a diversas situaciones ambientales [Berchtold y col., 1999; Tong y col., 2001].

Particularmente, observamos un grado de metilación significativo en los sitios CpG estudiados en el cuerpo génico del exón IX del gen *Bdnf*, sin mostrar diferencia significativa entre el día y la noche, en el cerebelo de las ratas jóvenes

AL (Figura 5.5 A). Por otro lado, no observamos metilación en la región reguladora del exón III del gen de Bdnf ni del exón I del gen TrkB en ninguno de los momentos estudiados, en el mismo grupo de animales (Figura 5.5 B-C). La presencia de metilación en el exón IX de Bdnf, como su ausencia en el exón III de Bdnf y I de TrkB, darían cuenta de una regulación epigenética positiva de la expresión de estos genes, aunque no estarían asociadas a su ritmo de expresión circadiana. Si bien la metilación del ADN ha sido generalmente asociada con la represión transcripcional, nuestros resultados estarían en línea con estudios recientes que indican que la metilación del ADN también puede estar asociada con la activación transcripcional [Sweatt y col., 2013; Angeloni y Bogdanovic, 2019]. En general, se ha visto que la metilación dentro del cuerpo de un gen dado, como el exón IX en nuestro caso, se correlaciona positivamente con la expresión génica [Gavin y col., 2013; Langie y col., 2017].

Los mecanismos epigenéticos, incluida la metilación del ADN son vitales para las funciones celulares y de memoria normales del sistema nervioso central, y están desregulados con el envejecimiento [Hadad y col., 2018]. Si bien se ha reportado hipermetilación del promotor y menor expresión de diversos genes durante el envejecimiento [Jin y col., 2011; Morgan y col., 2018], nosotros no observamos diferencias significativas en la metilación relativa de los sitios CpG estudiados, en el cuerpo génico del exón IX del gen Bdnf, en comparación con el grupo de animales jóvenes; y continuamos observando ausencia de metilación en la región reguladora del exón III del gen de Bdnf y del exón I de TrkB, en cerebelo de ratas viejas AL. Tampoco en este grupo detectamos cambios significativos en los niveles de metilación entre el día y la noche (Figura 5.5 A-C).

Los estudios acerca de los cambios en la metilación del ADN que ocurren en regiones regulatorias o cuerpo génico de factores neurotróficos en modelos animales de RC durante el envejecimiento, son escasos. Por el momento, el único antecedente que existe, en nuestro conocimiento, es el de Huang y col. [2015], quienes encontraron patrones de metilación diferenciales en Bdnf de leucocitos humanos de personas con obesidad, en comparación con individuos con pérdida de peso exitosa y sostenida en el tiempo. Sin embargo, en este trabajo, tampoco observamos diferencias significativas en los patrones de metilación relativa de los sitios CpG estudiados (Figura 5.5 A-C).

La organización temporal entre BMAL1, Dnmt1, Bdnf/TrkB, que surge de nuestros resultados, da cuenta de la existencia de bases moleculares y cronobiológicas que modularían la temporalidad de la función cognitiva en el cerebelo de ratas jóvenes AL. Tal organización se muestra alterada por el envejecimiento y se recupera parcialmente con la RC.

Análisis de la expresión circadiana de enzimas que participan en la reparación del ADN por escisión de base en cerebelo de rata y estudio de su regulación temporal.

La capacidad de anticipar y de reparar daños cíclicos en el ADN, es esencial para las funciones protectoras normales de los tejidos, y existe evidencia emergente de que los relojes circadianos podrían regular la respuesta celular al daño del ADN [Manzella y col., 2015]. Considerando que la citosina en dinucleótidos de CpG es un blanco de la metilación por parte de Dnmt1, la guanina vecina es susceptible a daño por oxidación a 8-oxoG [Sassa y col., 2014]. En el

genoma de las células de mamíferos, 8-oxoG es procesada por 8-oxoguanina ADN glicosilasa, OGG1 [Sassa y col., 2014]. Particularmente, en cerebelo, no observamos un ritmo circadiano de expresión de OGG1, en las ratas jóvenes AL (Figura 6.1 A; Tabla 6.1), sin embargo, sí detectamos un incremento significativo de los niveles de transcripto a CT4, es decir, en la primera mitad del día subjetivo (Figura 6.1 A; Tabla 6.1), anticipando la traducción proteica de la glicosilasa, a fin de que esté disponible para los procesos de reparación que se presentan principalmente durante el período de descanso del animal, según lo reporta el grupo de Aziz Sancar, ganador del Premio Nobel de Química 2015 [Gaddameedhi y col., 2011].

La reparación por el sistema *BER* es menos eficaz con el envejecimiento, dando por resultado la acumulación de lesiones en el ADN, inestabilidad del genoma y expresión génica alterada, que contribuyen a las enfermedades degenerativas relacionadas con la edad [Langie y col., 2017]. El cerebro es particularmente vulnerable a la acumulación de lesiones de ADN, por lo tanto, el funcionamiento apropiado de los mecanismos de la reparación del ADN es importante para la supervivencia neuronal [Langie y col., 2017]. Estudios previos de otros investigadores, revelan que el cerebelo presenta la actividad de incisión nuclear de OGG1 más alta, entre las glicosilasas, en ratones jóvenes, así como la disminución más significativa de su actividad, en función de la edad, en comparación con otras regiones del cerebro [Imam y col., 2006]. Nosotros reportamos, por primera vez en nuestro conocimiento, que los niveles de expresión de OGG1 muestran un ritmo circadiano en el cerebelo de ratas viejas AL, con niveles máximos al comienzo del día subjetivo, (Figura 6.1 A; Tabla 6.1), en fase con la proteína central del reloj, BMAL1 (Figura 7.1). Esta observación,

sumada a la presencia de 13 sitios *E-box-like*, en la región reguladora del gen *Ogg1* (Figura 6.3 B), nos indujo a pensar que existiría una modulación por parte del reloj endógeno de esta enzima de reparación celular. Discutiremos más adelante los resultados de los experimentos de regulación transcripcional *in vitro*.

Algunos estudios reportan que, en el sistema nervioso central, la RC aumenta la expresión de las proteínas anti-estrés y reparadoras del ADN [Hadad y col., 2018]. Stuart y col. [2004] reportaron que mitocondrias aisladas de riñón y cerebro, de ratones sometidos a RC, presentan actividades de OGG1 ligeramente más altas, y que, a nivel nuclear, la actividad de reparación del ADN también estaba aumentada por la RC, lo que indicaría una regulación diferencial de *BER* en ambos compartimentos. De allí, la importancia de continuar investigando acerca de los efectos de la RC sobre el sistema de reparación *BER*, particularmente sobre los patrones temporales de las enzimas involucradas. Nuestros resultados muestran la existencia de oscilaciones de tipo circadiano en los niveles de expresión de *Ogg1*, en cerebelo de ratas viejas sometidas a RC (Figura 6.1 A; Tabla 6.1). En este caso, observamos que la máxima expresión de *Ogg1* se retrasa, en comparación con las ratas viejas AL, siguiendo la acrofase de los niveles proteicos de *BMAL1* (Figura 7.1, Tabla 6.1). Al mismo tiempo, observamos un aumento significativo en el mesor del ritmo de la expresión de *Ogg1*, en las ratas viejas con RC en comparación con las ratas jóvenes y viejas AL (Figura 6.1 B, Tabla 6.1).

Para confirmar que la variación circadiana observada en los niveles de transcritos de *Ogg1*, dependía de una regulación directa por parte del heterodímero *BMAL1:CLOCK* del reloj, realizamos ensayos de cotransfección transitoria *in vitro*. Nuestros resultados muestran que la transcripción del gen

Ogg1 podría estar inducida por los factores de transcripción BMAL1 y CLOCK, tanto en forma individual, como heterodimérica, por unión a los sitios *E-box-like* en la región reguladora de dicho gen (Figura 6.3 A-C). A la fecha, no encontramos estudios sobre la regulación directa de la expresión de Ogg1 u otros componentes del sistema de reparación del ADN, por parte de los factores del reloj.

La enzima OGG1 produce un sitioapurínico/apirimidínico (AP) hidrolítico no codificante al eliminar la base del sustrato 8-oxoG. Dichos sitios AP, que también pueden formarse, con alta frecuencia, por hidrólisis espontánea o inducida por daño del enlace N-glicosídico, son luego incididos por la endonucleasa APE1 [Iyama y Wilson, 2013]. Los investigadores Kimura y col. [2003] reportaron que en un estudio de hibridación *in situ* las neuronas de los NSQ de ratón, expresan altos niveles de ARNm de Ape1, sin embargo, no detectaron ritmo o variación circadiana de los mismos. En concordancia con estos hallazgos, nuestros resultados muestran que el transcripto de Ape1 no presenta una oscilación de tipo circadiano, en el cerebelo de ratas jóvenes AL (Figura 6.2 A; Tabla 6.2), sin embargo, observamos un incremento significativo a CT20, en la segunda mitad de la noche subjetiva (Figura 6.2 A; Tabla 6.2). La ausencia de ritmicidad en el grupo de los animales jóvenes, podría deberse a una menor tasa de errores durante el día en el ADN, en esta condición etaria, manteniendo a niveles basales la expresión de la enzima, la mayor parte del tiempo. El incremento a CT20 podría asociarse a la mayor actividad catabólica y estrés oxidativo observado por otros y nosotros hacia el final del período nocturno en ratas jóvenes [Baydas y col., 2002; Fonzo y col., 2009; Lacoste y col., 2017].

De manera interesante, Yang y col. [2014] proponen que BDNF estimula la capacidad de las neuronas para hacer frente al daño oxidativo del ADN, ya que activa la reparación del ADN induciendo la síntesis de la proteína CREB, que, a su vez, induce la expresión de la endonucleasa APE1, en corteza cerebral e hipocampo de ratones. Nuestros resultados estarían en línea con la posible función reguladora de BDNF sobre la expresión de APE1, ya que los niveles de máxima expresión de la neurotrofina, anteceden al momento de mayor expresión de Ape1 (CT20; Figura 7.1), en el cerebelo de ratas jóvenes.

Investigaciones en un modelo de senescencia acelerada en ratón, que muestra una neurodegeneración temprana relacionada con la edad, con deterioro en las habilidades de aprendizaje y memoria, reportaron que la actividad específica de la isoforma mitocondrial APE1, disminuye con la edad [Torregrosa-Muñumer y col., 2016]. Por otro lado, Kimura y col. [2003], estudiaron la variación circadiana de la expresión de Ape1 en el reloj central de los NSQ de ratón adulto y, si bien dicha expresión resultó elevada, no presenta una variación rítmica circadiana significativa en dicha área cerebral. Al igual que los antecedentes de Ogg1, hasta el día de la fecha, no encontramos tampoco estudios sobre las variaciones circadianas de Ape1 en cerebelo, ni sobre las consecuencias del envejecimiento sobre dicha expresión temporal. Llamativamente, nuestros resultados revelan que los niveles de ARNm de Ape1 muestran un marcado ritmo circadiano, en cerebelo de ratas viejas alimentadas *ad-libitum*, con una acrofase al inicio del día subjetivo, coincidiendo con la máxima expresión de Ogg1 y el pico de la proteína BMAL1, al comienzo del período de descanso de los animales, durante el cual es sabido que se producen actividades de reparación del ADN [Gaddameedhi y col., 2011].

Debemos mencionar, además, que este grupo experimental mostró un aumento significativo en los niveles medios diarios de expresión de Ape1 en cerebelo (Figura 6.2 B), posiblemente, como respuesta a una mayor concentración de daños al ADN y una mayor necesidad de transcripción de este gen para reparar a los mismos.

Es de notar que la expresión circadiana de Ape1 observada en cerebelo de ratas viejas AL, cambia de fase con la RC, siguiendo la acrofase de BMAL1 al igual que la expresión de Ogg1, como lo muestra nuestro mapa de fases (Figura 7.1). Además, cuando se compararon los niveles medios relativos de ARNm de Ape1 entre los diferentes grupos experimentales, las ratas viejas sometidas a RC presentaron una disminución significativa en comparación con las ratas viejas alimentadas *ad-libitum*, posiblemente, como una respuesta a una disminución en la acumulación de errores, dado el rol antioxidante reconocido de la RC [Tonini y col., 2021] y, por lo tanto, menor necesidad de capacidad de reparación por parte de la endonucleasa.

La ritmicidad circadiana de la expresión de Ape1 en cerebelo de las ratas viejas AL y viejas con RC, como la presencia de 5 sitios *E-box* perfectos en la región regulatoria de dicho gen (Figura 6.4 A-B), nos llevó a estudiar su regulación transcripcional, mediada por BMAL1:CLOCK, mediante ensayos de luciferasa en células NIH 3T3. Contrario a lo esperado, nuestros datos *in vitro* indican que el fragmento de la región regulatoria de Ape1, 929pb *upstream* al sitio de inicio de la traducción, no se activó con la sobreexpresión del factor circadiano BMAL1:CLOCK, a pesar de la presencia de los sitios *E-box* mencionados, sino que, produjo una represión significativa de la actividad basal de luciferasa (Figura 6.4

C). Este hallazgo de función represora de los factores del reloj coincide con lo reportado por Anzulovich y col. [2006] quienes observaron este tipo de regulación sobre el promotor del gen *Elovl3* en la línea celular de hepatocitos de ratón, AML12. Este comportamiento sugeriría que los sitios *E-box* que se encuentran en la región regulatoria de Ape1 estudiada, no son dianas positivas directas del reloj, o al menos no lo son en las condiciones de nuestro ensayo.

Si bien la expresión rítmica de Ape1 no parece estar activada directamente por el factor del reloj BMAL1:CLOCK, es importante mencionar que nuestro estudio *in silico* de la región regulatoria del gen de Ape1 muestra la presencia de elementos de respuesta a otros factores de transcripción, como lo son PPAR α o Srebp, próximos o solapados con los sitios *E-box* de respuesta al reloj. Dado los roles de PPAR α y Srebp en la homeostasis metabólica lipídica, y considerando la naturaleza altamente lipídica del cerebelo, la posible regulación mediada por estos factores cobraría importancia en esta área cerebral. Por otro lado, se ha evidenciado a través de ensayos de transfección transitoria y de cambio en la movilidad electroforética, que el heterodímero BMAL1:CLOCK activa la expresión del gen Ppar α a través de una región rica en *E-boxes* ubicada en el segundo intrón de su promotor, en células de hígado de ratón [Oishi y col., 2005]. Así, este factor podría ser entonces un mediador de la regulación circadiana indirecta de la expresión rítmica de ARNm de Ape1, en cerebelo de ratas viejas AL y con RC. Asimismo, también se sabe que la activación proteolítica de SREBP1 es circadiana en algunos tejidos periféricos, y se ha propuesto que la actividad de este factor probablemente sirva para integrar, o disociar, las señales circadianas centrales y

los ritmos en relojes periféricos (como el cerebelo) en respuesta a la disponibilidad de alimento [Anzulovich y col., 2006].

Es interesante que, durante las condiciones de envejecimiento, independientemente del régimen alimenticio, el reloj module la expresión de las enzimas de reparación del ADN, probablemente, buscando anticipar y preparar los mecanismos celulares ante la mayor acumulación de daño durante la vejez. La ausencia de ritmicidad circadiana de las enzimas clave del sistema de reparación, en cerebelo de ratas de 3 meses, posiblemente, también se deba a que en este grupo etario no se prioriza este tipo de modulación celular, dado que la misma dependería de la relación con el daño, que en los individuos jóvenes es menor, mientras que se encuentra aumentado en el cerebelo durante el envejecimiento [Nie y col., 2013].

La expresión de genes que codifican proteínas de *BER*, también es modulada por mecanismos epigenéticos, particularmente por desacetilaciones a cargo de la enzima SIRT1 [Yamamori y col., 2010]. Nuestros resultados revelan que el incremento del nivel de expresión de Ape1 a CT20, en el cerebelo de las ratas jóvenes, es ulterior a la acrofase del ritmo de expresión de Sirt1, durante la noche subjetiva. Por otro lado, la intercomunicación entre la maquinaria molecular circadiana y la homeostasis celular/metabólica se produce en múltiples niveles, principalmente a través de las sirtuinas [Assali y col., 2018; Kukkemane y Jagota, 2019]. SIRT1 se expresa altamente en el hipocampo, la corteza, el cerebelo, y el hipotálamo, de roedores y humanos [Deibel y col., 2015]. Nuestros experimentos revelan que los niveles de expresión de Sirt1 presentan una oscilación circadiana con niveles máximos a mitad de la noche subjetiva en el cerebelo de ratas jóvenes

AL (Figura 6.5 A; Tabla 6.3), posteriores al pico máximo de la proteína del reloj, BMAL1 (Figura 7.1). Esta observación es consistente con lo reportado por Zhou y col. [2014] quienes demostraron que BMAL1:CLOCK se une a sitios *E-box* en el promotor de *Sirt1*, regulando su transcripción y contribuyendo a su ritmo circadiano, en hígado de ratón. Recíprocamente, se ha demostrado, que SIRT1 también puede regular positivamente el reloj circadiano al inducir la formación del heterodímero BMAL1:CLOCK o la transcripción de BMAL1 en función de su red de interacción [Osum y Serakinci, 2020].

El patrón de expresión circadiana de este modulador epigenético en cerebelo, nos haría pensar en su participación en la regulación temporal de las bases moleculares de las funciones motoras y cognitivas de esta área cerebral. Nuestros resultados muestran que la acrofase del ritmo de expresión de *Sirt1* antecede al pico de máxima expresión de los niveles de ARNm de *Bdnf* en cerebelo de ratas jóvenes AL (Figura 7.1). En este sentido, se ha observado que SIRT1 regula en forma indirecta, a través de miARN-134, la expresión de BDNF [Deibel y col., 2015]. Además, estos autores realizaron ensayos con ratones *knock-out* para SIRT1, los que presentaron alteraciones en el condicionamiento contextual y de miedo, la memoria a corto plazo y el aprendizaje espacial, además de haber alterado sus ritmos circadianos [Deibel y col., 2015]. También, se ha visto que SIRT1 modula la plasticidad sináptica y la formación de memoria a través de la regulación postranscripcional de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), crucial para la expresión de *Bdnf* y la plasticidad sináptica [Gao y col., 2010].

Osum y Serakinci, [2020] proponen que SIRT1 podría ayudar a un envejecimiento saludable al retrasar las enfermedades relacionadas con la edad. Estos autores, han demostrado que la pérdida de SIRT1 promueve el envejecimiento prematuro en ratones, que es un regulador positivo del reloj circadiano, y que su inhibición conduce a un reloj circadiano no funcional, lo que promovería los desórdenes y las enfermedades relacionadas con la edad [Osum y Serakinci, 2020]. Como uno de los cambios esperados que afectan los ritmos circadianos en el envejecimiento, nosotros observamos que en las ratas viejas AL se produce un adelanto de fase del ritmo de expresión de *Sirt1*, en el cerebelo (Figura 6.5 A; Tabla 6.3). En forma diferente a nuestros resultados, Kukkemane y Jagota [2019] reportaron que el ritmo diario de los niveles de transcripción de *Sirt1* se atenúa en los NSQ de ratas de 12 y 24 meses en comparación con las de 3 meses. Esto sugeriría que el envejecimiento afecta en forma diferencial, dependiente de tejido, la expresión circadiana de este modulador epigenético.

Las acciones de SIRT1 son pleiotrópicas y sus efectos sobre la longevidad pueden incluir modificaciones sobre la metilación del ADN [Wakeling y col., 2015]. Varios argumentos y observaciones apoyan la premisa de que los cambios epigenéticos, como los cambios en la metilación del ADN, contribuyen al proceso de envejecimiento [Wakeling y col., 2015]. La hipometilación de todo el genoma asociada a senescencia se ha descrito en células senescentes humanas, mientras que la expresión y actividad de la enzima DNMT1 disminuyen con el envejecimiento en algunos tejidos [Mensà y col., 2020]. DNMT1 participa en el mantenimiento del patrón de metilación y trabaja con SIRT1, en la modulación epigenética, asegurando la integridad del genoma y ejerciendo efectos a favor de

la longevidad [Mensà y col., 2020]. No obstante, la metilación del ADN y la acetilación/desacetilación de histonas son procesos bioquímicos distintos que controlan la expresión génica, Peng y col. [2011] informaron que SIRT1 también regula las actividades de DNMT1, asociándose físicamente con la metiltransferasa *in vitro* e *in vivo*. Como ya venimos describiendo para otros factores, BMAL1, Ogg1, Ape1, Sirt1 y la propia expresión de Dnmt1, nuestros experimentos muestran que durante el envejecimiento se produce un adelanto de fase en el ritmo circadiano de los niveles de ARNm de Dnmt1 y Sirt1 siguiendo el cambio de fase del ritmo de la proteína del reloj, BMAL1, en el cerebelo de las ratas viejas AL, en comparación con los animales jóvenes. Esto, pondría de manifiesto la existencia de una interrelación entre los factores mencionados que, en el envejecimiento, llevaría a la pérdida de los patrones circadianos de Bdnf y TrkB, en cerebelo.

La capacidad de anticipar la disponibilidad de recursos juega un papel crucial en la supervivencia [Assali y col., 2018]. Sirt1 es conocido por interactuar físicamente con los componentes clave del núcleo del reloj circadiano, particularmente con BMAL1, y también está regulado por el metabolismo, que es altamente circadiano en la naturaleza [Assali y col., 2018; Xu y col., 2018]. La RC también puede aumentar o disminuir la expresión de SIRT1 dependiendo de la región del cerebro [Deibel y col., 2015]. Particularmente, nosotros observamos que el grupo de ratas viejas sometidas a RC, restaura la fase del ritmo de expresión de Sirt1, aproximándose al patrón temporal observado en el cerebelo del grupo de ratas jóvenes. Sin embargo, también observamos una disminución significativa en parámetros como el mesor y en la amplitud en comparación al grupo de los animales viejos AL. Existe poca evidencia de que Sirt1 promueva el desarrollo de

la actividad anticipatoria de alimentos y ninguna evidencia de la participación de Sirt1 en el mantenimiento de actividad anticipatoria de alimentos [Assali y col., 2018]. En consonancia con esto, nosotros observamos que la expresión de Sirt1 es mínima durante la actividad anticipatoria de alimentos en las ratas sometidas a RC (Figura 6.5 A).

Como venimos mencionando varios estudios sobre la RC han propuesto explicar sus mecanismos de acción celulares y moleculares en el cerebro, a través de una amplia gama de vías, que incluyen mecanismos metabólicos, inflamatorios, de estrés oxidativo y de regeneración celular [Azadian y col., 2021]. Sin embargo, estos estudios se han centrado predominantemente en la RC a largo plazo, que es clínicamente impracticable por una variedad de razones, incluidas cuestiones de adherencia [Azadian y col., 2021]. Mientras que la RC a largo plazo parece implicar una multiplicidad de vías celulares, hasta ahora, la RC a corto plazo, como la de nuestro modelo experimental, se ha relacionado con las vías de SIRT1 y BDNF [Azadian y col., 2021]. En nuestro caso, observamos que los animales sometidos a RC, presentan una restauración parcial del patrón temporal del factor activador del reloj celular, BMAL1, alrededor del cual se organizan las acrofases de los ritmos de factores epigenéticos, Dnmt1 y Sirt1, y de reparación del ADN, Ogg1 y Ape1, y, consecuentemente, de los factores cognitivos, Bdnf/TrkB, en cerebelo (Figura 7.1).

A la fecha, se vienen realizando múltiples intentos para disminuir los efectos del envejecimiento y mejorar la salud y bienestar de los adultos mayores, mediante la utilización de una variedad de estrategias no farmacológicas nutricionales, como la restricción calórica o el ayuno intermitente, entre otras. Una de las posibles razones por las que algunos de estos intentos fallan es que las actividades de los

diferentes componentes del sistema de reparación del ADN, las funciones cognitivas y su regulación epigenética, se hallan sincronizadas en forma temporal. Así, teniendo en cuenta los resultados de este trabajo de tesis, el reloj circadiano debería considerarse también como un blanco importante de tratamientos no farmacológicos, dado su rol como coordinador natural del estado metabólico, las funciones cognitivas y los sistemas de regulación y reparación del ADN, en la búsqueda de estrategias para el tratamiento de los desórdenes cerebelares relacionados con la edad.

Referencias

Abbott, J. D., Kent, S., Levay, E. A., Tucker, R. V., Penman, J., Tammer, A. H., y Paolini, A. G. (2009). The effects of calorie restriction olfactory cues on conspecific anxiety-like behaviour. *Behavioural brain research*, 201(2), 305–310.

Acosta, J., Bussi, I. L., Esquivel, M., Höcht, C., Golombek, D. A., y Agostino, P. V. (2020). Circadian modulation of motivation in mice. *Behavioural brain research*, 382, 112471.

Acosta-Rodríguez, V. A., de Groot, M., Rijo-Ferreira, F., Green, C. B., y Takahashi, J. S. (2017). Mice under Caloric Restriction Self-Impose a Temporal Restriction of Food Intake as Revealed by an Automated Feeder System. *Cell metabolism*, 26(1), 267–277.e2.

Acosta-Rodríguez, V. A., Rijo-Ferreira, F., Green, C. B., y Takahashi, J. S. (2021). Importance of circadian timing for aging and longevity. *Nature communications*, 12(1), 2862.

Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. 2007 Feb 15;85(3):525-35.

Albers, H. E., Liou, S. Y., Stopa, E. G., y Zoeller, R. T. (1992). Neurotransmitter colocalization and circadian rhythms. *Prog Brain Res*, 92, 289-307.

Alberts, J. R., y Galef, B. G., Jr (1971). Acute anosmia in the rat: a behavioral test of a peripherally-induced olfactory deficit. *Physiology and behavior*, 6(5), 619–621.

Altamirano, F.G., Ponce, I.T., Castro Pascual, I.C., Ferramola, M., Delgado, S.M., Anzulovich, A.C., Lacoste, M.G. (2020). Can caloric restriction improve cognition in aging rats?. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Abstract Book, 218.

Altamirano, F.G., Ponce, I.T., Coria Lucero, C.D., Castro Pascual, I.C., Ferramola, M., Delgado, S.M., Anzulovich, A.C., Lacoste, M.G. (2019). Memory and learning decline are related with temporal changes of cognitive factors in aged rats. XXXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Abstract book, 25.

aNavigatore-Fonzo, L. S., Delgado, S. M., Golini, R. S., y Anzulovich, A. C. (2014). Circadian rhythms of locomotor activity and hippocampal clock genes expression are dampened in vitamin A-deficient rats. *Nutr Res*, 34(4), 326-335.

Angeloni, A., y Bogdanovic, O. (2019). Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation. *Essays in biochemistry*, 63(6), 707–715.

Antoniali, G., Lirussi, L., Poletto, M., y Tell, G. (2014). Emerging roles of the nucleolus in regulating the DNA damage response: the noncanonical DNA repair enzyme APE1/Ref-1 as a paradigmatical example. *Antioxid Redox Signal*, 20(4), 621-639.

Anzulovich, A., Mir, A., Brewer, M., Ferreyra, G., Vinson, C., y Baler, R. (2006). Elov13: a model gene to dissect homeostatic links between the circadian clock and nutritional status. *Journal of lipid research*, 47(12), 2690–2700.

Arranz, L., Giménez-Llort, L., De Castro, N. M., Baeza, I., y De la Fuente, M. (2009). El aislamiento social durante la vejez empeora el deterioro cognitivo, conductual e inmunitario [Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment]. *Revista española de geriatría y gerontología*, 44(3), 137–142.

Aschoff, J. (1967). Human circadian rhythms in activity, body temperature and other functions. *Life Sci Space Res*, 5, 159-173.

Aschoff, J., Wever, R., Wildgruber, C., y Wirz-Justice, A. (1984). Circadian control of meal timing during temporal isolation. *Naturwissenschaften*, 71(10), 534-535.

Assali, D. R., Hsu, C. T., Gunapala, K. M., Aguayo, A., McBurney, M., y Steele, A. D. (2018). Food anticipatory activity on a calorie-restricted diet is independent of Sirt1. *PloS one*, 13(6), e0199586.

Azadian, M., Tian, G., Bazrafkan, A., Maki, N., Rafi, M., Chetty, N., Desai, M., Otarola, I., Aguirre, F., Zaher, S. M., Khan, A., Suri, Y., Wang, M., Lopour, B. A., Steward, O., y Akbari, Y. (2021). Overnight Caloric Restriction Prior to Cardiac Arrest and Resuscitation Leads to Improved Survival and Neurological Outcome in a Rodent Model. *Frontiers in neuroscience*, 14, 609670.

Balasubramanian, P., Howell, P. R., y Anderson, R. M. (2017). Aging and caloric restriction research: a biological perspective with translational potential. *EBioMedicine*, 21, 37-44.

Banks, G., Nolan, P. M., y Peirson, S. N. (2016). Reciprocal interactions between circadian clocks and aging. *Mamm Genome*, 27(7-8), 332-340.

Barclay, J. L., Tsang, A. H., y Oster, H. (2012). Interaction of central and peripheral clocks in physiological regulation. *Prog Brain Res*, 199, 163-181.

Baydas, G., Gursu, M. F., Yilmaz, S., Canpolat, S., Yasar, A., Cikim, G., y Canatan, H. (2002). Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neuroscience letters*, 323(3), 195-198.

Beard, W. A., Horton, J. K., Prasad, R., y Wilson, S. H. (2019). Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. *Annu Rev Biochem*, 88, 137-162.

Berchtold, N. C., Oliff, H. S., Isackson, P., y Cotman, C. W. (1999). Hippocampal BDNF mRNA shows a diurnal regulation, primarily in the exon III transcript. *Brain research. Molecular brain research*, 71(1), 11-22.

Berman, S. M., Paz-Filho, G., Wong, M. L., Kohno, M., Licinio, J., y London, E. D. (2013). Effects of leptin deficiency and replacement on cerebellar response to food-related cues. *Cerebellum (London, England)*, 12(1), 59-67.

Bernard, J. A., y Seidler, R. D. (2014). Moving forward: age effects on the cerebellum underlie cognitive and motor declines. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 42, 193-207.

Beytebiere, J. R., Greenwell, B. J., Sahasrabudhe, A., y Menet, J. S. (2019). Clock-controlled rhythmic transcription: is the clock enough and how does it work?. *Transcription*, 10(4-5), 212-221.

Bochtler, M., Kolano, A., y Xu, G. L. (2017). DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *Bioessays*, 39(1), 1-13.

Boersma, G. J., Lee, R. S., Cordner, Z. A., Ewald, E. R., Purcell, R. H., Moghadam, A. A., y Tamashiro, K. L. (2014). Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats. *Epigenetics*, 9(3), 437–447.

Boiteux, S., Coste, F., y Castaing, B. (2017). Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radic Biol Med*, 107, 179-201.

Brewer, M., Lange, D., Baler, R., y Anzulovich, A. (2005). SREBP-1 as a transcriptional integrator of circadian and nutritional cues in the liver. *Journal of biological rhythms*, 20(3), 195–205.

Buckner R. L. (2013). The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from an atomy and neuroimaging. *Neuron*, 80(3), 807–815.

Cabelof, D. C., Yanamadala, S., Raffoul, J. J., Guo, Z., Soofi, A., y Heydari, A. R. (2003). Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline. *DNA repair*, 2(3), 295–307.

Caffrey, P. J., y Delaney, S. (2020). Chromatin and other obstacles to base excision repair: potential roles in carcinogenesis. *Mutagenesis*, 35(1), 39–50.

Caldeira, C., Cunha, C., Vaz, A. R., Falcão, A. S., Barateiro, A., Seixas, E., Fernandes, A., y Brites, D. (2017). Key Aging-Associated Alterations in Primary Microglia Response to Beta-Amyloid Stimulation. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 277.

Carmona, J. J., y Michan, S. (2016). Biology of Healthy Aging and Longevity. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 68(1), 7–16.

Carter, R. J., y Parsons, J. L. (2016). Base Excision Repair, a Pathway Regulated by Posttranslational Modifications. *Mol Cell Biol*, 36(10), 1426-1437.

Cefalu C. A. (2011). Theories and mechanisms of aging. *Clinics in geriatric medicine*, 27(4), 491–506.

Challet, E. (2019). The circadian regulation of food intake. *Nat Rev Endocrinol*, 15(7), 393-405.

Chang, I. Y., Lee, J. H., Kim, J. N., Lee, K. H., Park, K. S., and Yoon, S. P. (2015). Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 on aging-associated deteriorations in rat kidneys. *Free radical research*, 49(1), 95–101.

Chen, A. I., Zang, K., Masliah, E., y Reichardt, L. F. (2016). Glutamatergic axon-derived BDNF controls GABAergic synaptic differentiation in the cerebellum. *Scientific reports*, 6, 20201.

Chen, C. C., Gilmore, A., y Zuo, Y. (2014). Study motor skill learning by single-pellet reaching tasks in mice. *J Vis Exp* (85).

Choo, M., Miyazaki, T., Yamazaki, M., Kawamura, M., Nakazawa, T., Zhang, J., Tanimura, A., Uesaka, N., Watanabe, M., Sakimura, K., y Kano, M. (2017). Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum. *Nature communications*, 8(1), 195.

Coria-Lucero, C. D., Golini, R. S., Ponce, I. T., Deyurka, N., Anzulovich, A. C., Delgado, S. M., y Navigatore-Fonzo, L. S. (2016). Rhythmic Bdnf and TrkB expression patterns in the prefrontal cortex are lost in aged rats. *Brain research*, 1653, 51–58.

Cornelissen, G., y Otsuka, K. (2017). Chronobiology of Aging: A Mini-Review. *Gerontology*, 63(2), 118–128.

Crnko, S., Du Pré, B. C., Sluijter, J. P. G., y Van Laake, L. W. (2019). Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease. *16*(7), 437–447.

Cui, D., y Xu, X. (2018). DNA Methyltransferases, DNA Methylation, and Age-Associated Cognitive Function. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1315.

Cunha-Santos, J., Duarte-Neves, J., Carmona, V., Guarente, L., Pereira de Almeida, L., y Cavadas, C. (2016). Caloric restriction blocks neuropathology and motor deficits in Machado-Joseph disease mouse models through SIRT1 pathway. *Nature communications*, 7, 11445.

da Costa, J. P., Vitorino, R., Silva, G. M., Vogel, C., Duarte, A. C., and Rocha-Santos, T. (2016). A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev*, 29, 90-112.

D'Angelo E. (2018). Physiology of the cerebellum. *Handbook of clinical neurology*, 154, 85–108.

Daniel, M., y Tollefsbol, T. O. (2015). Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. *The Journal of experimental biology*, 218(Pt 1), 59–70.

Deibel, S. H., Zelinski, E. L., Keeley, R. J., Kovalchuk, O., y McDonald, R. J. (2015). Epigenetic alterations in the suprachiasmatic nucleus and hippocampus contribute to age-related cognitive decline. *Oncotarget*, 6(27), 23181–23203.

Dibner, C., Schibler, U., y Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, 72, 517-549.

Dolci, C., Montaruli, A., Roveda, E., Barajon, I., Vizzotto, L., Grassi Zucconi, G., y Carandente, F. (2003). Circadian variations in expression of the *trkB* receptor in adult rat hippocampus. *Brain research*, 994(1), 67–72.

Dong, E., Ruzicka, W. B., Grayson, D. R., y Guidotti, A. (2015). DNA-methyltransferase1 (DNMT1) binding to CpG rich GABAergic and BDNF promoters is increased in the brain of schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophrenia research*, 167(1-3), 35–41.

Duan, S., Han, X., Akbari, M., Croteau, D. L., Rasmussen, L. J., y Bohr, V. A. (2020). Interaction between RECQL4 and OGG1 promotes repair of oxidative base lesion 8-oxoG and is regulated by SIRT1 deacetylase. *Nucleic acids research*, 48(12), 6530–6546.

Duffy, J. F., y Czeisler, C. A. (2002). Age-related change in the relationship between circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans. *Neuroscience letters*, 318(3), 117–120.

Duffy, J. F., Zitting, K. M., y Chinoy, E. D. (2015). Aging and Circadian Rhythms. *Sleep medicine clinics*, 10(4), 423–434.

Duszka, K., y Wahli, W. (2020). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as Molecular Links between Caloric Restriction and Circadian Rhythm. *Nutrients*, 12(11), 3476.

Ebner T. J. (1998). A role for the cerebellum in the control of limb movement velocity. *Current opinion in neurobiology*, 8(6), 762–769.

England, R., y Pettersson, M. (2005). Pyro Q-CpG™: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®. *Nature Methods*, 2(10).

Everitt A. V. (1980). The neuroendocrine system and aging. *Gerontology*, 26(2), 108–119.

Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Chua, K. F., Mattson, M. P., Croteau, D. L., y Bohr, V. A. (2016). Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(5), 308-321.

Fasolino, M., Liu, S., Wang, Y., y Zhou, Z. (2017). Distinct cellular and molecular environments support aging-related DNA methylation changes in the substantia nigra. *Epigenomics*, 9(1), 21–31.

Fernandez, D. C., Fogerson, P. M., Lazzerini Ospri, L., Thomsen, M. B., Layne, R. M., Severin, D., Zhan, J., Singer, J. H., Kirkwood, A., Zhao, H., Berson, D. M., y Hattar, S. (2018). Light Affects Mood and Learning through Distinct Retina-Brain Pathways. *Cell*, 175(1), 71–84. e18.

Filip, P., Gallea, C., Lehericy, S., Lungu, O., y Bareš, M. (2019). Neural Scaffolding as the Foundation for Stable Performance of Aging Cerebellum. *Cerebellum (London, England)*, 18(3), 500–510.

Fontana, L., Nehme, J., y Demaria, M. (2018). Caloric restriction and cellular senescence. *Mechanisms of ageing and development*, 176, 19–23.

Fonzo, L. S., Golini, R. S., Delgado, S. M., Ponce, I. T., Bonomi, M. R., Rezza, I. G., Gimenez, M. S., y Anzulovich, A. C. (2009). Temporal patterns of lipoperoxidation and antioxidant enzymes are modified in the hippocampus of vitamin A-deficient rats. *Hippocampus*, 19(9), 869–880.

Fougère, B., Boulanger, E., Nourhashémi, F., Guyonnet, S., y Cesari, M. (2019). Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 72(9), 1218–1225. (Retraction published *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019 Feb 15;74(3):431).

Franzka, P., Krüger, L., Schurig, M. K., Olecka, M., Hoffmann, S., Blanchard, V., y Hübner, C. A. (2021). Altered Glycosylation in the Aging Heart. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 673044.

Froy, O., y Miskin, R. (2007). The interrelations among feeding, circadian rhythms and ageing. *Progress in neurobiology*, 82(3), 142–150.

Fustin, J. M., Ye, S., Rakers, C., Kaneko, K., Fukumoto, K., Yamano, M., Versteven, M., Grünewald, E., Cargill, S. J., Tamai, T. K., Xu, Y., Jabbur, M. L., Kojima, R., Lamberti, M. L., Yoshioka-Kobayashi, K., Whitmore, D., Tammam, S., Howell, P. L., Kageyama, R., Matsuo, T., Okamura, H. (2020). Publisher Correction: Methylation deficiency disrupts biological rhythms from bacteria to humans. *Communications biology*, 3(1), 295.

Gachon, F., y Firsov, D. (2011). The role of circadian timing system on drug metabolism and detoxification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 7(2), 147-158.

Gaddameedhi, S., Selby, C. P., Kaufmann, W. K., Smart, R. C., y Sancar, A. (2011). Control of skin cancer by the circadian rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), 18790–18795.

Galizia, C. Giovanni; Lledo, Pierre-Marie (2013). *Neurosciences - From Molecule to Behavior: a university textbook* || Circadian Timing. 10.1007/978-3-642-10769-6(Chapter 27), 609–627.

Gao, J., Wang, W. Y., Mao, Y. W., Gräff, J., Guan, J. S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S. C., y Tsai, L. H. (2010). A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature*, 466(7310), 1105–1109.

García Fernández, J. (1998). *Los ritmos biológicos y sus fundamentos neurales*. Síntesis, Madrid.

Gavin, D. P., Chase, K. A., y Sharma, R. P. (2013). Active DNA demethylation in post-mitotic neurons: a reason for optimism. *Neuropharmacology*, 75, 233-245.

Gavrila, A. M., Hood, S., Robinson, B., y Amir, S. (2017). Effects of bilateral anterior agranular insula lesions on food anticipatory activity in rats. *PloS one*, 12(6), e0179370.

Gensous, N., Franceschi, C., Santoro, A., Milazzo, M., Garagnani, P., y Bacalini, M. G. (2019). The Impact of Caloric Restriction on the Epigenetic Signatures of Aging. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 2022.

German, P., Saenz, D., Szaniszlo, P., Aguilera-Aguirre, L., Pan, L., Hegde, M. L., Bacsi, A., Hajas, G., Radak, Z., Ba, X., Mitra, S., Papaconstantinou, J., y Boldogh, I. (2017). 8-Oxoguanine DNA glycosylase1-driven DNA repair-A paradoxical role in lung aging. *Mechanisms of ageing and development*, 161(Pt A), 51–65.

Golini, R. S., Delgado, S. M., Navigatore Fonzo, L. S., Ponce, I. T., Lacoste, M. G., y Anzulovich, A. C. (2012). Daily patterns of clock and cognition-related factors are modified in the hippocampus of vitamin A-deficient rats. *Hippocampus*, 22(8), 1720–1732.

Golombek, D. (2007). *Métodos de análisis de los ritmos biológicos Cronobiología humana ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. Argentina: Universidad Nacional de Quilmes.

Gómez, O., Ballester-Lurbe, B., Poch, E., Mesonero, J. E., y Terrado, J. (2010). Developmental regulation of glucose transporters GLUT3, GLUT4 and GLUT8 in the mouse cerebellar cortex. *Journal of anatomy*, 217(5), 616–623.

Gomez-Pinilla, F., Zhuang, Y., Feng, J., Ying, Z., y Fan, G. (2011). Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *The European journal of neuroscience*, 33(3), 383–390.

Gredilla, R., Garm, C., y Stevnsner, T. (2012). Nuclear and mitochondrial DNA repair in selected eukaryotic aging model systems. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 282438.

Greenberg, M. V. C., y Bourc'his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(10), 590-607.

Griffin, E. A., Jr, Staknis, D., y Weitz, C. J. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, 286(5440), 768-771.

Guadarrama-Ortiz, P., Ramírez-Aguilar, R., Madrid-Sánchez, A., Castillo-Rangel, C., Carrasco-Alcántara, D., y Aguilar-Roblero, R. (2014). Controladores del

Tiempo y el Envejecimiento: Núcleo Supraquiasmático y Glándula Pineal. *International Journal of Morphology*, 32, 409–414.

Guissoni Campos, L. M., Hataka, A., Vieira, I. Z., Buchaim, R. L., Robalinho, I. F., Arantes, G., Viégas, J. S., Bosso, H., Bravos, R. M., y Pinato, L. (2018). Circadian Clock Proteins and Melatonin Receptors in Neurons and Glia of the *Sapajus apella* Cerebellum. *Frontiers in physiology*, 9, 5.

Hadad, N., Unnikrishnan, A., Jackson, J. A., Masser, D. R., Otalora, L., Stanford, D. R., Richardson, A., y Freeman, W. M. (2018). Caloric restriction mitigates age-associated hippocampal differential CG and non-CG methylation. *Neurobiology of aging*, 67, 53–66.

Harman D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, 20(4), 145–147.

Harms, E., Kivimae, S., Young, M. W., y Saez, L. (2004). Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *J Biol Rhythms*, 19(5), 361-373.

Hastings, M. H., Reddy, A. B., y Maywood, E. S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, 4(8), 649-661.

Haus, E., Lakatua, D. J., y Sackett-Lundeen, L. (1997). Circannual variation of cell proliferation in lymphoid organs and bone marrow of BDF1 male mice on three lighting regimens. *Chronobiol Int*, 14(4), 347-362.

Hearn, J., Pearson, M., Blaxter, M., Wilson, P. J., y Little, T. J. (2019). Genome-wide methylation is modified by caloric restriction in *Daphnia magna*. *BMC genomics*, 20(1), 197.

Hinz, J. M., y Czaja, W. (2015). Facilitation of base excision repair by chromatin remodeling. *DNA Repair (Amst)*, 36, 91-97.

Hirayama, J., y Sassone-Corsi, P. (2005). Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. *Curr Opin Genet Dev*, 15(5), 548-556.

Hofman, M. A., y Swaab, D. F. (2006). Living by the clock: the circadian pacemaker in older people. *Ageing research reviews*, 5(1), 33–51.

Honma, S., Ikeda, M., Abe, H., Tanahashi, Y., Namihira, M., Honma, K., y Nomura, M. (1998). Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochemical and biophysical research communications*, 250(1), 83–87.

Hood, S., y Amir, S. (2017). The aging clock: circadian rhythms and later life. *The Journal of clinical investigation*, 127(2), 437–446.

Huang, Y. T., Maccani, J., Hawley, N. L., Wing, R. R., Kelsey, K. T., y McCaffery, J. M. (2015). Epigenetic patterns in successful weight loss maintainers: a pilot study. *International journal of obesity (2005)*, 39(5), 865–868.

Hu, L., Wang, Z., Carmone, C., Keijer, J., y Zhang, D. (2021). Role of Oxidative DNA Damage and Repair in Atrial Fibrillation and Ischemic Heart Disease. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3838.

Imam, S. Z., Karahalil, B., Hogue, B. A., Souza-Pinto, N. C., y Bohr, V. A. (2006). Mitochondrial and nuclear DNA-repair capacity of various brain regions in mouse is altered in an age-dependent manner. *Neurobiology of aging*, 27(8), 1129–1136.

Iyama, T., y Wilson, D. M., 3rd. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, 12(8), 620-636.

Izquierdo, V., Palomera-Ávalos, V., Pallàs, M., y Griñán-Ferré, C. (2021). Resveratrol Supplementation Attenuates Cognitive and Molecular Alterations under Maternal High-Fat Diet Intake: Epigenetic Inheritance over Generations. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1453.

Jackson, F. R., Ng, F. S., Sengupta, S., You, S., y Huang, Y. (2015). Glial cell regulation of rhythmic behavior. *Methods Enzymol*, 552, 45-73.

Jagannath, A., Taylor, L., Wakaf, Z., Vasudevan, S. R., y Foster, R. G. (2017). The genetics of circadian rhythms, sleep and health. *Hum Mol Genet*, 26(R2), R128-R138.

Jin, W., Lee, J. J., Kim, M. S., Son, B. H., Cho, Y. K., y Kim, H. P. (2011). DNA methylation-dependent regulation of TrkA, TrkB, and TrkC genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 406(1), 89–95.

Johnson, A. A., Shokhirev, M. N., y Shoshitaishvili, B. (2019). Revamping the evolutionary theories of aging. *Ageing Res Rev*, 55, 100947.

Johnson, R. A., y Mitchell, G. S. (2003). Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain. *Brain research*, 983(1-2), 108–114.

Jud, C., Schmutz, I., Hampp, G., Oster, H., y Albrecht, U. (2005). A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biol Proced Online*, 7, 101-116.

Kafka, M. S., Marangos, P. J., y Moore, R. Y. (1985). Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Brain Res*, 327(1-2), 344-347.

Kang, T. H., Reardon, J. T., Kemp, M., y Sancar, A. (2009). Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2864–2867.

Kaptan, Z., Akgün-Dar, K., Kapucu, A., Dedeakayoğulları, H., Batu, Ş., y Üzümlü, G. (2015). Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal and prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN and cell proliferation in dentate gyrus. *Brain research*, 1618, 194–204.

Karpova, N. N., Rantamäki, T., Di Lieto, A., Lindemann, L., Hoener, M. C., y Castrén, E. (2010). Darkness reduces BDNF expression in the visual cortex and induces repressive chromatin remodeling at the BDNF gene in both hippocampus and visual cortex. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(7), 1117–1123.

Kennard, J. A., Brown, K. L., y Woodruff-Pak, D. S. (2013). Aging in the cerebellum and hippocampus and associated behaviors over the adult life span of CB6F1 mice. *Neuroscience*, 247, 335–350.

Khan, S. S., Singer, B. D., y Vaughan, D. E. (2017). Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell*, 16(4), 624-633.

Khobta, A., y Epe, B. (2013). Repair of oxidatively generated DNA damage in Cockayne syndrome. *Mech Ageing Dev*, 134(5-6), 253-260.

Kimura, H., Dong, X., Yagita, K., y Okamura, H. (2003). Brain expression of apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/Ref-1) multifunctional DNA repair enzyme gene in the mouse with special reference to the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience research*, 46(4), 443–452.

Kisby, G. E., Kohama, S. G., Olivas, A., Churchwell, M., Doerge, D., Spangler, E., de Cabo, R., Ingram, D. K., Imhof, B., Bao, G., y Kow, Y. W. (2010). Effect of caloric restriction on base-excision repair (BER) in the aging rat brain. *Experimental gerontology*, 45(3), 208–216.

Kishi, T., Hirooka, Y., Nagayama, T., Isegawa, K., Katsuki, M., Takesue, K., y Sunagawa, K. (2015). Calorie restriction improves cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor: tropomyosin-related kinase B in hippocampus of obesity-induced hypertensive rats. *International heart journal*, 56(1), 110–115.

Klein, A., y Dunnett, S. B. (2012). Analysis of skilled forelimb movement in rats: the single pellet reaching test and staircase test. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8, Unit 8 28.

Koziol, L. F., Budding, D., Andreasen, N., D'Arrigo, S., Bulgheroni, S., Imamizu, H., Ito, M., Manto, M., Marvel, C., Parker, K., Pezzulo, G., Ramnani, N., Riva, D., Schmahmann, J., Vandervert, L., y Yamazaki, T. (2014). Consensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition. *Cerebellum* (London, England), 13(1), 151–177.

Krokan, H. E., y Bjoras, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a012583.

Kukkemane, K., y Jagota, A. (2019). Therapeutic effects of curcumin on age-induced alterations in daily rhythms of clock genes and Sirt1 expression in the SCN of male Wistar rats. *Biogerontology*, 20(4), 405–419.

Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98(2), 193-205.

Kwon, I., Choe, H. K., Son, G. H., y Kim, K. (2011). Mammalian molecular clocks. *Exp Neurobiol*, 20(1), 18-28.

Lacoste, M. G., Ponce, I. T., Golini, R. L., Delgado, S. M., y Anzulovich, A. C. (2017). Aging modifies daily variation of antioxidant enzymes and oxidative status in the hippocampus. *Experimental gerontology*, 88, 42–50.

Langie, S. A., Cameron, K. M., Ficz, G., Oxley, D., Tomaszewski, B., Gorniak, J. P., Mathers, J. C. (2017). The Ageing Brain: Effects on DNA Repair and DNA Methylation in Mice. *Genes (Basel)*, 8(2).

Lardenoije, R., van den Hove, D., Vaessen, T., Iatrou, A., Meuwissen, K., van Hagen, B., Kenis, G., Steinbusch, H., Schmitz, C., y Rutten, B. (2015). Epigenetic modifications in mouse cerebellar Purkinje cells: effects of aging, caloric restriction, and overexpression of superoxide dismutase 1 on 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Neurobiology of aging*, 36(11), 3079–3089.

Leak, R. K., y Moore, R. Y. (2001). Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol*, 433(3), 312-334.

Ledezma, C., Coria-Lucero, C., Delsouc, M. B., Casais, M., Della Vedova, C., Ramirez, D., Devia, C. M., Delgado, S. M., Navigatore-Fonzo, L., y Anzulovich, A. C. (2021). Effect of an Intracerebroventricular Injection of Aggregated Beta-amyloid (1-42) on Daily Rhythms of Oxidative Stress Parameters in the Prefrontal Cortex. *Neuroscience*, 458, 99–107.

Lee, M., Cho, H. S., Yoon, K. J., Lee, W., y Moon, H. Y. (2020). Exercise-induced changes of gene expression in the cerebellum of aged mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 521(4), 952–956.

Li, M., Yang, X., Lu, X., Dai, N., Zhang, S., Cheng, Y., Wilson, D. M., 3rd. (2018). APE1 deficiency promotes cellular senescence and premature aging features. *Nucleic Acids Res*, 46(11), 5664-5677.

Li, S., Shui, K., Zhang, Y., Lv, Y., Deng, W., Ullah, S., Zhang, L., y Xue, Y. (2017). CGDB: a database of circadian genes in eukaryotes. *Nucleic acids research*, 45(D1), D397–D403.

Li, Y., Peng, C., Guo, X., You, J. J., y Yadav, H. P. (2015). Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor and Tyrosine Kinase B in Cerebellum of Poststroke Depression Rat Model. *Chinese medical journal*, 128(21), 2926–2931.

Liang, K. J., y Carlson, E. S. (2020). Resistance, vulnerability and resilience: A review of the cognitive cerebellum in aging and neurodegenerative diseases. *Neurobiology of learning and memory*, 170, 106981.

Limpose, K. L., Corbett, A. H., y Doetsch, P. W. (2017). BERING the burden of damage: Pathway crosstalk and posttranslational modification of base excision repair proteins regulate DNA damage management. *DNA Repair (Amst)*, 56, 51-64.

Liu, C., y Chung, M. (2015). Genetics and epigenetics of circadian rhythms and their potential roles in neuropsychiatric disorders. *Neuroscience bulletin*, 31(1), 141–159.

Liu, X. S., Wu, H., Ji, X., Stelzer, Y., Wu, X., Czauderna, S., Jaenisch, R. (2016). Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*, 167(1), 233-247.e217.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.

Luong, T. N., Carlisle, H. J., Southwell, A., y Patterson, P. H. (2011). Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp* (49).

Ma, S., Sun, S., Geng, L., Song, M., Wang, W., Ye, Y., Ji, Q., Zou, Z., Wang, S., He, X., Li, W., Esteban, C. R., Long, X., Guo, G., Chan, P., Zhou, Q., Belmonte, J., Zhang, W., Qu, J., y Liu, G. H. (2020). Caloric Restriction Reprograms the Single-Cell Transcriptional Landscape of *Rattus Norvegicus* Aging. *Cell*, 180(5), 984–1001.e22.

Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Hofer, S. J., y Kroemer, G. (2019). Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell metabolism*, 29(3), 592–610.

Manoogian, E., y Panda, S. (2017). Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. *Ageing research reviews*, 39, 59–67.

Manzella, N., Bracci, M., Strafella, E., Staffolani, S., Ciarapica, V., Copertaro, A., Rapisarda, V., Ledda, C., Amati, M., Valentino, M., Tomasetti, M., Stevens, R. G., y

Santarelli, L. (2015). Circadian Modulation of 8-Oxoguanine DNA Damage Repair. *Scientific reports*, 5, 13752.

Masoro E. J. (2000). Caloric restriction and aging: an update. *Experimental gerontology*, 35(3), 299–305.

Maswood, N., Young, J., Tilmont, E., Zhang, Z., Gash, D. M., Gerhardt, G. A., Grondin, R., Roth, G. S., Mattison, J., Lane, M. A., Carson, R. E., Cohen, R. M., Mouton, P. R., Quigley, C., Mattson, M. P., y Ingram, D. K. (2004). Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(52), 18171–18176.

Mattson, M. P., Duan, W., Lee, J., y Guo, Z. (2001). Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mechanisms of ageing and development*, 122(7), 757–778.

Maynard, S., Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Croteau, D. L., y Bohr, V. A. (2015). DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(10).

Mazzoccoli, G., Paziienza, V., y Vinciguerra, M. (2012). Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. *Chronobiol Int*, 29(3), 227-251.

Meijer, J. H., y Rietveld, W. J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev*, 69(3), 671-707.

Mencio-Wszalek, T., Ramirez, V. D., y Dluzen, D. E. (1992). Age-dependent changes in olfactory-mediated behavioral investigations in the male rat. *Behavioral and neural biology*, 57(3), 205–212.

Mendoza, J., Pévet, P., Felder-Schmittbuhl, M. P., Bailly, Y., y Challet, E. (2010). The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(5), 1894–1904.

Mensà, E., Guescini, M., Giuliani, A., Bacalini, M. G., Ramini, D., Corleone, G., Ferracin, M., Fulgenzi, G., Graciotti, L., Prattichizzo, F., Sorci, L., Battistelli, M., Monsurrò, V., Bonfigli, A. R., Cardelli, M., Recchioni, R., Marcheselli, F., Latini, S., Maggio, S., Fanelli, M., Olivieri, F. (2020). Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells. *Journal of extracellular vesicles*, 9(1), 1725285.

Mistlberger R. E. (1994). Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 18(2), 171–195.

Mohamed, E. A., y Sayed, W. M. (2020). Implication of JAK1/STAT3/SOCS3 Pathway in Aging of Cerebellum of Male Rat: Histological and Molecular study. *Scientific reports*, 10(1), 8840.

Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B., y Terentiev, A. A. (2019). Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 3085756.

Monk, T. H., y Kupfer, D. J. (2000). Circadian rhythms in healthy aging--effects downstream from the pacemaker. *Chronobiol Int*, 17(3), 355-368.

Moore, R. Y. (1999). A clock for the ages. *Science*, 284(5423), 2102-2103.

Moore, R. Y., y Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42(1), 201-206.

Morgan, A. E., Davies, T. J., y Mc Auley, M. T. (2018). The role of DNA methylation in ageing and cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 77(4), 412–422.

Morin, L. P. (2013). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp Neurol*, 243, 4-20.

Moyse, E., Arsenault, M., Gaudreau, P., Ferland, G., y Ramassamy, C. (2019). Brain region-specific effects of long-term caloric restriction on redox balance of the aging rat. *Mechanisms of ageing and development*, 179, 51–59.

Nagao S. (2021). Ocular Reflex Adaptation as an Experimental Model of Cerebellar Learning In Memory of Masao Ito -. *Neuroscience*, 462, 191–204.

Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., y Sassone-Corsi, P. (2009). Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5927), 654–657

Navigatore-Fonzo, L., Castro, A., Pignataro, V., Garraza, M., Casais, M., y Anzulovich, A. C. (2017). Daily rhythms of cognition-related factors are modified in an experimental model of Alzheimer's disease. *Brain research*, 1660, 27–35.

Newton, I. G., Forbes, M. E., Legault, C., Johnson, J. E., Brunso-Bechtold, J. K., y Riddle, D. R. (2005). Caloric restriction does not reverse aging-related changes in hippocampal BDNF. *Neurobiology of aging*, 26(5), 683–688.

Nie, B., Gan, W., Shi, F., Hu, G. X., Chen, L. G., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., and Cai, J. P. (2013). Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 303181.

Oh, G., Koncevičius, K., Ebrahimi, S., Carlucci, M., Groot, D. E., Nair, A., Zhang, A., Kriščiūnas, A., Oh, E. S., Labrie, V., Wong, A., Gordevičius, J., Jia, P., Susic, M., & Petronis, A. (2019). Circadian oscillations of cytosine modification in humans contribute to epigenetic variability, aging, and complex disease. *Genome biology*, 20(1), 2.

Oishi, K., Shirai, H., y Ishida, N. (2005). CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *The Biochemical journal*, 386(Pt 3), 575–581.

Orozco-Solis, R., y Sassone-Corsi, P. (2014). Circadian clock: linking epigenetics to aging. *Current opinion in genetics and development*, 26, 66–72.

Osum, M., y Serakinci, N. (2020). Impact of circadian disruption on health; SIRT1 and Telomeres. *DNA repair*, 96, 102993.

Palomer, E., Martín-Segura, A., Baliyan, S., Ahmed, T., Balschun, D., Venero, C., Martin, M. G., y Dotti, C. G. (2016). Aging Triggers a Repressive Chromatin State at *Bdnf* Promoters in Hippocampal Neurons. *Cell reports*, 16(11), 2889–2900.

Pan, L., Hao, W., Zheng, X., Zeng, X., Ahmed Abbasi, A., Boldogh, I., y Ba, X. (2017). OGG1-DNA interactions facilitate NF- κ B binding to DNA targets. *Sci Rep*, 7, 43297.

Panda, S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science*, 354(6315), 1008-1015.

Paredes, J. F., Lopez-Olmeda, J. F., Muñoz-Cueto, J. A., y Sánchez-Vázquez, F. (2018). Circadian expression of DNA methylation and demethylation genes in zebrafish gonads. *Chronobiology international*, 35(7), 920–932.

Partch, C. L., Green, C. B., y Takahashi, J. S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol*, 24(2), 90-99.

Patel, S. A., Chaudhari, A., Gupta, R., Velingkaar, N., y Kondratov, R. V. (2016). Circadian clocks govern calorie restriction-mediated life span extension through BMAL1- and IGF-1-dependent mechanisms. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(4), 1634–1642.

Peng, L., Yuan, Z., Ling, H., Fukasawa, K., Robertson, K., Olashaw, N., Koomen, J., Chen, J., Lane, W. S., y Seto, E. (2011). SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Molecular and cellular biology*, 31(23), 4720–4734.

Pfeffer, M., Korf, H. W., y Wicht, H. (2018). Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms. *Gen Comp Endocrinol*, 258, 215-221.

Phillips, P. M., Jarema, K. A., Kurtz, D. M., y MacPhail, R. C. (2010). An observational assessment method for aging laboratory rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 49(6), 792–799.

Pifferi, F., y Aujard, F. (2019). Caloric restriction, longevity and aging: Recent contributions from human and non-human primate studies. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 95, 109702.

Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*, 55, 16-54.

Plumel, M., Dumont, S., Maes, P., Sandu, C., Felder-Schmittbuhl, M. P., Challet, E., y Bertile, F. (2019). Circadian Analysis of the Mouse Cerebellum Proteome. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1852.

Poggiogalle, E., Jamshed, H., y Peterson, C. M. (2018). Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. *Metabolism*, 84, 11-27.

Pollock, G. S., Vernon, E., Forbes, M. E., Yan, Q., Ma, Y. T., Hsieh, T., Robichon, R., Frost, D. O., y Johnson, J. E. (2001). Effects of early visual experience and diurnal rhythms on BDNF mRNA and protein levels in the visual system, hippocampus, and cerebellum. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(11), 3923-3931.

Portero-Tresserra, M., Rojic-Becker, D., Vega-Carbajal, C., Guillazo-Blanch, G., Vale-Martínez, A., y Martí-Nicolovius, M. (2020). Caloric restriction modulates the monoaminergic system and metabolic hormones in aged rats. *Scientific reports*, 10(1), 19299.

Power, S. C., y Mistlberger, R. E. (2020). Food anticipatory circadian rhythms in mice entrained to long or short day photoperiods. *Physiology and behavior*, 222, 112939.

Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., y Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110(2), 251-260.

Prolla T. A. (2002). DNA microarray analysis of the aging brain. *Chemical senses*, 27(3), 299-306.

Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., y Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247(4945), 975-978.

Refinetti, R., Lissen, G. C., y Halberg, F. (2007). Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res*, 38(4), 275-325.

Reid, K. J., y Abbott, S. M. (2015). Jet Lag and Shift Work Disorder. *Sleep Med Clin*, 10(4), 523-535.

Rickert, E., Fernandez, M. O., Choi, I., Gorman, M., Olefsky, J. M., y Webster, N. (2018). Neuronal SIRT1 Regulates Metabolic and Reproductive Function and the Response to Caloric Restriction. *Journal of the Endocrine Society*, 3(2), 427–445.

Rijo-Ferreira, F., y Takahashi, J. S. (2019). Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome medicine*, 11(1), 82.

Rodrigues, A. F., Biasibetti, H., Zanotto, B. S., Sanches, E. F., Schmitz, F., Nunes, V. T., Pierozan, P., Manfredini, V., Magro, D., Netto, C. A., y Wyse, A. (2017). D-Galactose Causes Motor Coordination Impairment, and Histological and Biochemical Changes in the Cerebellum of Rats. *Molecular neurobiology*, 54(6), 4127–4137.

Roenneberg, T., Pilz, L. K., Zerbini, G., y Winnebeck, E. C. (2019). Chronotype and Social Jetlag: A (Self-) Critical Review. *Biology*, 8(3), 54.

Rusak, B., y Bina, K. G. (1990). Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu Rev Neurosci*, 13, 387-401.

Saavedra Torres, S., Zúñiga Cerón, J., Cerón, L., Zúñiga, N., y Vásquez-López, A. (2013). Circadian rhythm: the master clock. Alterations involving the state of sleep and wakefulness in the area of health. *Morfolia*, 5. (3).

Sampath, H., y Lloyd, R. S. (2019). Roles of OGG1 in transcriptional regulation and maintenance of metabolic homeostasis. *DNA Repair (Amst)*, 81, 102667.

Sarga, L., Hart, N., Koch, L. G., Britton, S. L., Hajas, G., Boldogh, I., Ba, X., y Radak, Z. (2013). Aerobic endurance capacity affects spatial memory and SIRT1 is a potent modulator of 8-oxoguanine repair. *Neuroscience*, 252, 326–336.

Sassa, A., Çağlayan, M., Dyrkheeva, N. S., Beard, W. A., y Wilson, S. H. (2014). Base excision repair of tandem modifications in a methylated CpG dinucleotide. *The Journal of biological chemistry*, 289(20), 13996–14008.

Sato, S., Solanas, G., Peixoto, F. O., Bee, L., Symeonidi, A., Schmidt, M. S., Brenner, C., Masri, S., Benitah, S. A., y Sassone-Corsi, P. (2017). Circadian Reprogramming in the Liver Identifies Metabolic Pathways of Aging. *Cell*, 170(4), 664–677.e11.

Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), 527-537.

Schibler, U., Gotic, I., Saini, C., Gos, P., Curie, T., Emmenegger, Y., Franken, P. (2015). Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 80, 223-232.

Schibler, U., y Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell*, 111(7), 919-922.

Schuermann, D., Weber, A. R., y Schar, P. (2016). Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair (Amst)*, 44, 92-102.

Semba, R. D., Gonzalez-Freire, M., Moaddel, R., Sun, K., Fabbri, E., Zhang, P., Carlson, O. D., Khadeer, M., Chia, C. W., Salem, N., Jr, y Ferrucci, L. (2018). Altered plasma amino acids and lipids associated with abnormal glucose metabolism and insulin resistance in older adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 103(9), 3331-3339.

Shadmehr, R., y Krakauer, J. W. (2008). A computational neuroanatomy for motor control. *Experimental brain research*, 185(3), 359-381.

Shental-Bechor, D., y Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(24), 8256-8261.

Sherratt, M. J., Hopkinson, L., Naven, M., Hibbert, S. A., Ozols, M., Eckersley, A., Meng, Q. J. (2019). Circadian rhythms in skin and other elastic tissues. *Matrix Biol*, 84, 97-110.

Shibata, S., Minamoto, Y., Ono, M., y Watanabe, S. (1994). Age-related impairment of food anticipatory locomotor activity in rats. *Physiology and behavior*, 55(5), 875-878.

Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., Takahashi, R., Kitazawa, S., y Hattori, N. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of neuroscience methods*, 189(2), 180-185.

Smith, L. K., y Metz, G. A. (2005). Dietary restriction alters fine motor function in rats. *Physiology and behavior*, 85(5), 581–592.

Smolensky, M. H., Hermida, R. C., Reinberg, A., Sackett-Lundeen, L., y Portaluppi, F. (2016). Circadian disruption: New clinical perspective of disease pathology and basis for chronotherapeutic intervention. *Chronobiol Int*, 33(8), 1101-1119.

Sohal, R. S., Agarwal, S., y Sohal, B. H. (1995). Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Mechanisms of ageing and development*, 81(1), 15–25.

Sollars, P. J., y Pickard, G. E. (2015). The Neurobiology of Circadian Rhythms. *Psychiatr Clin North Am*, 38(4), 645-665.

Spiers, H., Hannon, E., Wells, S., Williams, B., Fernandes, C., y Mill, J. (2016). Age-associated changes in DNA methylation across multiple tissues in an inbred mouse model. *Mechanisms of ageing and development*, 154, 20–23.

Stuart, J. A., Karahalil, B., Hogue, B. A., Souza-Pinto, N. C., y Bohr, V. A. (2004). Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(3), 595–597.

Sun, Z. F., Gao, X., Pinto, J. M., He, Y., Yang, Q., Tian, J., Wei, Y. X. (2018). Morphological evaluation using MRI of the olfactory filaments (fila) in a post-traumatic olfactory rat model. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 4(1), 50-56.

Swain, U., y Rao, K. S. (2012). Age-dependent decline of DNA base excision repair activity in rat cortical neurons. *Mechanisms of ageing and development*, 133(4), 186–194.

Swain, U., y Subba Rao, K. (2011). Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mechanisms of ageing and development*, 132(8-9), 374–381.

Swartzlander, D. B., Bauer, N. C., Corbett, A. H., y Doetsch, P. W. (2012). Regulation of base excision repair in eukaryotes by dynamic localization strategies. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 110, 93-121.

Sweatt, J. D., Nestler, E. J., Meaney, M. J., y Akbarian, S. (2013). Chapter 1 - An Overview of the Molecular Basis of Epigenetics. In J. D. Sweatt, M. J. Meaney, E. J. Nestler and S. Akbarian (Eds.), *Epigenetic Regulation in the Nervous System* (pp. 3-33). San Diego: Academic Press.

Sykora, P., Wilson, D. M., 3rd, y Bohr, V. A. (2013). Base excision repair in the mammalian brain: implication for age related neurodegeneration. *Mechanisms of ageing and development*, 134(10), 440-448.

Takahashi, M., Tahara, Y., Tsubosaka, M., Fukazawa, M., Ozaki, M., Iwakami, T., Shibata, S. (2018). Chronotype and social jetlag influence human circadian clock gene expression. *Sci Rep*, 8(1), 10152.

Teixeira, I. N., y Guariento, M. E. (2010). *Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas [Biology of aging: theories, mechanisms, and perspectives]*. *Ciencia and saude coletiva*, 15(6), 2845-2857.

Terman A. (2001). Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage? *Redox report: communications in free radical research*, 6(1), 15-26.

Thaela, M. J., Jensen, M. S., Cornelissen, G., Halberg, F., Noddegaard, F., Jakobsen, K., y Pierzynowski, S. G. (1998). Circadian and ultradian variation in pancreatic secretion of meal-fed pigs after weaning. *J Anim Sci*, 76(4), 1131-1139.

Tong, L., Thornton, P. L., Balazs, R., y Cotman, C. W. (2001). Beta -amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. *The Journal of biological chemistry*, 276(20), 17301-17306.

Toni, R., Malaguti, A., Benfenati, F., y Martini, L. (2004). The human hypothalamus: a morpho-functional perspective. *Journal of endocrinological investigation*, 27(6 Suppl), 73-94.

Tonini, C., Segatto, M., Martino, F., Cigliano, L., Nazzaro, M., Barberio, L., Mandalà, M., y Pallottini, V. (2021). Effects of Late-Life Caloric Restriction on Age-Related Alterations in the Rat Cortex and Hippocampus. *Nutrients*, 13(1), 232.

Torregrosa-Muñumer, R., Gómez, A., Vara, E., Kireev, R., Barja, G., Tresguerres, J. A., y Gredilla, R. (2016). Reduced apurinic/aprimidinic endonuclease 1 activity and increased DNA damage in mitochondria are related to enhanced apoptosis and inflammation in the brain of senescence-accelerated P8 mice (SAMP8). *Biogerontology*, 17(2), 325–335.

Trott, A. J., y Menet, J. S. (2018). Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK: BMAL1. *PLoS Genet*, 14(1), e1007156.

Tsai, S. F., Ku, N. W., Wang, T. F., Yang, Y. H., Shih, Y. H., Wu, S. Y., Lee, C. W., Yu, M., Yang, T. T., y Kuo, Y. M. (2018). Long-Term Moderate Exercise Rescues Age-Related Decline in Hippocampal Neuronal Complexity and Memory. *Gerontology*, 64(6), 551–561.

Tsunoda, T., & Takagi, T. (1999). Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(7-8), 622–630.

Urakawa, S., Hida, H., Masuda, T., Misumi, S., Kim, T. S., y Nishino, H. (2007). Environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of doublecortin-positive cells following striatal lesions in rats. *Neuroscience*, 144(3), 920-933.

Wahl, D., Solon-Biet, S. M., Wang, Q. P., Wali, J. A., Pulpitel, T., Clark, X., Raubenheimer, D., Senior, A. M., Sinclair, D. A., Cooney, G. J., de Cabo, R., Cogger, V. C., Simpson, S. J., y Le Couteur, D. G. (2018). Comparing the Effects of Low-Protein and High-Carbohydrate Diets and Caloric Restriction on Brain Aging in Mice. *Cell reports*, 25(8), 2234–2243.e6.

Wakeling, L. A., Ions, L. J., Escolme, S. M., Cockell, S. J., Su, T., Dey, M., Hampton, E. V., Jenkins, G., Wainwright, L. J., McKay, J. A., y Ford, D. (2015). SIRT1 affects DNA methylation of polycomb group protein target genes, a hotspot of the epigenetic shift observed in ageing. *Human genomics*, 9(1), 14.

Wallace, S. S. (2014). Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst)*, 19, 14-26.

Walsh, R. N., y Cummins, R. A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychological bulletin*, 83(3), 482-504.

Wang, R., Hao, W., Pan, L., Boldogh, I., y Ba, X. (2018). The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression. *Cell Mol Life Sci*, 75(20), 3741-3750.

Wang, R., Zhou, Z., Wang, D., Zhao, Q., Zhang, C., Liu, C., Zhao, H., Yuan, C., Yuan, D., y Wang, T., (2021). Caloric restriction ameliorates high-fat diet induced cognitive deficits through attenuating neuroinflammation via the TREM2-PI3K/AKT signaling pathway. *Food and function*, 12(14), 6464-6478.

Watson, T. C., Obiang, P., Torres-Herraez, A., Watilliaux, A., Coulon, P., Rochefort, C., y Rondi-Reig, L. (2019). Anatomical and physiological foundations of cerebello-hippocampal interaction. *eLife*, 8, e41896.

Weinert D. (2000). Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiology international*, 17(3), 261-283.

Wingender, E., Dietze, P., Karas, H., & Knüppel, R. (1996). TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic acids research*, 24(1), 238-241.

Wirz-Justice, A., Skene, D. J., y Münch, M. (2021). The relevance of daylight for humans. *Biochemical pharmacology*, 191, 114304.

Xu, J., Jackson, C. W., Khoury, N., Escobar, I., y Perez-Pinzon, M. A. (2018). Brain SIRT1 Mediates Metabolic Homeostasis and Neuroprotection. *Frontiers in endocrinology*, 9, 702.

Yamamori, T., DeRicco, J., Naqvi, A., Hoffman, T. A., Mattagajasingh, I., Kasuno, K., Irani, K. (2010). SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Res*, 38(3), 832-845.

Yang, J. L., Lin, Y. T., Chuang, P. C., Bohr, V. A., y Mattson, M. P. (2014). BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated

production of apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *Neuromolecular medicine*, 16(1), 161–174.

Yang, M., y Crawley, J. N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8, Unit 8 24.

Ye, J., He, J. P., y Liu, Z. J. (2014). Olfactory mucosal microstructural changes in a rat model of acute rhinosinusitis with dysosmia. *Genetics and molecular research: GMR*, 13(2), 3859–3868.

Yoon, I. Y., Kripke, D. F., Elliott, J. A., Youngstedt, S. D., Rex, K. M., y Hauger, R. L. (2003). Age-related changes of circadian rhythms and sleep-wake cycles. *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(8), 1085–1091.

Zhang, X., Meng, X., Chen, Y., Leng, S. X., y Zhang, H. (2017). The Biology of Aging and Cancer: Frailty, Inflammation, and Immunity. *Cancer J*, 23(4), 201–205.

Zhou, B., Zhang, Y., Zhang, F., Xia, Y., Liu, J., Huang, R., Wang, Y., Hu, Y., Wu, J., Dai, C., Wang, H., Tu, Y., Peng, X., Wang, Y., y Zhai, Q. (2014). CLOCK/BMAL1 regula el cambio circadiano de la sensibilidad hepática a la insulina en ratón por SIRT1. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59(6), 2196–2206.

Zhu, J. N., Li, H. Z., Ding, Y., y Wang, J. J. (2006). Cerebellar modulation of feeding-related neurons in rat dorsomedial hypothalamic nucleus. *Journal of neuroscience research*, 84(7), 1597–1609.

Zimmerman, M., y Hummel, F. C. (2010). Non-invasive brain stimulation: enhancing motor and cognitive functions in healthy old subjects. *Frontiers in aging neuroscience*, 2, 149.

Zinovkina, L. A. (2018). Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. *Biochemistry (Mosc)*, 83(3), 233–249.

Zuther y Gorbey P, Stefan y Lemmer, B. (2009). Chronos-Fit, revised Version 1. 06.