



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Dr. Hans G. Richter**  
Instituto de Histología y Patología  
Facultad de Medicina

**PATRON CIRCADIANO DE EXPRESION DE GENES RELOJ  
EN GLANDULA ADRENAL DE RATA**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**LORENA ALEJANDRA ABARZUA CATALAN**

**VALDIVIA – CHILE**

**2007**

**Esta Tesis fue realizada en el Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, y fue financiada a través de subsidios otorgados por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile (DID-UACH S200433) y el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (proyecto FONDECYT 1050386), a nuestro grupo de trabajo.**

**El procedimiento de qPCR presentado en esta Tesis fue realizado bajo la supervisión del Dr Germán E. Rehren (Instituto de Bioquímica de nuestra Universidad).**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Mis más sinceros agradecimientos a :*

A mis profesores patrocinantes Dr Hans G. Richter y Dra Claudia Torres-Farfán por los conocimientos entregados durante el desarrollo de la Tesis, por su apoyo constante y su confianza.

A mis queridos compañeros de laboratorio, Fernando Gaete y Jocelyn García, por toda la ayuda prestada durante el periodo de trabajo, por tener siempre una sonrisa y una palabra de aliento en los momentos difíciles. Gracias por su ayuda constante y desinteresada, junto con hacer mucho mas grata la estadía en el laboratorio.

A Don Genaro Alvial por enseñarme generosamente el uso de técnicas histológicas y por su disposición constante para ayudarme.

A Francisca Pavicic (BQ), Carola Matus (BQ) y la Dra. Pamela Ehrenfeld por sus buenas ideas, consejos y disposición a ayudarme cada vez que lo necesitase.

*A Elena, mi madre y Lucila, mi tía, quienes me han apoyado incondicionalmente todo estos años. Gracias por todo su amor, sus valores, comprensión y entrega. Gracias por apoyar la decisión de estudiar esta carrera.*

*A Daniel, mi novio, por todo su amor, paciencia y comprensión frente a las exigencias de esta carrera. Gracias por estar siempre conmigo, por creer en mí y alentarme día a día para ser mejor en lo que hago.*

*Gracias a Dios por todas sus bendiciones.*

**INDICE DE CONTENIDOS**

	Página
<b>1 RESUMEN</b>	1
1.1 ABSTRACT	2
<b>2 INTRODUCCION</b>	3
<b>3 MATERIALES Y METODOS</b>	20
3.1 Animales	20
3.2 Equipos e insumos	20
3.3 Reactivos	21
3.3.1 Extracción de RNA	21
3.3.2 Extracción de proteínas	21
3.3.3 Separación electroforética de proteínas y electrotransferencia	21
3.3.4 Detección inmunoquímica	22
3.3.5 PCR en tiempo real (qPCR)	22
3.3.6 Tinción de geles con azul de Coomassie	22
3.4 RT-PCR semicuantitativo	22
3.4.1 Diseño de partidores de PCR convencional	22
3.4.2 Extracción de RNA total con Trizol	26
3.4.3 Extracción de RNA con sistema Ambion	28
3.4.4 Purificación adicional de RNA por precipitación con Cloruro de Litio (LiCl)	29
3.4.5 Digestión de trazas de DNA genómico con DNasa I	30
3.4.6 Transcripción reversa	30
3.4.7 Análisis semicuantitativo de los mRNAs de interés usando transcripción reversa acoplada a reacción de DNA polimerasa en cadena (RT-PCR)	31

3.4.8	Cálculo de razones gen reloj/ $\beta$ -actina para determinar expresión diferencial en el tiempo	32
3.4.9	Análisis de datos	33
3.5	PCR en tiempo real (qPCR)	34
3.6	<i>Western blot</i> de proteínas reloj	38
3.6.1	Extracción de proteínas totales	38
3.6.2	Cuantificación de proteínas	38
3.6.3	Separación electroforética en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	40
3.6.4	Electrotransferencia y detección inmunoquímica	40
3.6.5	Tinción de los geles con azul de Coomasie	42
3.7	Análisis de datos de proteínas reloj	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	44
4.1	Extracción y evaluación de RNA total de glándula adrenal de rata, obtenido cada 4 h a lo largo de las 24-h	44
4.2	Análisis de expresión oscilatoria de genes reloj a través de RT-PCR semicuantitativo	47
4.2.1	Estandarización de las condiciones de RT-PCR semicuantitativo	47
4.2.2	Análisis de expresión oscilatoria de genes a través de RT-PCR semicuantitativo	49
4.3	Análisis de expresión oscilatoria de genes reloj mediante PCR en tiempo real (qPCR)	52
4.3.1	Evaluación de las muestras de RNA total	52
4.3.2	Estandarización de la amplificación de transcritos reloj por RT-PCR en tiempo real (RT/qPCR)	55
4.3.3	Análisis de expresión de genes reloj mediante qPCR	59
4.4	Extracción y evaluación de proteínas totales de adrenal de rata	65
4.5	<i>Western blot</i> de proteínas reloj en adrenales de rata obtenidas cada 4 h a lo largo de las 24-h	68

4.6	Análisis de expresión relativa de la isoforma 1 del receptor de melatonina mediante qPCR	71
5	<b>DISCUSION</b>	73
6	<b>REFERENCIAS</b>	82
7	<b>ANEXO</b>	92
7.1	Determinación del <i>melting point</i> para amplímeros de transcritos reloj	92

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1:</b> Resumen de los partidores diseñados para PCR convencional	25
<b>Tabla 2:</b> Partidores utilizados para qPCR	36
<b>Tabla 3:</b> Programas para amplificar genes reloj, <i><math>\beta</math>-actina</i> y <i>MT1</i> por qPCR	37
<b>Tabla 4:</b> Razón $A_{260/280}$ y concentración de las muestras de RNA total de adrenal de rata (extraídas con reactivo Trizol)	46
<b>Tabla 5:</b> Razón $A_{260/280}$ y concentración de RNA total de 3 series de muestras de adrenal de rata (extraídas con sistema Ambion)	54
<b>Tabla 6:</b> Cuantificación de extractos proteicos totales de adrenal de rata por método de Bradford	67

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1 :</b> Núcleo supraquiasmático y ritmos circadianos	5
<b>Figura 2 :</b> Parámetros que definen un ritmo biológico ajustado a una función sinusoidal.	6
<b>Figura 3:</b> Modelo del mecanismo molecular involucrado en el reloj circadiano de mamíferos	10
<b>Figura 4:</b> Caseína quinasa I $\epsilon$ y sus múltiples roles en el reloj circadiano de mamíferos	12



<b>Figura 5:</b> Electroforesis de RNA para analizar cantidad relativa, posible degradación y contaminación por DNA genómico de las muestras de adrenal de rata obtenidas en las 24-h	45
<b>Figura 6:</b> Curva de eficiencia de PCR para el mRNA de $\beta$ -actina	48
<b>Figura 7:</b> Patrón circadiano de expresión de los transcritos reloj <i>Cry2</i> y <i>Clock</i> en la adrenal de rata <i>in vivo</i>	50
<b>Figura 8:</b> Patrón circadiano de expresión de los transcritos reloj <i>Bmal1</i> y <i>Per2</i> en la adrenal de rata <i>in vivo</i>	51
<b>Figura 9:</b> Electroforesis de RNA para analizar cantidad relativa, posible degradación y contaminación por DNA genómico de las muestras de adrenal de rata obtenidas en tres series por un período de 24-h.	53
<b>Figura 10:</b> Análisis de la calidad de los cDNAs obtenidos a partir de RNA total de adrenal de rata, mediante amplificación de $\beta$ -actina por RT/qPCR	56
<b>Figura 11:</b> Análisis electroforético de transcritos reloj amplificados por RT/qPCR	58
<b>Figura 12:</b> Expresión relativa de <i>Cry2</i> en adrenal de rata <i>in vivo</i>	60
<b>Figura 13:</b> Expresión relativa de <i>Clock</i> en adrenal de rata <i>in vivo</i>	61
<b>Figura 14:</b> Expresión relativa de <i>Per2</i> en adrenal de rata <i>in vivo</i>	62

<b>Figura 15:</b> Expresión relativa de <i>Bmal1</i> en adrenal de rata <i>in vivo</i>	63
<b>Figura 16:</b> Representación de la expresión oscilatoria de <i>Per2</i> y <i>Bmal1</i>	64
<b>Figura 17:</b> Evaluación electroforética de extractos de proteínas totales de adrenal de rata	66
<b>Figura 18:</b> Detección inmunoquímica de proteínas reloj en adrenal de rata a diferentes horas del día	69
<b>Figura 19:</b> Expresión relativa de las proteínas reloj CLOCK y PER1 en adrenal de rata <i>in vivo</i>	70
<b>Figura 20:</b> Expresión relativa del mRNA de <i>MT1</i> en adrenal de rata <i>in vivo</i> en las 24-h	72

**INDICE DE ABREVIACIONES**

AMPC	adenosin monofostato cíclico
ACTH	adrenocorticotrofina humana
b-HLH	motivo básico hélix-loop-hélix
<i>Bmal</i>	<i>brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator [ARNT]-like protein 1</i>
cDNA	copia ácido desoxirribonucleico
CKI	caseína quinasa I
<i>Clock</i>	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
Cp	<i>crossing point</i>
<i>Cry</i>	<i>cryptochrome</i>
C <sub>T</sub>	ciclo "Threshold"
CRE	elemento respuesta a AMPc
DEPC	dietil pirocarbonato
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
gDNA	DNA genómico
Kb	kilobase.
kDa	kilodalton
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NSQ	núcleo supraquiasmático
nt	nucleótidos

pb	pares de bases
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PAS	<i>Per-ARNT-Sim</i>
PBS	fosfato salino de sodio
PCR	reacción de polimerasa en cadena
<i>Per</i>	<i>period</i>
PVDF	polivinilideno difluoruro
qPCR	reacción de polimerasa en cadena cuantitativa
RT-PCR	transcripción reversa acoplada a PCR
RNAi	RNA interferente
SDS	dodecilsulfato de sodio
SUMO	pequeña molécula relacionada con ubiquitina, modificada.
TAE	tris-acetato-EDTA
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
ZT	<i>zeitgeber time</i>
$\beta$ TrCP	proteína que contiene repeticiones de $\beta$ transducina

## 1 RESUMEN

El reloj circadiano maestro del núcleo supraquiasmático (NSQ) controla la ritmicidad diurna del organismo, siendo la luz su señal sincronizadora dominante. En los últimos años, también se han detectado osciladores circadianos en diferentes tejidos periféricos de mamíferos diurnos y nocturnos. Durante el desarrollo de la presente investigación estos hallazgos incluyeron la glándula adrenal de ratón y mono. En esta Tesis, se utilizó PCR semicuantitativo y en tiempo real para analizar la expresión de los genes reloj clave *Per2*, *Cry2*, *Bmal1* y *Clock*, así como del gen del receptor de melatonina MT1 en la glándula adrenal de ratas sujetas a un fotoperíodo LO 12:12. Los resultados indican una expresión circadiana robusta de los genes reloj *Per2* y *Bmal1*, mientras que *Cry2* exhibió una baja oscilación en las 24-h. El transcrito de *Clock* no cambió con la hora del día. También seguimos la expresión circadiana de las proteínas CLOCK y PER1; de las cuales sólo PER1 presentó una expresión oscilatoria. Detectamos una marcada variación diurna del mRNA de MT1 (con máximo a las 1800-2200 h); lo cual concuerda con (i) nuestros resultados previos indicando la presencia de la proteína MT1 y unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina a las 2200 pero no 0800-1000 h, y (ii) observaciones publicadas de variaciones diurnas de la transcripción de MT1 en el NSQ y páncreas de rata. Actualmente estamos investigando acciones de melatonina sobre transcripción de genes reloj en la adrenal *in vitro*. En conjunto, nuestros resultados apuntan fuertemente a la existencia de un oscilador periférico en la adrenal de rata. Queda por dilucidar si éste contribuye a la regulación de las complejas vías de secreción de glucocorticoides adrenales en roedores nocturnos.

## 1.1 ABSTRACT

The central circadian oscillator of the suprachiasmatic nucleus (SCN) controls diurnal rhythmicity of the body with light as its dominant zeitgeber. In the last few years, oscillators have also been detected in different peripheral tissues of diurnal and nocturnal mammals. These findings even included the adrenal gland of mouse and monkey while the present investigation was under way. In this study, semiquantitative and real-time PCR were used for expression analysis of the core clock genes *Per2*, *Cry2*, *Bmal1* and *Clock*, as well as of the MT1 membrane-bound melatonin receptor gene in the adrenal gland of rats entrained to LD 12:12. The results presented here indicate a robust circadian expression of *Per2* and *Bmal1* clock genes, whereas *Cry2* displayed a very low 24-h oscillation. The *Clock* transcript did not change with the time of the day. We were also able to follow the circadian expression pattern of the CLOCK and PER1 proteins by immunoblotting; with only the latter displaying a circadian expression pattern. As for the MT1 melatonin receptor transcript, we detected a marked diurnal variation (peaking at the 1800-2200 h time interval); which agrees well with (i) our previous findings indicating presence of MT1 protein and 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding at 2200 but not 0800-1000 h, and (ii) reported observations of diurnal variations of MT1 transcription in the rat SCN and pancreas. We are currently investigating actions of melatonin on adrenal clock transcription *in vitro*. Altogether, our results strongly support the existence of a peripheral oscillator in the rat adrenal. Whether it contributes to regulate the complex adrenal glucocorticoids secretory pathways of nocturnal rodents remains to be elucidated.

## 2 INTRODUCCION

El sistema circadiano regula a todos los sistemas fisiológicos y podría ser definido como un supra-sistema que determina adaptaciones predictivas a los cambios originados por la alternancia día/noche. El sistema circadiano genera patrones rítmicos con un período de 24-h, denominados ritmos circadianos (Richter *et al*, 2004). Una consecuencia de la adaptación predictiva a señales ambientales como el ciclo luz/oscuridad y el horario de disponibilidad de alimento es la distribución de la actividad de los animales en las 24-h del día, generándose así, patrones de actividad diurnos y nocturnos. En un individuo, el sistema circadiano genera un orden temporal interno que distribuye las funciones fisiológicas en distintos segmentos de las 24-h (Moore-Ede *et al*, 1982).

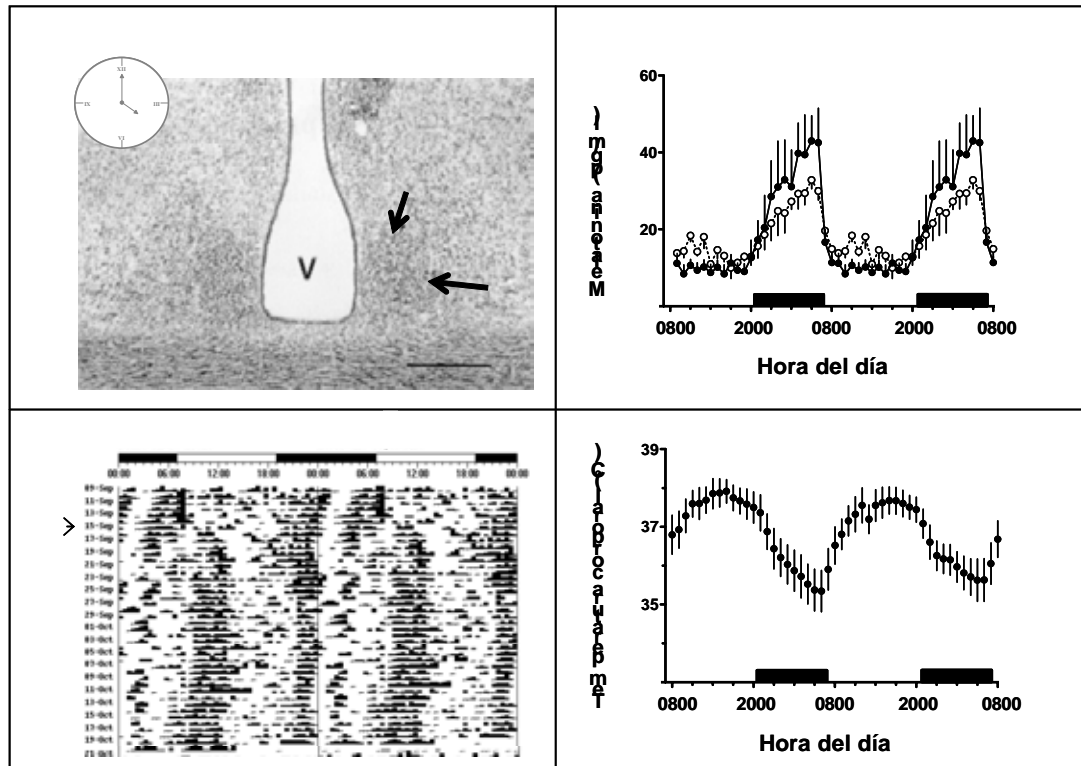
En 1729, el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous de Mairan demostró que los ritmos circadianos son endógenos y no una respuesta a los cambios día/noche del entorno. De Mairan observó que la planta *Mimosa púdica*, que presenta normalmente un ritmo día/noche de movimiento de sus hojas en condiciones de luz, mantenía este ritmo en oscuridad continua. Lo anterior, junto a otros experimentos adicionales, lo llevó a la conclusión que los seres vivos poseen un sistema de relojes biológicos que les permite ajustar sus funciones fisiológicas a las 24-h (Richter *et al*, 2004).

Los ritmos circadianos han sido observados tanto en organismos unicelulares como las cianobacterias, como también en plantas y en vertebrados incluyendo a los mamíferos (Dunlap, 1999; Witjen *et al*, 2006). Diferentes procesos biológicos en

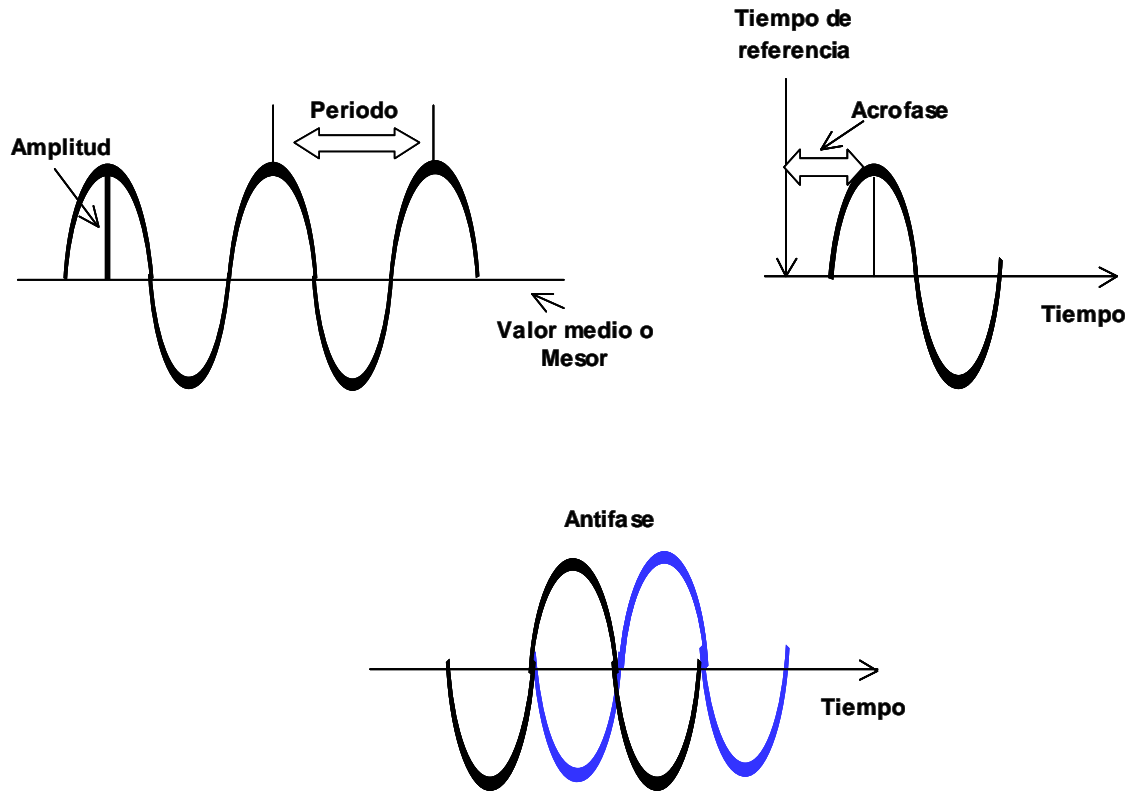
*Drosophila* están gobernados por ritmos circadianos. En mamíferos, las funciones fisiológicas como ritmos de sueño-vigilia, actividad-reposo, temperatura corporal (**Figura 1**), así como también los niveles plasmáticos de hormonas como melatonina y glucocorticoides, la expresión de la enzima hexoquinasa 1 en núcleo supraquiasmático de ratón (Panda *et al*, 2002) y hasta el ciclo celular, muestran ritmos circadianos (Matsuo *et al*, 2003).

Para estudiar un ritmo biológico, se deben realizar mediciones a intervalos de tiempo suficientemente cortos como para caracterizar su período. En la práctica se suelen tomar 6 o más muestras, por ciclo, para poder ajustar los valores obtenidos a una función sinusoidal. El objetivo es expresar en términos numéricos los parámetros que definen un fenómeno periódico; destacando: el período del ciclo, las relaciones de fase, y las características de la onda (**Figura 2**). Se entiende por período al intervalo de tiempo entre dos puntos idénticos del ritmo, correspondiéndose con la duración del ciclo. La amplitud corresponde a la mitad de la separación entre los valores extremos de una oscilación sinusoidal. La fase corresponde al valor de la variable en todas sus derivadas de tiempo. Antifase es la comparación de dos variables y corresponde a un desfase de 12 horas entre sus máximos (**Figura 2**). La acrofase, valor máximo de una función sinusoidal de los datos de un ritmo, se toma como relación a un tiempo de referencia dentro del ciclo. La representación de las acrofases de los distintos ritmos en un individuo se denomina mapa de fases, e indica la relación de orden temporal entre los distintos procesos fisiológicos, apareciendo con una secuencia característica durante el ciclo (Delgado, 1998).





**Figura 1. Núcleo supraquiasmático y ritmos circadianos.** *Panel superior izquierdo:* Sección coronal, en donde se muestra la disposición bilateral del núcleo supraquiasmático de feto de oveja, empleando tinción de Nissl (indicado con flechas negras); V: tercer ventrículo, barra: 500  $\mu$ m. *Panel superior derecho:* Ritmo de melatonina en ovejas preñadas y sus fetos (círculos negros y blancos, respectivamente). *Panel inferior izquierdo:* Ritmo de actividad locomotora en rata. Cada línea representa el registro de dos días sucesivos. Los registros iniciales fueron hechos bajo alimentación *ad libitum*, en las cuales las ratas muestran un patrón nocturno de actividad. *Panel inferior derecho:* Ritmo de temperatura corporal en mono capuchino adulto. Barras negras indican luz apagada (Richter *et al*, 2004).



**Figura 2. Parámetros que definen un ritmo biológico, ajustado a una función sinusoidal.** El valor medio, o *mesor*, es la media aritmética de todos los valores obtenidos de una variable oscilante dentro de un ciclo. Para definición de los otros parámetros mencionados, ver detalles en el texto.

El reloj circadiano está formado por 3 componentes, los cuales son: una vía de señales de entrada (ajusta el tiempo interno), un oscilador maestro (generador de la señal circadiana) y una vía de salida (manifiesta el ritmo circadiano en procesos fisiológicos y conductuales). En los últimos años, se ha demostrado que el sistema circadiano de los mamíferos está basado en la expresión coordinada de genes “reloj” tanto en el oscilador maestro -el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, NSQ - como en tejidos periféricos, tales como retina, hígado, corazón, pulmón, riñón y *pars tuberalis*, entre otros (Hirota y Fukada, 2004 y Richter *et al*, 2004). Estos hallazgos han actualizado los modelos propuestos en los años 60-70, de organización del sistema circadiano donde un oscilador central comanda a una posible jerarquía de osciladores periféricos que a su vez envían señales a otros tejidos (Moore-Ede *et al*, 1982). En este modelo, el concepto de un oscilador periférico requiere una capacidad de oscilación autónoma que es sincronizada por un oscilador central por vía nerviosa o humoral.

En rata, ratón y hámster, lesiones del NSQ resultan en la pérdida de ritmos circadianos de actividad locomotora y de oscilación plasmática de hormonas como melatonina y cortisol. El papel del NSQ como reloj maestro se descubrió en cepas mutantes de hámster (denominados *Tau*), los que presentan un período de actividad locomotora de 20 horas. Al realizar experimentos de transplante cruzado de NSQ en estos animales, se encontró que los mutantes *Tau* transplantados con NSQ de hámster normales, cambian a un ritmo de 24 horas (Ralph *et al*, 1990). Observaciones realizadas en roedores nocturnos y animales diurnos, como la oveja, muestran que el NSQ *in vivo* posee una actividad oscilatoria de actividad eléctrica y metabólica ajustada

a 24 h. Esta actividad es autónoma, puesto que se mantiene por varios días en cultivo de neuronas (actividad eléctrica) o de explantes (actividad metabólica) (Welsh *et al*, 1995; Reppert y Weaver, 2002).

### **Mecanismo molecular del sistema circadiano en mamíferos**

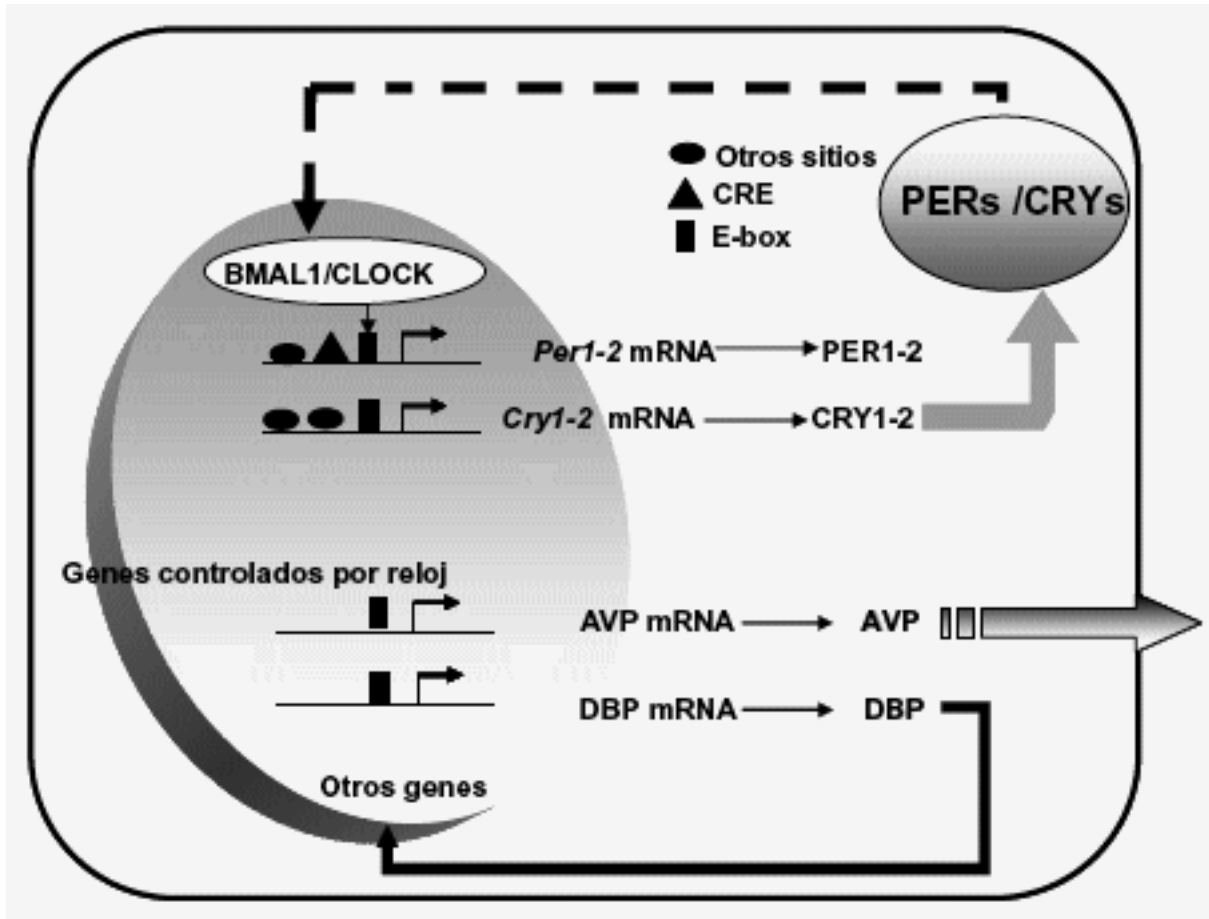
Gracias a numerosas investigaciones, se ha logrado establecer un modelo del circuito molecular que genera oscilaciones circadianas; el cual está genéticamente programado. Se han identificado numerosos factores transcripcionales y quinasas, que establecen un circuito oscilatorio transcripcional/traduccional autorregulado que oscila con un período de 24-h.

Los denominados genes reloj poseen distintos niveles de complejidad, tales como: regulación post-transcripcional, modificaciones post-traduccionales, remodelamiento de cromatina, disponibilidad de proteínas reloj, participación de co-reguladores y regulación de la localización intracelular (Cermakian y Sassone-Corsi, 2000). Todas estas posibilidades de regulación proveen de una interfase que puede ser usada como punto de entrada de un estímulo, el cual podría resetear o controlar el reloj.

Son múltiples las señales y maquinarias moleculares que actúan en conjunto para coordinar el proceso que involucra la función de un reloj. A través de estudios mutacionales, se han caracterizado un conjunto de genes cuya alteración resulta en la interrupción del ritmo circadiano normal de actividad locomotora en hamster, rata y ratón. La secuencia de los denominados genes reloj, está altamente conservada entre *Drosophila*, ratón y humano. En mamíferos, el circuito estimulador de la transcripción está dado por el heterodímero formado por los factores de transcripción bHLH-PAS

CLOCK y BMAL1 (**Figura 3**), en tanto que los reguladores negativos corresponden a las proteínas PER (con dos proteínas homólogas funcionalmente relevantes, PER1 y PER2) y CRY (con dos proteínas homólogas, CRY1 y CRY2) (Dunlap, 1999; Ederly, 2000; Reppert y Weaver, 2000; Okamura *et al*, 2002). El complejo CLOCK/BMAL1 se une a secuencias *enhancer* E-box que activan la transcripción de los genes *Per* y *Cry* (**Figura 3**). Esta activación involucra la asociación de CLOCK con la enzima histona acetiltransferasa (HAT) p300 con lo que se favorece la acetilación de la histona H3 en la región promotora de genes blanco (Etchegaray *et al*, 2003). Las proteínas CRY1-2 y PER1-2 se traducen en el citoplasma y una vez que se acumulan hasta sobrepasar un umbral crítico, forman heterodímeros que entran al núcleo e interactúan directamente con CLOCK/BMAL1 para inhibir su propia transcripción (**Figura 3**), cerrando de esta forma el circuito inhibitor (Reppert y Weaver, 2002; Okamura *et al*, 2002).

La maquinaria molecular del reloj es bastante compleja y se ha descrito la participación de otros factores en circuitos transcripcionales accesorios, así como también de mecanismos de regulación post-traducciona (Hirota y Fukada, 2004; Richter *et al*, 2004). La transcripción del gen que codifica para la proteína BMAL1 es reprimida por REV-ERB $\alpha$ , cuya expresión es activada por el complejo CLOCK/BMAL1 (Preitner *et al*, 2002). Esta regulación resulta en la oscilación circadiana de la expresión de *Bmal1* en antifase con el ritmo de expresión de *Per*. Además existen otros factores de transcripción del tipo bHLH, DEC1 y DEC2, los cuales inhiben la función del complejo CLOCK/BMAL1; adicionalmente, la expresión del gen *Dec1* es controlada por dicho heterodímero, sugiriendo que las proteínas DEC actúan como un regulador negativo adicional de este circuito (Kawamoto *et al*, 2004).

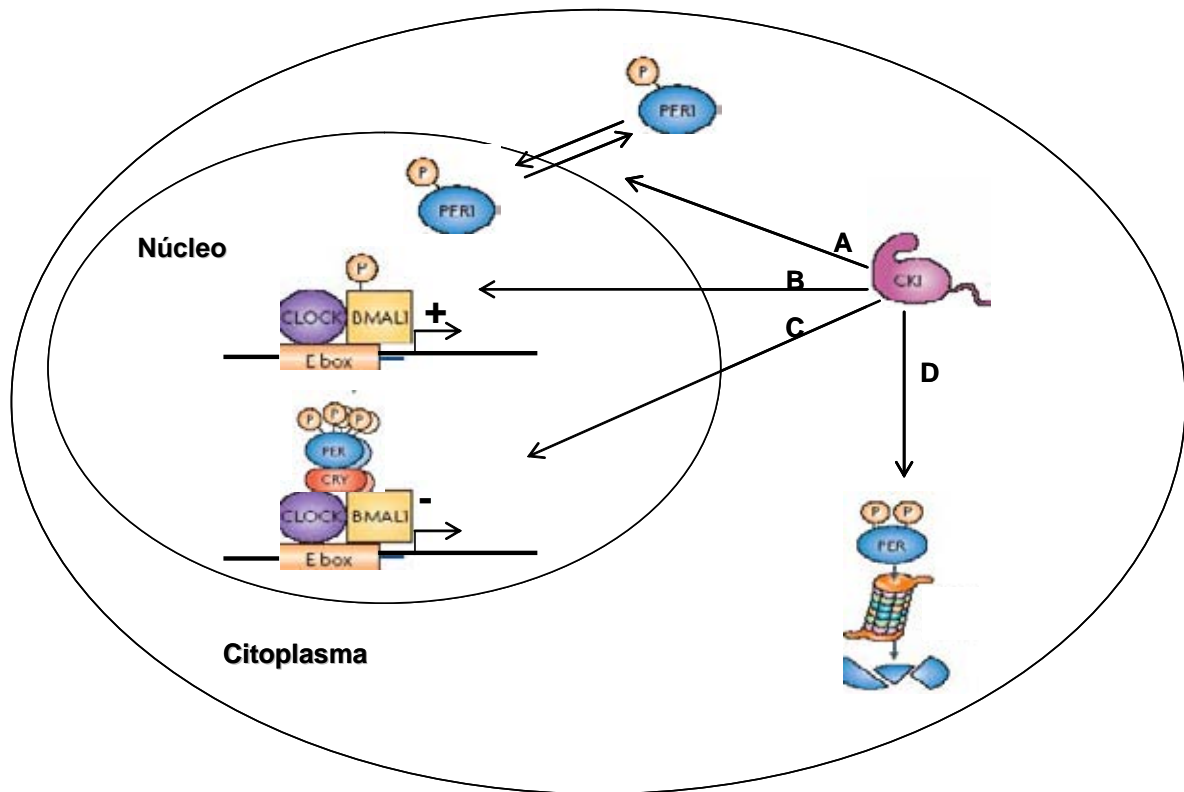


**Figura 3. Modelo del mecanismo molecular involucrado en el reloj circadiano de mamíferos.** El heterodímero CLOCK/BMAL1 se une a los motivos E-Box de las regiones promotoras de los genes *Per1-2* y *Cry1-2*, activando su transcripción. Las proteínas PER1-2 y CRY1-2, una vez que heterodimerizan, se traslocan al núcleo e interactúan con CLOCK/BMAL1, inhibiendo la transcripción de los genes *Per1-2* y *Cry1-2*. A su vez CLOCK/BMAL1 induce la transcripción de otros genes que contengan en su región promotora el motivo E-box, tales como el gen de vasopresina (AVP) y de *Albumin gene D-site binding protein* (DBP). (modificado de Richter *et al*, 2004).

La importancia de las modificaciones post-traduccionales es crucial, si se considera el retraso que existe en el circuito represor, el cual es vital para dar una periodicidad de 24 h al mecanismo de reloj. Los ciclos de transcripción/traducción generalmente operan con una escala de tiempo de unas pocas horas. Es por esta razón que para mantener la oscilación diaria de las proteínas reloj, se requiere de un retraso significativo entre la activación y represión de la transcripción; y este retraso es asegurado a través de modificaciones post-traduccionales. Entre ellas están la fosforilación, poliubiquitinación y SUMOilación (Yagita *et al*, 2002; Cardone *et al*, 2005).

La fosforilación reversible regula importantes procesos como la traslocación de proteínas reloj al núcleo, formación de complejos proteicos y degradación proteolítica. Se han identificado una serie de fosfatasas y quinasas que actúan como componentes esenciales del reloj, ya que mutaciones de estas enzimas se caracterizan por la aparición de un fenotipo circadiano anormal. CKI $\epsilon$  y MAPK fosforilan varias proteínas reloj con el fin de modular su actividad y/o función (Cemarkian y Sassone-Corsi, 2000; Gallego *et al*, 2007).

CKI $\epsilon$  cumple varios roles en el reloj circadiano de mamíferos (**Figura 4**), entre ellos participar en la regulación nuclear de la proteína PER, ya que cuando forma parte del complejo ternario permite su traslocación al núcleo (Cemarkian y Sassone-Corsi, 2000). La sobreexpresión a CKI $\epsilon$  y CKI $\delta$  acorta la vida media de PER1 y PER2 libres, ya que crean sitios de unión para  $\beta$ TrCP y un F-Box para ubiquitina ligasa E3. La estabilidad de la proteína PER es regulada principalmente para fosfatasas PP1 y PP2A



**Figura 4. Caseína quinasa I $\epsilon$  y sus múltiples roles en el reloj circadiano de mamíferos. A)** Regula la localización nuclear de la proteína PER. **B)** Las proteínas PER y CRY no son el único sustrato de CKI en el *core* molecular del reloj. CKI $\epsilon$  media la fosforilación del regulador circadiano BMAL1, incrementando su actividad transcripcional **C)** La fosforilación de PER aumenta en el día, obteniéndose un nivel máximo cuando la represión del complejo CLOCK/BMAL1 es máxima. **D)** La fosforilación de las proteínas PER regulan su estabilidad. La fosforilación de uno o mas sitios en las proteínas PER1 y PER2 las convierte en blanco para poliubiquitinación y posterior degradación proteosomal (modificado de Gallego *et al*, 2007).



y por la presencia de las proteínas CRY, ya que si existe una baja concentración de las últimas, las proteínas PER son poliubiquitinadas y degradadas (Okamura *et al*, 2004). La fosforilación de las proteínas PER por CKI $\epsilon$  inicia el reclutamiento de  $\beta$ TrCP1 y  $\beta$ TrCP2, las cuales median la poliubiquitinación y degradación a través de proteosoma 26S (Gallego *et al*, 2007).

Además de poliubiquitinación, existe regulación de BMAL1 por SUMOilación. La SUMOilación corresponde a una modificación post-traducciona reversible controlada por una vía enzimática análoga a la vía de ubiquitinación y en la cual se une SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) a residuos de lisina. La SUMOilación rítmica de BMAL1 *in vivo*, es controlada por mecanismos que requieren su heterodimerización con CLOCK. La SUMOilación de BMAL1 favorece el recambio de proteínas y a la vez es requerida para mantener su propia ritmicidad. La mutación de la proteína BMAL1, en el residuo de lisina en posición 259 por arginina, aumenta su vida media (Cardone *et al*, 2005).

La expresión oscilatoria de genes reloj ocurre no sólo en el NSQ -el oscilador central-, sino también en diversos tejidos incluyendo otros componentes del sistema nervioso central, los cuales han sido denominados relojes periféricos (Balsalobre, 2002 y Richter *et al*, 2004). En 1998, se publicó la expresión circadiana de los mRNA de *Bmal1*, *Per1* y *Per2* en retina, corazón, riñón y pulmón de rata a distintas horas del día (Oishi *et al*, 1998ayb); mientras que en ratón, se describió la expresión oscilatoria del mRNA de *Per3* en hígado, músculo esquelético y testículo (Zylka *et al*, 1998). Sin embargo, publicaciones recientes muestran que aún cuando existe expresión

de genes reloj en el testículo de ratón, el nivel de sus productos no oscila (Miyamoto y Sancar, 1999; Fu *et al*, 2002; Alvarez *et al*, 2003; Morse *et al*, 2003). La evidencia que una lesión del NSQ suprime la oscilación, pero no la expresión del gen reloj *Per2* en diversos tejidos de rata (retina, cerebro excluyendo el NSQ, corazón, pulmón, bazo, hígado y riñón; Sakamoto *et al*, 1998), es consistente con el concepto que el sistema circadiano es un ordenamiento jerárquico de relojes biológicos.

Tanto en el NSQ como en los diversos osciladores periféricos (hígado, músculo, riñón, pulmón, *pars tuberalis* y otros) de rata y ratón, el patrón de expresión en las 24-h del gen *Bmal1* se caracteriza por oscilaciones marcadas del nivel del mRNA en antifase con aquellos de *Per* y *Cry*; mientras que el nivel del mRNA de *Clock* permanece estable en las 24-h (Reppert y Weaver, 2002; Okamura *et al*, 2002; Balsalobre, 2002). A nivel de las proteínas codificadas por estos transcritos, CLOCK es un antígeno nuclear expresado constitutivamente en el NSQ del ratón y también exhibe niveles estables en las 24-h en otros tejidos (Balsalobre, 2002; Maywood *et al*, 2003). La oscilación circadiana de los factores negativos está bien demostrada en ratones, dado que PER1, PER2 y CRY1 se acumulan en el núcleo de las neuronas del NSQ al término del día y desaparecen hacia el final de la noche (Maywood *et al*, 2003). Sin embargo, el análisis de la expresión circadiana de la proteína BMAL1 en el NSQ de ratas y ratones, ha arrojado resultados conflictivos (Tamaru *et al*, 2000; Maywood *et al*, 2003; von Gall *et al*, 2003). Por otra parte, en el NSQ de mamíferos, la única diferencia importante del mecanismo de oscilación de genes reloj publicada a la fecha es la expresión oscilatoria del mRNA de *Clock* en el NSQ de oveja (Lincoln *et al*, 2002), en contraste al nivel

constante descrito para este transcrito en el NSQ de roedores nocturnos. Sin embargo, una observación consistente es que la fase de oscilación de genes reloj en los tejidos periféricos de roedores nocturnos presenta un retraso de 4-8 horas respecto de la fase en el NSQ (Balsalobre, 2002 y Richter *et al*, 2004).

### **Ritmo circadiano en glándula adrenal**

Andrews y Folk (1964) demostraron que el consumo de oxígeno y la producción de glucocorticoides por la glándula adrenal de hámster en cultivo, mantiene un ritmo circadiano durante 10 días. Esta capacidad oscilatoria intrínseca de la función adrenal en cultivo sugiere la presencia de un reloj periférico en este tejido. Los glucocorticoides y mineralocorticoides secretados por la corteza adrenal participan en múltiples funciones fisiológicas que incluyen la regulación de la homeostasis de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , glucosa, la respuesta inmune y en los mecanismos de respuesta al *stress* (Orth y Kovacs, 1998; Ross *et al*, 2005). La producción de cortisol (o corticosterona en rata) está regulada por adrenocorticotropina (ACTH), hormona secretada por el eje hipotálamo-hipófisis, fundamental en la mantención de la función y morfología de la glándula adrenal. Se ha observado un marcado ritmo circadiano en la secreción de ACTH en varias especies (Orth y Kovacs, 1998). Este ritmo de ACTH depende de las conexiones neurales entre el NSQ y el núcleo paraventricular que regulan la secreción de hormona liberadora de adrenocorticotropina (CRH) y vasopresina. Sin embargo el ritmo circadiano de ACTH no da cuenta completamente de la oscilación circadiana de la producción de glucocorticoides. En ratas hipofisectomizadas sometidas a infusión continua de ACTH, se mantiene un ritmo de secreción de corticosterona (Meier, 1976). Varios experimentos

demuestran un cambio circadiano en la sensibilidad a ACTH en la rata y humanos (Engeland y Arnhold, 2005; Dickstein *et al*, 1991; Park *et al*, 1999). Este conjunto de resultados sugiere que el ritmo circadiano de secreción de glucocorticoides depende al menos en parte de la capacidad intrínseca de la corteza adrenal para generar oscilaciones circadianas en su función.

Investigaciones previas de nuestro grupo sobre expresión de genes reloj en la glándula adrenal del mono capuchino permitieron detectar transcritos de los genes reloj *Clock*, *Bmal1*, *Per2* y *Cry2* en condiciones *in vivo* e *in vitro* (Torres-Farfan *et al*, 2006a; Valenzuela *et al*, 2005). La identidad de estos mRNAs fue confirmada mediante secuenciación de fragmentos de cDNA de doble hebra. Además, recientemente se obtuvo evidencia que la glándula adrenal de ratón registra expresión de las proteínas reloj BMAL1, PER1 y CRY2 (Torres-Farfán *et al*, 2006b). La expresión de genes reloj en la glándula adrenal es consistente con la capacidad oscilatoria intrínseca de este tejido descrita previamente (Andrews y Folk, 1964).

Publicaciones muy recientes (Oster *et al*, 2006a; ver detalles en discusión) han mostrado que la glándula adrenal constituye un reloj periférico el cual posee autonomía de funcionamiento, en ausencia de la influencia del NSQ. Oster y colaboradores (2006) han caracterizado a través de microarreglos el transcriptoma circadiano de la adrenal murina, determinando que el 5% del genoma está bajo control circadiano en esta glándula (Oster *et al*, 2006c). En el curso del último año, mientras la presente Tesis se estaba desarrollando, se registraron una serie de publicaciones (Watanabe *et al*, 2006; Ishida *et al*, 2005; Torres-Farfán *et al*, 2006ayb; Lemos *et al*, 2006; Oster *et al*, 2006a),

las cuales aportan evidencia sustancial sobre la existencia de un reloj periférico funcional en la adrenal de primates diurnos y roedores nocturnos.

### **Melatonina podría afectar la expresión de genes reloj en la glándula adrenal**

Melatonina es una hormona de tipo indolamina que es sintetizada en forma rítmica principalmente por la glándula pineal (Lewy *et al*, 1980; Reiter, 1991). En mamíferos tanto diurnos como nocturnos, la mayor concentración plásmatica de melatonina se alcanza durante las primeras horas de oscuridad y se mantiene en bajas concentraciones durante las horas de luz (Lewy *et al*, 1980; Ganguly *et al*, 2002). Se ha descrito que melatonina regula una amplia variedad de procesos fisiológicos en diferentes células y tejidos (Richter *et al*, 2004; Dubocovich y Markowska, 2005). Melatonina se une a dos isoformas de receptores de membrana de alta afinidad, acoplados a proteína G (MT1 y MT2), y probablemente a un miembro de la familia de receptores nucleares huérfanos de ácido retinoico (RZR/ROR; Carlberg y Wiesenberg, 1995; Vanecek, 1998).

Las acciones de melatonina sobre genes reloj sólo han sido estudiadas en *pars tuberalis* de rata, ratón y oveja. La *pars tuberalis* de estas especies presenta una alta densidad de receptores de melatonina MT1 (Lincoln *et al*, 2002; Korf y von Gall, 2006; Dardente *et al*, 2003). Este tejido expresa genes reloj en forma oscilatoria en ratones (von Gall *et al*, 2002 y 2005), ratas (Dardente *et al*, 2003) y ovejas (Lincoln *et al*, 2002). Dos de estas publicaciones sugieren que melatonina podría sincronizar la expresión de genes reloj en este tejido. Dardente y colaboradores (2003) demostraron que la administración de melatonina induce rápida y transitoriamente la expresión de *Cry1* y

afecta moderadamente la expresión de *Per1* en la *pars tuberalis* de rata. von Gall y colaboradores (2002 y 2005) demostraron que melatonina es necesaria para la expresión circadiana del gen reloj *Per1* en la *pars tuberalis* de ratón. El análisis de la *pars tuberalis* de ratones *knockout* para el receptor de melatonina MT1 mostró niveles reducidos de la proteína PER1. En ratones pinealectomizados, estos mismos autores demostraron una supresión de la expresión oscilatoria del gen *Per1*, efecto que fue revertido por un tratamiento con dosis diarias de melatonina. Por otro lado, cambios circadianos de la expresión receptores de melatonina también ha sido demostrado en NSQ y páncreas de rata (Gauer *et al*, 1993 y Peschke *et al*, 2006; respectivamente) y recientemente en NSQ y glándula adrenal de feto de mono capuchino (Torres-Farfan *et al*, 2006a).

En base a los antecedentes presentados, proponemos determinar el patrón circadiano de expresión de varios genes reloj en la glándula adrenal de rata *in vivo* y verificar la expresión de mRNA para el receptor de melatonina MT1 en adrenal de rata *in vivo* durante un período de 24-h. Para ello nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo y objetivos:

## Hipótesis

- 1 La glándula adrenal de rata es un reloj periférico con un patrón circadiano bien definido de expresión de genes reloj *in vivo*
- 2 El mRNA del receptor de melatonina MT1 se expresa de forma circadiana en la glándula adrenal de rata *in vivo*

## Objetivos generales

- 1 Determinar y describir el patrón oscilatorio de expresión de genes reloj en adrenal de rata *in vivo*.
- 2 Determinar que el receptor MT1 se expresa en la adrenal de rata y caracterizar su patrón circadiano de expresión *in vivo*.

## Objetivos específicos

- 1 Determinar semicuantitativamente la oscilación de los mRNA reloj *Clock*, *Bmal1*, *Cry2* y *Per2* en glándula adrenal de rata *in vivo* en las 24-h (cada 4-h: 0200-2200 h).
- 2 Determinar la expresión de las proteínas reloj CLOCK, PER1-2, BMAL1 y CRY2 en adrenal de rata *in vivo* en las 24-h (cada 4 h: 0200-2200 h).
- 3 Determinar la expresión relativa de mRNAs reloj (*Clock*, *Bmal1*, *Cry2* y *Per2*) y del receptor *MT1*, en adrenal de rata *in vivo* en las 24-h (cada 4-h: 0200-2200 h).

### 3 MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Animales

En la presente tesis, se utilizaron las glándulas adrenales de ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley de aproximadamente 2,5 meses de edad y 250 g de peso corporal, sometidas a un fotoperíodo 12:12, además de alimentación (pellet y agua) *ad libitum*. Todos los procedimientos de manejo de los animales se realizaron siguiendo las recomendaciones de “*NIH Guide for Animal Experimentation Care*”. Todos los experimentos y protocolos fueron aprobados por la comisión “Utilización de animales en la investigación de la Universidad Austral de Chile”, en Junio del 2004. Los restos fueron cremados en el incinerador del Fundo Teja Norte de la Universidad Austral de Chile, donde se descartan los desechos biológicos, de acuerdo al “Manual de procedimiento de manejo de residuos” de la Universidad Austral de Chile.

#### 3.2 Equipos e insumos

Centrífuga refrigerada, *Hettich, Zentrifugen MIKRO 200R. Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL, IKA-Labortechnik)*. *Termoblock* (Barnstead Thermolyne Tyse 17600 pm-Bath) o baño termorregulado. *UV-1203 UV-VIS Spectrophotometer* (Shimadzu). *Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System* (Biorad). Termociclador GeneAmp 2400 System (Perkin Elmer). *Mini Protean III Cell* (Biorad). *Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer cell* (Biorad). *Shake'N'Bake Hybridization Oven* (Boekel Scientific). *Vortex Genie 2* (Scientific Industries). Transiluminador *UV Vilber- Lourmat*. Balanza analítica. Fuente de poder *Consort E833* (Arquimed). Sonicador *Ultrasonic*



*Homogenizer* (Cole-Palmer Instrument Corporation). Cámara digital *Olympus Camedia Master 4.1*. Tubos de policarbonato de 5 ml. Microtubos *Eppendorf* de 1,5 y 0,6 ml. Microtubos de pared delgada de 0,2 ml. Material quirúrgico estéril (pinzas, hojas de bisturí, tijeras). Micropipetas *Gilson* y *Nichipet* (P2, P10, P20, P100, P200 y P1000). Puntas de micropipeta estériles, con filtro, certificadas como libres de nucleasas, proteasas y pirógenos (AXYGEN). Tubos de ensayo de vidrio. Jeringas 21.5” Nunc. Sistema de PCR en tiempo real *LightCycler 1.5* (Roche Diagnostics). Capilares *LightCycler* de 20 µl (Roche Diagnostics). Lupa conectada a sistema de luz fría (Nikon). Placas cultivo 24 pocillos (Nunclon). Cámara de flujo laminar (Forma Scientific Inc). Lámpara de luz roja (<0.2 lux).

### **3.3 Reactivos**

**3.3.1 Extracción de RNA:** Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>, Winkler). Etanol absoluto (Merck). Iso-2-Propanol (alcohol isopropílico, Winkler). DEPC-*treated water* y *Trizol* (Invitrogen). *RNAqueous-Midi Large Scale Phenol-Free Total RNA Isolation Kit* (Ambion).

**3.3.2 Extracción de proteínas:** Bicarbonato de amonio (Riedel-de Haën). EDTA (Sigma). Cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma). Albúmina de bovino (Sigma). Reactivo de Bradford 1X (Biorad).

**3.3.3 Separación electroforética de proteínas y electrotransferencia:** Glicina (Biorad). Tris (Biorad). Acrilamida 99,9% (Biorad). N,N'-Metilen-Bisacrilamida (Sigma). SDS (Sigma). TEMED 99% (Sigma). Benchmark Pre-Stained Protein Ladder

(Invitrogen). Metanol absoluto 99% (Merck). Papel filtro Whatman N°1. *Inmobilon-P*, PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore).

**3.3.4 Detección inmunoquímica:** PBS 1x pH 7,4 (Sambrook *et al*, 1999). Tampón BSA 3%-PBS 1X-*Tween* 0,05%. Luminol (*Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate*, Pierce). Kodak Biomax MR film 20,3 x 25,4 cm. Revelador D-72 y Fijador U-3 (Kodak). Anti PER1 (Calbiochem). Anti PER2 (Santa Cruz Biotechnology). Anti CLOCK (Calbiochem). Anti CRY2 (USBiological). Anti BMAL1 (Abcam). Anti ACTINA (Santa Cruz Biotechnology). Anti-IgG de conejo conjugada a peroxidasa hecho en cabra (Immunopure, Pierce). Anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa hecho en cabra (Immunopure, Pierce).

**3.3.5 PCR en tiempo real (qPCR):** *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics). DEPC-*treated water* (Invitrogen). Partidores sentido y antisentido 100  $\mu\text{M}$  (Invitrogen).

**3.3.6 Tinción de geles con Azul de Coomassie:** *Coomassie R-250* (Merck). Metanol (Winkler). Acido acético (Winkler).

## 3.4 RT-PCR semicuantitativo

### 3.4.1 Diseño de partidores de PCR convencional

En este trabajo, se usaron diferentes estrategias para obtener partidores de PCR eficientes: (1) partidores publicados por otros investigadores, chequeados en cuanto a

la calidad de bandas y parámetros termodinámicos; (2) de igual manera, pero modificados para su optimización; y (3) diseñados a partir de secuencias de los mRNA relevantes publicadas en bancos de genes. En todos los casos, se consideró el cumplimiento de las siguientes exigencias mínimas:

- tamaño óptimo del fragmento de PCR entre 250 y 500 pb.
- tamaño mínimo de cada partidor 20 bases.
- rango de  $T_m$  50-60 °C.
- estabilidad de extremos “internos” media-alta.
- formación teórica de dímeros y *loops* igual a 2 configuraciones como máximo.
- todos los cDNAs amplificados deben contener al menos un sitio de inserción para intrón.
- la secuencia de los partidores no debe aparearse significativamente con otras secuencias publicadas en *GeneBank*.

Para cada gen reloj, se realizó una búsqueda en *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), obteniendo la secuencia del RNA mensajero y de la proteína codificada en *Rattus norvegicus*.

Los partidores, tanto para el “sense” (5´-3´) como el “antisense” (3´-5´), fueron analizados posteriormente por el programa *BLASTn*, para determinar el tamaño del fragmento generado por el par de partidores correspondientes; además se realizó un análisis termodinámico para cada partidor, usando el programa *DNAclub* (*freeware*; <http://128.84.203.244>, creado y registrado a nombre de Xiongfong Chen).

Por otra parte, se utilizó  $\beta$ -actina como gen constitutivo ya que este posee mayor estabilidad en cuanto a los niveles de transcripción. La información relevante de cada partidor de PCR se detallada en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Resumen de los partidores diseñados para PCR convencional.

Gen		Partidores					
	N° de Exones	Sentido / Antisentido	GenBank	Temperatura de annealing (óptima) °C	N° de ciclos óptimo	Producto PCR	
						Posición	pb
<b>Clock</b>	25	CAGGGCACCACCAATAATAGG / GCTTCCTTGAGACTCACTGTG	GI: 2114487 GI: 4758009 GI: 19773561	60	30	Bases 1261-1647	386
<b>Per2</b>	26	GAATTCCTCCTGAGAAGAG / TTGATGAAGCTGGACCAGCT	AF035830 AF199499, KIAA0347, AB01653, AF022991, AF022992, AF050182, AF033029 U12769	60	36	Bases 1089-1371	282
<b>Bmal1b</b>	22	AGATTGAAAAGAGGCGTCGGGA / GAAGATAGCTGTTCCCTTAACTTTGG	GI: 3668182 GI: 5360227 Yu <i>et al</i> (1999)	56	26	Bases 256-649	393
<b>Cry2</b>	12	GGCCTGGGTTGCCAACTATG/ ACTGCAGGACAGCCACATCCA	AY575771	60	28	Bases 750-1275	525
<b>β-actina</b>	---	GCTCGTCGTCGACAACGGCTC/ CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	Torres-Farfán <i>et al</i> (2003)	60	24	---	352

### 3.4.2 Extracción de RNA total con trizol

Tres ratas fueron sacrificadas por decapitación cada 4 h a lo largo de las 24-h (0200, 0600, 1000, 1400, 1800 y 2200 h), e inmediatamente se obtuvieron las adrenales. El procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril, dedicado sólo a procesos de extracción de ácidos nucleicos. La disección de los tres pares de adrenales permitió obtener aproximadamente 100 mg de tejido, los cuales fueron pesados en una balanza analítica. Cada bloque de tejido fue sometido al proceso de extracción de RNA total usando 1 ml de solución de extracción (Trizol, Invitrogen), en un tubo de policarbonato estéril de 5 ml.

Las muestras se homogenizaron en Ultraturrax, alternando rotaciones de 15 s con reposo en hielo. Los homogenizados fueron dejados 5-10 min a temperatura ambiente (inactivación de las RNasas y destrucción de las membranas celulares). Por cada ml de solución de extracción se agregaron 200 µl de cloroformo y las muestras fueron mezcladas por 15 s en vortex a potencia máxima. Luego se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min. Se traspasaron las muestras a tubos *Eppendorf* de 1,5 mL y se centrifugaron a 4 °C, 13680 g, por 15 min. La fase superior que contiene el RNA total se traspasó a un *Eppendorf* nuevo (máximo 600 µl por tubo). Las fases inferiores se eliminaron (contienen las proteínas y el DNA). Se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico por cada 500 µl de fase acuosa, mezclando los tubos varias veces por inversión y posteriormente se incubaron 10 min a temperatura ambiente (precipitación del RNA). Se centrifugó a 4 °C, 13680 g, por 10 min; se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron los *pellet* con 500 µl de etanol pro-análisis al 75%, seguido de agitación breve en *vortex* y centrifugación a 4 °C, 9500 g, por 5 min (este proceso de

lavado se realizó dos veces). Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* de RNA a 37°C por 10 min con la tapa del tubo *Eppendorf* abierta en el *Termoblock*. Los *pellets* fueron resuspendidos cuidadosamente en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (30 µl-50 µl-100 µl, según el tamaño del *pellet*), mediante pipeteo repetido. Las resuspensiones de RNA total resultantes fueron incubadas a 55°C por 5 min en *Termoblock* o baño termostático (esta incubación ayuda a disolver mejor el RNA). Finalmente se midió absorbancia para determinar concentración del RNA, a 260 nm (ácidos nucleicos) y 280 nm (proteínas), para obtener la razón 260/280 que teóricamente debe ser 1,8-2,0 para muestras de óptima calidad. Cada muestra se midió en dos diluciones distintas (1:50 y 1:100). Luego se promedió y se obtuvo la concentración final.

Cálculo de la concentración:

$Abs. 260 \text{ nm} \times 40 \text{ (constante para RNA; } 1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}) \times \text{(factor de dilución)} = \mu\text{g/ml RNA}$

Se hicieron diluciones para llevar el RNA a una concentración de trabajo de 1 µg/µl.

Se determinó la integridad del RNA por medio de un gel de agarosa al 1,5 % preteñido con bromuro de etidio, en corrida de electroforesis lenta (45 V, 25 mA). Este experimento permite un chequeo rápido y eficiente de la calidad de muestras de RNA total, obviando el uso de paraformaldehído y temperatura. Los parámetros medidos en el gel son: probable contaminación con DNA genómico, eventual degradación de la

muestra y cantidad de RNA total relativa entre las muestras (vale decir, si existe correspondencia con las concentraciones medidas espectrofotométricamente).

### **3.4.3 Extracción de RNA con sistema Ambion**

Tres ratas fueron sacrificadas por decapitación cada 4 h a lo largo de las 24-h (0200, 0600, 1000, 1400, 1800 y 2200 h), e inmediatamente se obtuvieron las adrenales. El procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril, dedicado sólo a procesos de extracción de ácidos nucleicos. La disección de los tres pares de adrenales permitió obtener aproximadamente 100 mg de tejido, los cuales fueron pesados en una balanza analítica. Cada bloque de tejido fue sometido al proceso de extracción de RNA total usando 0,7 ml de solución de lisis, en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml.

Las muestras se homogenizaron usando jeringas de 21,5". Con el fin de eliminar restos celulares, los homogenizados fueron clarificados por centrifugación a 7650 g por 8 min. Posteriormente se transfirió el lisado a nuevos *Eppendorf* de 1,5 ml y se agregó igual volumen al lisado recuperado, de etanol 64%. Los homogenizados fueron agitados y se hicieron pasar por el filtro de fibra de vidrio provisto en el kit. Una vez pasado el contenido, se hizo pasar aire forzosamente a través del filtro, utilizando jeringa; repitiendo este paso hasta que no saliera material espumoso. En la etapa de lavado del filtro, se empleó el mismo volumen (homogenizado + etanol 64%) de solución de lavado #1. Nuevamente se hizo pasar aire hasta que no se obtuviera material espumoso. Para la segunda etapa de lavado se empleó un 70% del volumen en solución de lavado #2/3.



Finalmente se eluyó el RNA desde el filtro utilizando 1 ml de solución de elución, la cual fue previamente calentada a 100 °C.

Se midió absorbancia para determinar concentración del RNA, a 260 nm (ácidos nucleicos) y 280 nm (proteínas), para obtener la razón 260/280 que teóricamente debe ser 1,8-2,0 para muestras de óptima calidad. Cada muestra se midió en una dilución 1:40 ( 25µl RNA + 975 µl de agua). Luego se promedió y se obtuvo la concentración final. Este procedimiento fue necesario para establecer los volúmenes iniciales requeridos para la precipitación con Cloruro de Litio.

#### **3.4.4 Purificación adicional de RNA por precipitación con Cloruro de Litio (LiCl)**

La precipitación con LiCl puede ser utilizada para remover carbohidratos y otras impurezas, incluso para reducir o eliminar la contaminación con DNA genómico.

Para la purificación con LiCl se adicionó medio volumen de solución de precipitación de LiCl provista en el kit, más un volumen de la muestra de RNA. Se mezcló bien. Una vez agitado, se incubó todo a -20 °C por 30 min. Finalizado este tiempo, se centrifugó la muestra a máxima velocidad a 4 °C por 15 min (18620 g). Luego se removió cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70% frío y se recentrifugó, descartando el sobrenadante. El sobrenadante remanente fue completamente eliminado por aspiración. El pellet obtenido se resuspendió en solución de elución (el volumen en el cual se resuspende el pellet, es estimado en virtud de la cantidad de éste). Para la solubilización del pellet, se calentó la resuspensión por 10 min a 55 °C y luego se llevó a -80 °C para su conservación.

Finalizado este procedimiento se recuantificó el RNA obtenido, esta vez usando diluciones de 1:50.

Se hicieron diluciones para llevar el RNA a una concentración de trabajo de 1 µg/µl. El cálculo de concentración se hizo de igual forma que para la extracción realizada con Trizol.

Se determinó la integridad del RNA por medio de un gel de agarosa al 1,5 % preteñido bromuro de etidio, en corrida de electroforesis lenta (45 V, 25 mA).

#### **3.4.5 Digestión de trazas de DNA genómico con DNasa I**

Para evitar la interferencia de trazas de DNA genómico en las muestras de RNA total, éstas fueron tratadas con DNasa I, *Amplification Grade* (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en tubos de 0,5 ml y en donde por cada 1 µg de RNA se adicionó 1 µl del 10X DNase I Reaction Buffer ( 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl), 1 µl DNasa I *Amplification Grade* (0,1 U), llevándose a un volumen total de 10 µl con DEPC-*treated water* (Invitrogen). Se incubó por 15 min a temperatura ambiente, después de lo cual se inactivó la DNasa I a través de la adición de 1 µl de EDTA 25 mM. Inmediatamente después se calentó por 10 min a 65 °C. Después de este tratamiento, las muestras fueron utilizadas directamente en RT-PCR.

#### **3.4.6 Transcripción Reversa**

Se sintetizó primera hebra de cDNA por transcripción reversa de muestras de RNA digeridas con DNasa I, previamente obtenidas a partir de las distintas horas del día en estudio.

Se usó transcriptasa reversa y reactivos para síntesis de primera hebra de cDNA comprados a Invitrogen (Bioschile). La transcripción reversa se realizó a partir de 2 µg de RNA, utilizando 100 ng de partidores al azar (hexámeros; Promega), tampón de síntesis de primera hebra 5X (1X), DDT 0,1 M (10 mM), deoxinucleótidos trifosfato (0,5 mM) y *SuperScript II RNase H* (10 U), en un volumen final de 20 µl. Las muestras de RNA total fueron llevadas a 10 µl en DEPC-H<sub>2</sub>O y denaturadas a 70 °C durante 10 min. En seguida, la reacción de transcripción reversa fue montada en hielo e incubada en el termociclador con el siguiente programa: 25 °C durante 10 min, 42 °C durante 60 min, 90 °C durante 5 min y 4 °C al infinito.

#### **3.4.7 Análisis semicuantitativo de los mRNAs de interés usando transcripción reversa acoplada a reacción de DNA polimerasa en cadena (RT-PCR)**

Mezclas de cDNA total de cada hora en estudio fueron utilizadas para establecer el rango lineal de ciclos para la amplificación (curvas de eficiencia de PCR) de los mRNA de interés, en tanto que ya había sido estandarizado previamente el número de ciclos óptimos para el gen *housekeeping* ( $\beta$ -actina). Las mezclas de reacción de PCR contuvieron 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada deoxy-NTP, 0.2 µM de cada partidador de PCR, 1.25 U Taq DNA polimerasa y 2 µl (10%) del producto de transcripción reversa en un volumen total de 25 µl. La reacción de PCR se realizó en un termociclador *PerkinElmer GeneAmp 2400 System* (PerkinElmer Inc, MA, USA) y consistió de un paso de denaturación inicial a 93 °C por 3 min, seguido por 12-36 ciclos (dependiendo del fragmento de PCR amplificado; **Tabla 1**) de 94 °C por 40 s, 50-60 °C (dependiendo del par de partidores usado; **Tabla 1**) por 1 min y 72 °C por 1

min 20 s. Al término de los ciclos de PCR, las muestras fueron sometidas a una extensión final a 72 °C por 10 min y mantención a 4 °C. Bajo estas condiciones, se determinó el número óptimo de ciclos para cada uno de los 4 cDNAs totales de interés (**Tabla 1**). Alícuotas de 10 µl de los productos de PCR fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% preteñidos con bromuro de etidio. La imagen de cada gel fue capturada usando el programa computacional *Doct* (UVP, Inc. Upland, CA) conectado a una cámara digital (*Olympus Camedia Master 4.1*); y la densidad de la banda fue analizada con el programa computacional *Scion Image* (*Scion Corporation*; [www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)).

En base a este procedimiento, se midió la expresión relativa de los mRNAs de los 4 genes de interés por RT-PCR semicuantitativo en muestras de RNA total obtenidas de ratas *Sprague Dawley*. Cada muestra fue amplificada en 3 ensayos separados para cada gen de interés.

#### **3.4.8 Cálculo de razones gen reloj/ $\beta$ -actina para determinar expresión diferencial en el tiempo**

El procedimiento recién descrito permitió determinar las condiciones adecuadas para amplificar semicuantitativamente cada gen de interés, en particular el número óptimo (subsaturante) de ciclos de PCR arrojado por las curvas de eficiencia generadas utilizando mezclas de cDNA total.

Alícuotas de 10 µl de los productos de amplificación fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa 1,5%, preteñidos de bromuro de etidio. En cada gel fueron sembrados ordenadamente los productos obtenidos para cada una de las horas

de estudio, lo cual se hizo para cada uno de los 4 genes. La imagen de cada gel fue capturada usando el programa computacional *DocIt* (*UVP, Inc. Upland, CA*) conectado a una cámara digital (*Olympus Camedia Master 4.1*); y cada una de las bandas fue analizada con el programa computacional *Scion Image* (*Scion Corporation, www.scioncorp.com*), que permite determinar la cantidad de píxeles en el área bajo la curva, dada por la “densidad” de la banda en el gel. Una vez determinada la cantidad de píxeles para cada uno de los productos de los genes de interés, junto al producto de amplificación del gen constitutivo ( $\beta$ -actina), se calcularon las razones con el fin de normalizar y así comparar las posibles variaciones en la expresión relativa de cada gen en las diferentes horas del día. Para ello, se aplicó la siguiente relación:

$$\boxed{\text{Razón del gen reloj}} = \frac{\text{Píxeles del producto de PCR de gen reloj a cada hora}}{\text{Píxeles del producto de PCR de } \beta\text{-actina a cada hora}}$$

### 3.4.9 Análisis de datos

Solamente se analizaron muestras de RNA total no-degradado y libre de DNA genómico. Además, todas las muestras de RNA total consideradas exhibieron una razón de absorbancia a 260/280 nm entre 1,8 y 2,0; que corresponde a valores dentro del rango óptimo para una extracción eficiente de RNA-libre de proteínas y fenol.

En todos los experimentos, se calculó la razón mRNA de interés / mRNA de  $\beta$ -actina y después de transformación arcoseno de dichos valores, se realizó análisis estadístico por ANOVA y Neumann-Keuls como análisis post-hoc. Se generaron gráficos para visualizar la posible expresión oscilatoria de los genes reloj. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa computacional *GraphPad Prism*

(versión 4.00.255; *GraphPad Software Inc*, San Diego, CA, USA). Los resultados fueron considerados significativos cuando los valores P fueron  $< 0,05$ .

### 3.5 PCR en tiempo real (qPCR)

La expresión relativa de los mRNAs de  $\beta$ -actina, *Clock*, *Per2*, *Cry2*, *Bmal1* y *MT1* fue medida por RT-PCR cuantitativo (qPCR) en cDNAs totales de muestras de adrenal recolectadas a las 0200, 0600, 1000, 1400, 1800 y 2200 h. De cada uno de los puntos horarios se usó 1,5  $\mu$ g de RNA para sintetizar la primera hebra de cDNA. Las correspondientes muestras de RNA total fueron digeridas con DNasa I como se describió previamente (ver punto 3.4.5). Para la amplificación por PCR en tiempo real, usamos partidores previamente publicados (**Tabla 2**). Por cada punto horario se obtuvieron 3 series de cDNA total, las cuales fueron analizadas en paralelo.

Para los fines de qPCR se usó el sistema *LightCycler* 1,5 (Roche Diagnostics), junto al kit *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 10  $\mu$ l en presencia de 0,3  $\mu$ M final de partidores sentido y antisentido para los diferentes genes en estudio, 5,2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O PCR-grade, 1,2  $\mu$ l de solución de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1  $\mu$ l *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* y 2  $\mu$ l de cDNA (sintetizado a partir de 1,5  $\mu$ g de RNA). Como en toda reacción de PCR, fue necesario estandarizar la temperatura y tiempos de *annealing* y extensión, como también el número adecuado de ciclos (**Tabla 3**).

El seguimiento de los resultados para cada uno de los genes, se facilitó por el empleo del programa computacional *LightCycler3 Front Screen* (Roche Diagnostics). La expresión de los genes de interés fue calculada como la expresión relativa respecto a la

de un gen de referencia ( $\beta$ -actina), de acuerdo a métodos descritos previamente (Pfaffl, 2001). Para cada corrida de PCR, se incorporó una curva estándar la cual se obtuvo por dilución seriada de los productos de PCR purificados de cada transcrito. La pendiente de la curva estándar fue utilizada para calcular la eficiencia de la reacción,  $E = 10^{- (1/\text{pendiente})}$ . Los valores para los *Crossing points* ( $C_p$ ) de cada muestra, se emplearon para calcular el  $E^{-C_p}$  para cada uno de los genes en estudio y  $\beta$ -actina (gen de referencia) y así poder obtener la razón entre ambos,  $E^{-C_{p,\text{gen}}} / E^{-C_{p,\beta\text{-actina}}}$ . Los valores  $C_p$  para  $\beta$ -actina fueron prácticamente los mismos, lo cual validó su uso como gen de referencia.

El análisis de datos se realizó de acuerdo a lo descrito en los puntos **3.4.8** y **3.4.9**, donde los resultados fueron considerados significativos cuando el valor de  $P < 0,05$ .

**Tabla 2.** Partidores utilizados para qPCR

	Sentido / Antisentido	GenBank	Producto PCR	
			Posición	pb
<b>Clock</b>	TCTCTTCAAACAGACGCC / TGCGGCATACTGGATGGAAT	NM_021856 Kamphuis <i>et al</i> , 2005	Bases 1939-2048	110
<b>Per2</b>	CACCCTGAAAAGAAAGTGCGA / CAACGCCAAGGAGCTCAAGT	NM_031678 Kamphuis <i>et al</i> , 2005	Bases 1916-2063	148
<b>Bmal1b</b>	CCGATGACGAACTGAAACACCT/ TGCAGTGTCCGAGGAAGATAGC	NM_024362 Kamphuis <i>et al</i> , 2005	Bases 1016-1230	215
<b>Cry2</b>	GGATAAGCACTTGGAAACGGAA / ACAAGTCCCACAGGCGGT	NM_133405 Kamphuis <i>et al</i> , 2005	Bases 729-883	155
<b><math>\beta</math>-actina</b>	GCTCCTCCTGAGCGCAAG / CATCTGCTGGAAGGTGGACA	NM_031144 Dijk <i>et al</i> , 2004	Bases 1072-1146	75
<b>MT1</b>	TTTACTATCGTGGTGGACATCC/ GCACTAACTTGACAATGCAGATATC	GI:10567523 Kobayashi <i>et al</i> , 2005	Bases 96-301	206



**Tabla 3.** Programas para amplificar genes reloj,  *$\beta$ -actina* y *MT1* por qPCR

<b>Gen</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo incubación (s)</b>	<b>N° de ciclos</b>
<i><b><math>\beta</math>-actina</b></i>	Denaturación 95 <i>Annealing</i> 60 Extensión 70	8 8 6	40
<i><b>Bmal1</b></i>	Denaturación 95 <i>Annealing</i> 64 Extensión 72	8 8 10	40
<i><b>Per2</b></i>	Denaturación 95 <i>Annealing</i> 62 Extensión 72	8 8 10	45
<i><b>Cry2</b></i>	Denaturación 95 <i>Annealing</i> 60 Extensión 72	8 8 8	50
<i><b>Clock</b></i>	Denaturación 95 <i>Annealing</i> 68 (*) Extensión -----	8 12	45
<i><b>MT1</b></i>	Denaturación 94 <i>Annealing</i> 57 Extensión 72	8 6 11	50

(\*) Paso de *annealing* y extensión en un sólo segmento de temperatura y tiempo (PCR *Touchdown*).

### **3.6 Western blot de proteínas reloj**

#### **3.6.1 Extracción de proteínas totales**

Tres ratas fueron sacrificadas por decapitación cada 4 h a lo largo de las 24-h (1000, 1400, 1800, 2200, 0200 y 0600 h), e inmediatamente se obtuvieron las adrenales, hígado e hipotálamo. El procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril. Una vez extraído el tejido, éste fue lavado en tampón de lisis, sin inhibidor de proteasas (bicarbonato de amonio 50 mM, EDTA 1mM) y cortado finamente con escalpelo. El volumen de buffer de lisis, incluyendo cóctel de inhibidores de proteasas 2X (10  $\mu$ l de inhibidor por cada 10 ml de tampón de lisis), que debe agregarse a cada tejido, fue calculado en virtud del peso de un par de adrenales de rata macho (por cada par de adrenales de ~ 50 mg de peso, se necesitan 500  $\mu$ l de tampón de lisis). De acuerdo a lo anterior, los volúmenes requeridos fueron: 1,5 ml para las adrenales, 2 ml para el bloque de hipotálamo y 3 ml para el de tejido hepático. Las muestras se homogenizaron en Ultraturrax alternando 3 rotaciones de 15 s con reposo en hielo. Luego se sonicaron alternando 3 rondas de 20 s con reposo en hielo. Posteriormente las muestras fueron traspasadas a tubos *Eppendorf* de 1,5 ml y centrifugadas a 12000 g por 45 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se consideró como extracto total de proteínas solubles.

#### **3.6.2 Cuantificación de proteínas**

Para determinar la concentración del extracto de proteínas solubles se utilizó el método de Bradford (1976), el cual se basa en la afinidad de las proteínas por el colorante azul de Coomassie.

Se preparó una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 2 µg/µl y a partir de ésta se prepararon una serie de diluciones de 1; 0,5; 0,25 y 0,125 µg/µl. Las diferentes concentraciones de BSA se utilizaron para construir una minicurva de calibración.

Tanto para la curva de BSA, como para el extracto, se midió un volumen de 5 µl al cual se agregaron 95 µl de agua destilada y finalmente 1000 µl de reactivo de Bradford 1X, usando como blanco el tampón de lisis. Se incubó por 15 min y se leyó absorbancia a 595 nm. La reacción es estable por aproximadamente 1 h. En el caso del extracto de hígado e hipotálamo fue necesario hacer una dilución previa a la adición de reactivo de Bradford (25 y 10 veces, respectivamente), para que los valores de absorbancia estuviesen dentro de la curva de BSA.

Los resultados se muestran en la **Tabla 6**. Para calcular la concentración del extracto de proteínas se aplicó la siguiente relación:

$$Y = BX + A$$

$$:Y = A_{595nm}$$

:B y A son constantes obtenidas de la regresión lineal de los valores para la curva de calibración con BSA.

:X corresponde a la concentración de proteínas del extracto en µg/µl.

Una vez que se cuantificaron las proteínas del extracto, se corrió un gel de integridad para analizar la calidad del extracto, cargando 50 µg de proteína por surco.

### 3.6.3 Separación electroforética en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico cuya función es desnaturalizar proteínas mediante su unión alrededor de la cadena de aminoácidos, confiriéndole una carga negativa proporcional a su longitud. En su presencia, la migración de las proteínas está determinada por su peso molecular.

La separación electroforética de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 10%, en el sistema de electroforesis *Mini Protean III*, siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Los geles separador y espaciador de 1,5 mm de espesor, se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida al 30%. El gel separador se preparó a una concentración final de poliacrilamida del 10% conteniendo Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,198%. El gel espaciador se preparó a una concentración final de poliacrilamida del 4%, conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,198%. Las muestras de proteínas fueron mezcladas con tampón de carga 2X (Tris-HCl 133 mM pH 6,8,  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol, 4,4% SDS) y calentadas a 100 °C por 5 min. Posteriormente las muestras fueron cargadas en el gel, realizándose la electroforesis en tampón de corrida 1X (Tris, glicina, SDS) con un voltaje de 90 V por un tiempo aproximado de 1 h.

### 3.6.4 Electrotransferencia y detección inmunoquímica

Una vez concluida la separación electroforética, las muestras de proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF, previamente activada en metanol absoluto de alto grado por 15 s y equilibrada en tampón de transferencia 1X por entre

15-20 min. La electrotransferencia se realizó en el sistema *Mini Trans Blot*, para lo cual, sobre una esponja embebida en tampón de transferencia 1X (Tris, glicina) se depositaron secuencialmente: un trozo de papel filtro Whatman N° 1, la membrana de PVDF, el gel a transferir y luego otro papel filtro, todo lo cual fue cubierto con otra esponja embebida en la misma solución. El “sandwich” se colocó en la cámara de electrotransferencia conteniendo tampón de transferencia. Las condiciones de transferencia fueron 4 h a 75 mA, 15 h a 50 mA o bien 1 h a 300 mA. Transcurrido este tiempo, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente y luego se guardó a 4 °C para el análisis inmunoquímico posterior.

Para el análisis inmunoquímico se rehidrataron las membranas con metanol absoluto y luego se bloqueó con solución de bloqueo (PBS 1X, BSA 3%, Tween 20 0,05%) por 40 min. Luego se lavó 15 min con PBS 1X pH 7,4. Una vez terminado el lavado, se incubó con primer anticuerpo en sus respectivas diluciones (anti-CLOCK 1:200, anti-PER1 1:200, anti-PER2 1:200, anti-CRY2 1:3000, anti-BMAL1 1:200 y anti-ACTINA 1:200) por alrededor de 1 h 45 min. Finalizado este tiempo se lavó durante 20 min con PBS 1X pH 7,4 y se dejó secar la membrana a 37 °C por 15 min. Posteriormente se incubó con segundo anticuerpo (anti IgG conejo 1:35000-1:50000) entre 30 y 45 min. Una vez finalizada la etapa, se lavó nuevamente con PBS 1X pH 7,4. En este momento se utilizó el kit comercial *Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate*, en el cual se mezclaron partes iguales de los dos reactivos (Luminol : *Enhancer*) y se vertieron sobre la membrana, dejándolo actuar por 15 min a 37 °C. Luego de este tiempo se descartó el exceso de solución y la membrana fue expuesta a película Kodak Biomax MR, la cual registró la emisión del Luminol. La reacción se

detuvo retirando la película de la membrana y enseguida se reveló con reactivo D-72 y se fijó con reactivo U-3 (Kodak). Esta parte final del procedimiento se realizó en condiciones de oscuridad (cuarto de revelado fotográfico).

### **3.6.5 Tinción de los geles con azul de Coomasie**

Para verificar la calidad de los extractos proteicos, así como también la eficiencia de la electrotransferencia, concluida la electroforesis y la transferencia según corresponda, los geles se tiñieron con una solución de azul de *Coomasie* R-250 0,1% (P/V), metanol 50% (V/V) y ácido acético 7,5% (V/V) durante 30 min y luego se lavaron en una solución de metanol 30% (V/V) y ácido acético 10% (V/V) para eliminar el exceso de colorante. Estos resultados fueron documentados mediante fotografía digital del gel sobre un transiluminador de luz blanca.

### **3.7 Análisis de datos de las proteínas reloj**

La imagen de cada placa fotográfica fue capturada usando el programa computacional *Doct* (*UVP, Inc. Upland, CA*) conectado a una cámara digital (*Olympus Camedia Master 4.1*); y cada una de las bandas fue analizada con el programa computacional *Scion Image* (*Scion Corporation, www.scioncorp.com*), que permite determinar la cantidad de píxeles en el área bajo la curva.

Se calculó la razón proteína de interés/ACTINA y después de transformación arcoseno de dichos valores, se realizó análisis estadístico por ANOVA y Newman-Keuls como análisis post-hoc. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa computacional *GraphPad Prism* (versión 4.00.255; *GraphPad Software Inc, San Diego,*

CA, USA). Los resultados fueron considerados significativos cuando los valores P fueron  $< 0.05$ .

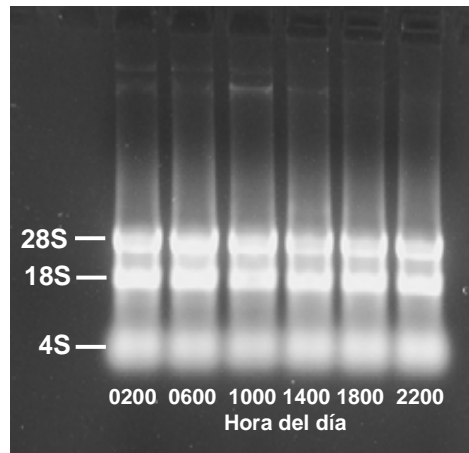
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Extracción y evaluación de RNA total de glándula adrenal de rata, obtenido cada 4 h a lo largo de las 24-h.

Las razones de absorbancia 260/280 nm y las concentraciones obtenidas para cada una de las muestras de RNA total se presentan en la **Tabla 4**. Para el análisis electroforético, cada uno de los surcos del gel de agarosa 1,5% preteñido con bromuro de etidio, fue cargado con 2 µg de extractos de RNA total de adrenal de rata (**Figura 5**). La integridad del RNA total se evidencia al observar los rRNA 28/18S, ya que ambos constituyen más del 90% del RNA presente en las células. Una muestra de trabajo óptima es aquella donde la banda correspondiente al rRNA 28S es mayor que la del 18S; si se da la condición inversa, entonces la muestra puede ser desechada por degradación del RNA.

Ninguna de las muestras de RNA total presentó contaminación apreciable por DNA genómico, lo cual se determina por la ausencia de tinción en los pocillos de carga. El DNA genómico, por su gran tamaño no penetra en los geles de agarosa al 1,5%.





**Figura 5. Electroforesis de RNA para analizar cantidad relativa, posible degradación y contaminación por DNA genómico de las muestras de adrenal de rata obtenidas en las 24-h.** Gel de agarosa al 1,5%, preteñido con bromuro de etidio. Imagen digital monocromática de las muestras de RNA total obtenidas cada cuatro horas, durante un período de 24 h (0200, 0600, 1000, 1400, 1800 y 2200) Se indican las bandas correspondientes a las subunidad mayor (28S) y menor (18S) de rRNA, así como el tRNA (4S). La hora del día se indica bajo cada surco.

**Tabla 4.** Razón  $A_{260/280}$  y concentración de las muestras de RNA total de adrenal de rata (extraídas con reactivo Trizol).

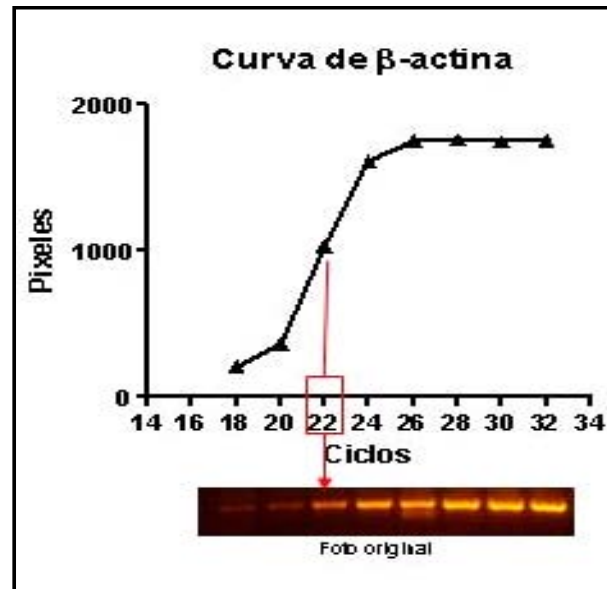
<b>Muestra</b>	<b>Hora del día</b>	<b><math>A_{260/280}</math></b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>
<b>Glándula adrenal</b>	<b>0200</b>	1,94	2,74
	<b>0600</b>	2,0	2,34
	<b>1000</b>	2,3	2,76
	<b>1400</b>	2,2	2,12
	<b>1800</b>	2,0	2,40
	<b>2200</b>	2,0	2,63

Se indican las razones de absorbancia 260/280 nm (rango óptimo 1,8-2,0; indica la pureza del RNA) y las concentraciones en  $\mu\text{g}$  de RNA/ $\mu\text{l}$ . Cada muestra corresponde a RNA total obtenido de 3 ratas por punto horario en estudio ( $n=6$  adrenales/extracto; cada una aporta aproximadamente 20 mg de tejido); por lo que el número total de animales empleados es 18. Se prepararon, para cada una de las muestras, alícuotas de una concentración de trabajo de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## 4.2 Análisis de expresión oscilatoria de genes reloj a través de RT-PCR semicuantitativo

### 4.2.1 Estandarización de las condiciones de RT-PCR semicuantitativo

La estandarización para la reacción de RT-PCR semicuantitativo de cada gen reloj, se llevó a cabo mediante curvas de eficiencia de la amplificación de productos de PCR para determinar el número óptimo de ciclos; a intervalos de dos ciclos por reacción de amplificación para un total de 8 puntos. Como templado se usó una mezcla de cDNAs total provenientes de muestras de adrenal de rata, previamente obtenidos por transcripción reversa de las muestras de RNA total. Se construyeron curvas de eficiencia de cada uno de los 4 genes reloj. En la **Tabla 1** se describen las  $T_m$  y temperaturas de *annealing* utilizadas para la amplificación de cada producto de PCR gen-específico, así como el número óptimo de ciclos de amplificación determinados para el mismo efecto. A modo de ejemplo, en la **Figura 6** se muestra la curva de determinación del número óptimo de ciclos a utilizar para la amplificación del mRNA de  $\beta$ -actina.

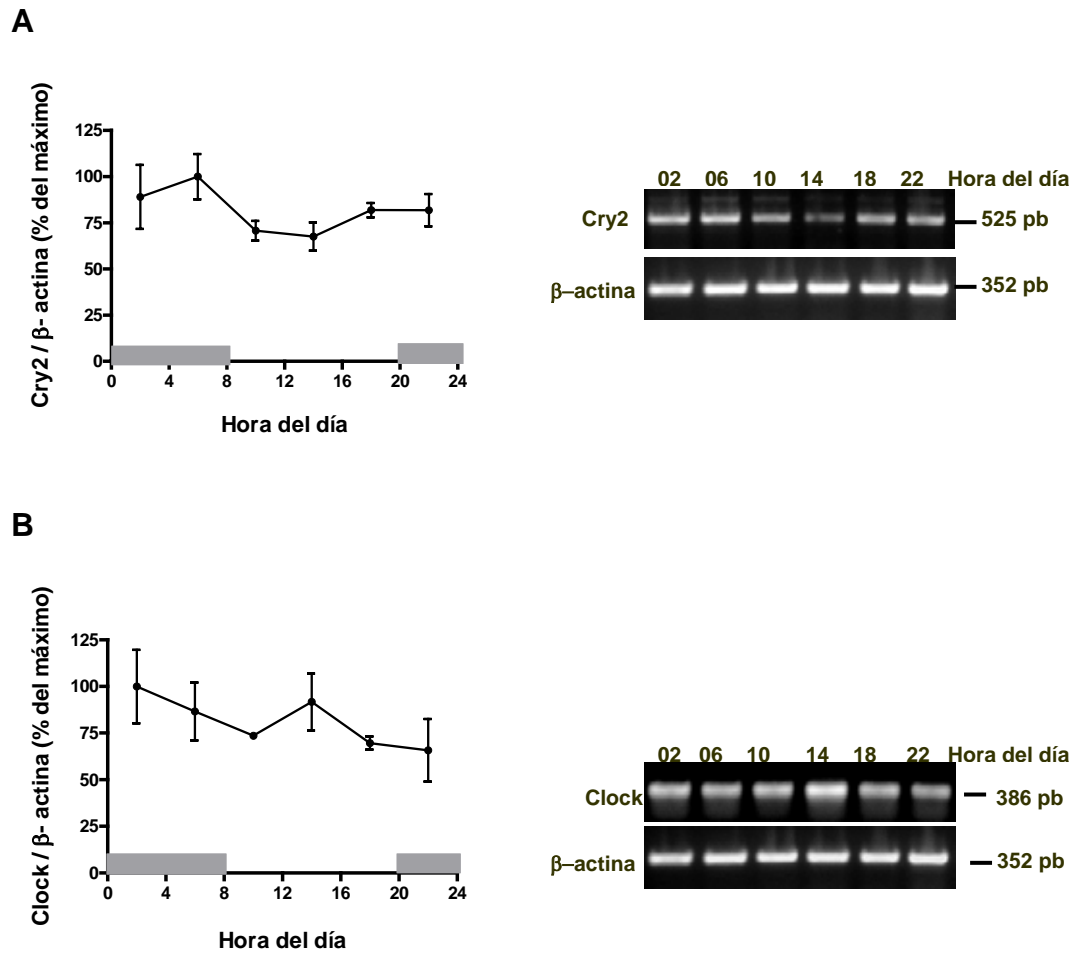


**Figura 6.** Curva de eficiencia de PCR para el mRNA de  $\beta$ -actina. Resultado final para selección del número óptimo de ciclos de PCR para  $\beta$ -actina. Este procedimiento se hizo para cada cDNA de interés.

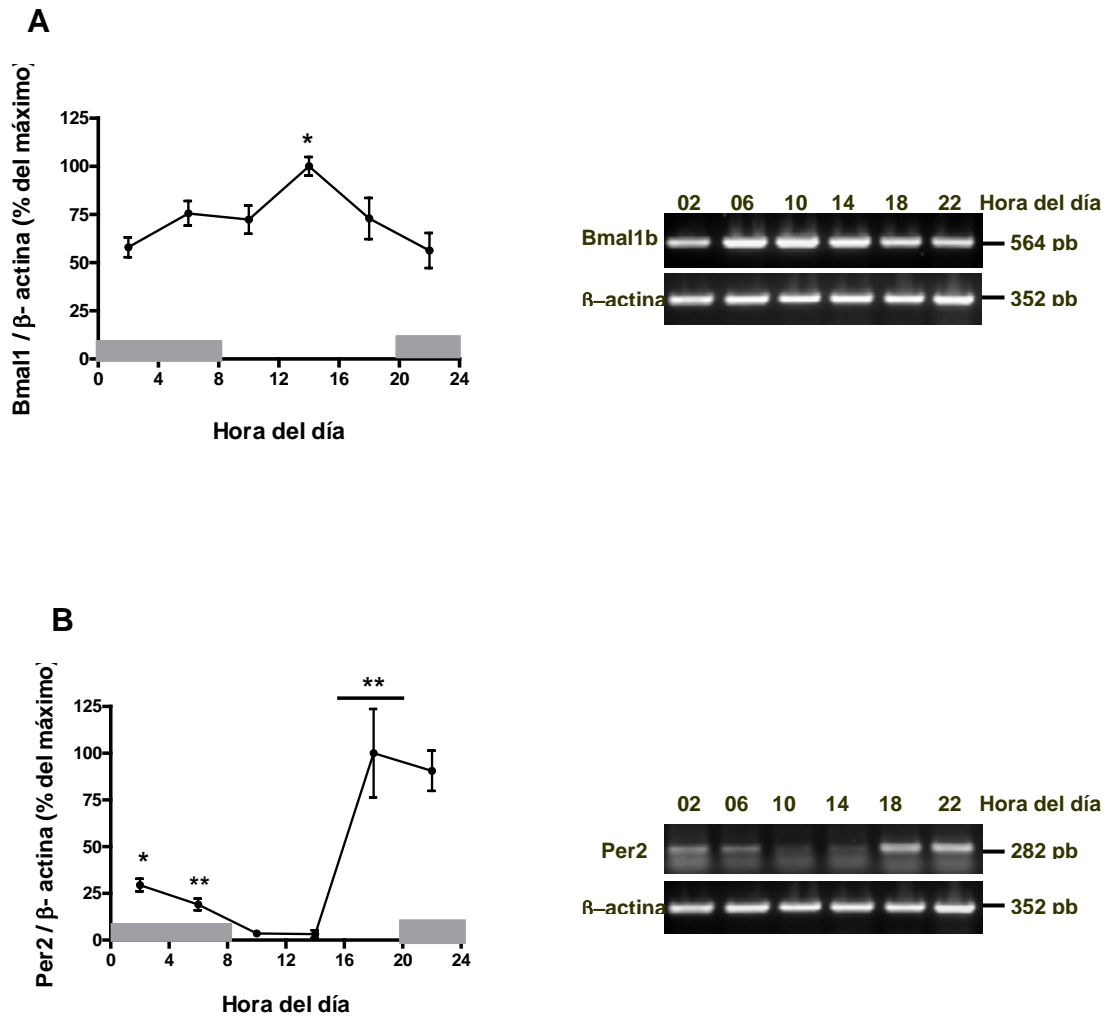
#### **4.2.2 Análisis de expresión oscilatoria de genes reloj a través de RT-PCR semicuantitativo**

Se sintetizó cDNA total a partir de 2  $\mu$ g de RNA total de las adrenales de rata obtenidas a cada una de las horas de interés, con el fin de amplificar los genes reloj *Clock*, *Cry2*, *Bmal1* y *Per2*. El análisis estadístico de las razones entre el gen reloj versus el gen constitutivo  $\beta$ -actina, arrojó que el mRNA de *Cry2* oscila moderadamente (**Figura 7A**), el mRNA de *Clock* no oscila (**Figura 7B**), en tanto que los mRNAs de *Bmal1* y *Per2* oscilan con alta amplitud (**Figura 8A y B**, respectivamente).

Para determinar si las diferencias en las razones de mRNA de interés/mRNA de  $\beta$ -actina detectadas a partir de muestras de RNA total de glándula adrenal son significativas, se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una entrada y Newman-Keuls como análisis de post-hoc.



**Figura 7. Patrón circadiano de expresión de los transcritos reloj *Cry2* y *Clock* en la adrenal de rata *in vivo*.** Análisis estadístico para el cual se trabajó con 3 animales por punto de tiempo, medidos en cuadruplicado Promedios  $\pm$  SEM. Las barras en gris sobre el eje X indican las horas de oscuridad. ANOVA de muestras repetidas y test de comparación múltiple de Newman-Keuls como post-hoc.



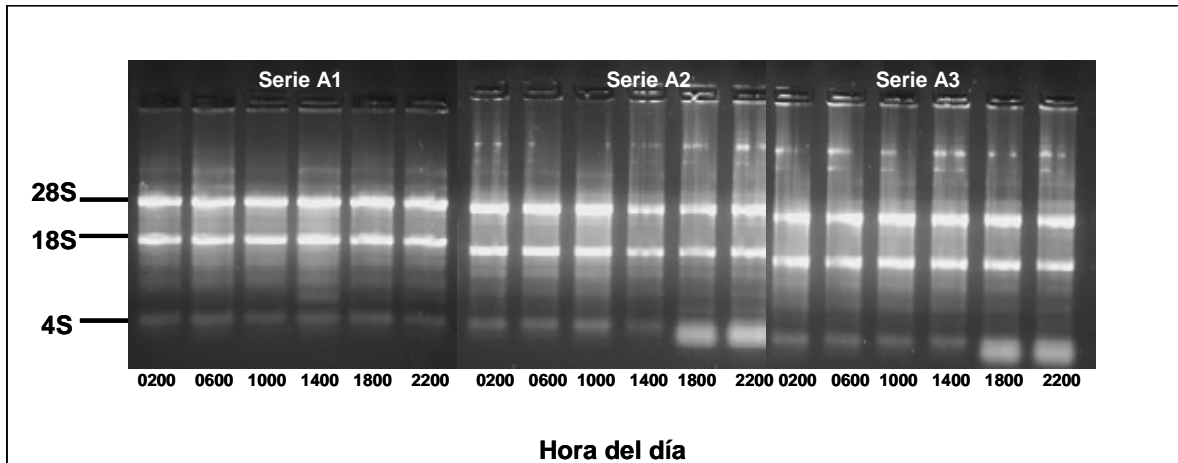
**Figura 8. Patrón circadiano de expresión de los transcritos reloj *Bmal1* y *Per2* en la adrenal de rata *in vivo*.** Para el análisis estadístico se trabajó con 3 animales por punto de tiempo, medidos en cuadruplicado. Promedios  $\pm$  SEM. Las barras en gris sobre el eje X indican las horas de oscuridad. ANOVA de muestras repetidas y test de comparación múltiple de Newman-Keuls como post-hoc (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ ).

### 4.3 Análisis de expresión oscilatoria de genes reloj mediante PCR en tiempo real (qPCR)

#### 4.3.1 Evaluación de las muestras de RNA total

Al igual que para RT-PCR semicuantitativo, las muestras de RNA total se sometieron a evaluación mediante espectrofotometría y electroforesis. Las concentraciones obtenidas para cada una de las muestras de RNA se presentan en la **Tabla 5**. La integridad de estas muestras de RNA total se verificó mediante la observación de las bandas correspondientes a rRNA 18S y 28S (**Figura 9**). Todos los parámetros analizados indicaron que las muestras de RNA total eran de calidad apropiada para continuar su análisis mediante RT/qPCR.





**Figura 9. Electroforesis de RNA para analizar cantidad relativa, posible degradación y contaminación por DNA genómico de las muestras de adrenal de rata obtenidas en tres series por un período de 24-h.** Gel de agarosa al 1,5%, preteñido con bromuro de etidio. Imagen digital monocromática de las muestras de RNA total obtenidas cada cuatro horas, durante un período de 24 h (0200, 0600, 1000, 1400, 1800 y 2200 h) Se indican las bandas correspondientes a las subunidad mayor (28S) y menor (18S) de rRNA, así como el tRNA (4S). La hora del día se indica bajo cada surco. Se cargaron 2  $\mu\text{g}$  de todas muestras. La extracción de RNA para los 3 grupos de muestras se hizo con *RNAqueous-Midi Large Scale Phenol-Free Total RNA Isolation Kit* (Ambion).

**Tabla 5.** Razón  $A_{260/280}$  y concentración de RNA total de 3 series de muestras de adrenal de rata (extraídas con sistema Ambion).

Muestra	Hora del día	$A_{260/280}$	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
<b>SERIE A1</b>				
<b>Glándula adrenal</b>	<b>0200</b>	1,8	1,11	
	<b>0600</b>	1,6	1,19	
	<b>1000</b>	1,5	1,39	
	<b>1400</b>	1,7	0,91	
	<b>1800</b>	1,6	0,63	
	<b>2200</b>	1,8	1,19	
	<b>SERIE A2</b>			
	<b>0200</b>	1,6	2,89	
	<b>0600</b>	1,5	2,59	
	<b>1000</b>	1,9	0,79	
	<b>1400</b>	1,7	0,91	
	<b>1800</b>	1,8	0,56	
	<b>2200</b>	1,7	0,67	
	<b>SERIE A3</b>			
	<b>0200</b>	1,5	2,73	
	<b>0600</b>	1,6	2,27	
	<b>1000</b>	1,8	0,64	
	<b>1400</b>	1,7	0,91	
<b>1800</b>	1,7	0,84		
<b>2200</b>	1,6	1,13		

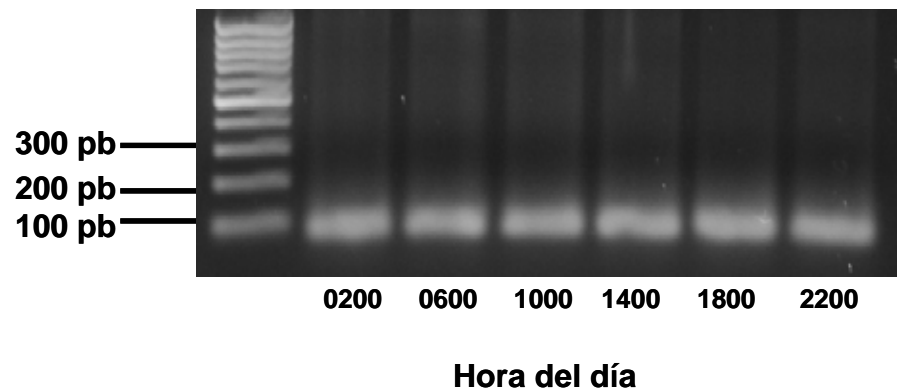
Se muestran las razones de absorbancia 260/280 nm (rango óptimo 1,8-2,0; indica la pureza del RNA) y las concentraciones en  $\mu\text{g}$  de RNA/ $\mu\text{l}$ . Cada serie corresponde a RNA total obtenido de 1 rata por punto horario, por lo que el número total de animales empleados para las 3 series es de 18. Todas aquellas muestras cuya concentración resultó mayor a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , fueron diluídas hasta alcanzar la concentración de trabajo de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 4.3.2 Estandarización de la amplificación de transcritos reloj por RT-PCR en tiempo real (RT/qPCR)

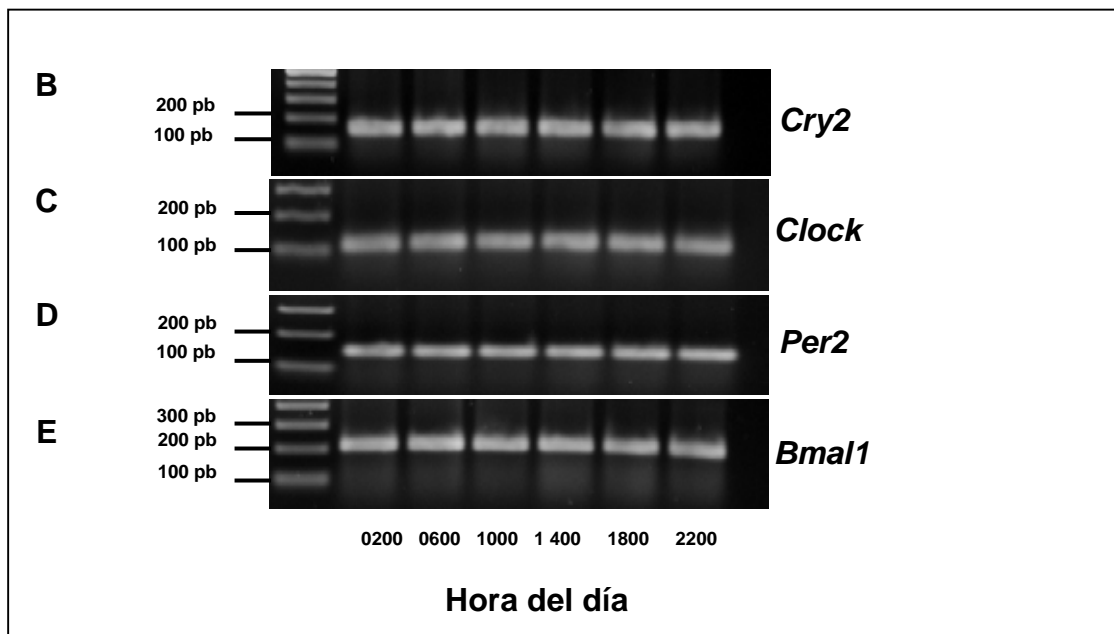
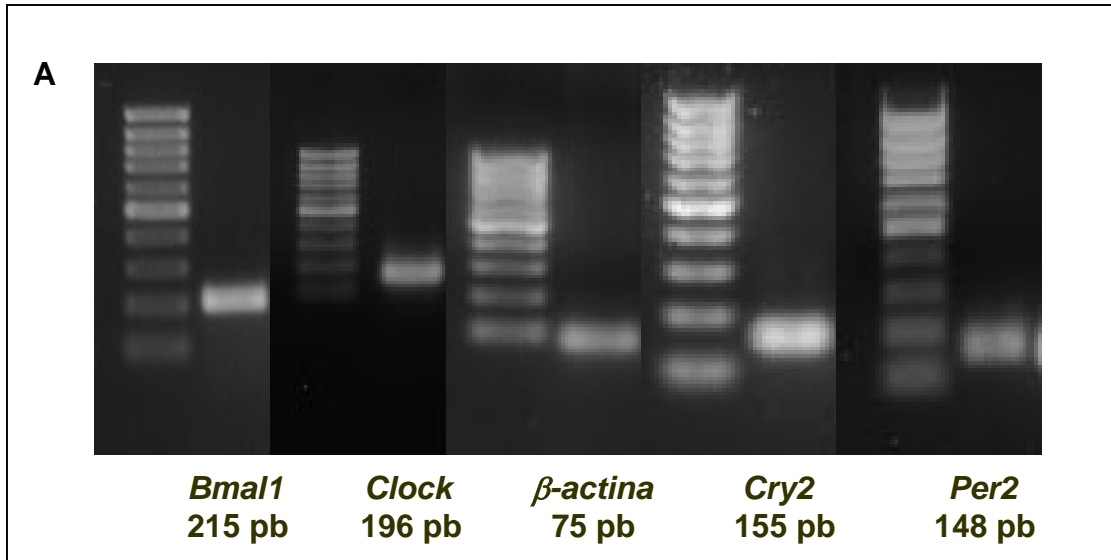
Se estandarizaron los protocolos para la amplificación de cada producto de qPCR gen-específico (tiempo y temperatura de las diferentes etapas de corrida; pre-incubación, amplificación y curva de *melting*), así como también el número óptimo de ciclos de amplificación (**Tabla 3**). El número de ciclos para cada reacción se determinó a través de la amplificación de cada uno de los transcritos reloj en las diferentes series de muestras, tomando inicialmente como número de ciclos de referencia, aquellos empleados para RT-PCR convencional.

En primer término, se corroboró la calidad de cada cDNA de trabajo, mediante una corrida de qPCR para  $\beta$ -actina (**Figura 10**). El criterio empleado para discriminar un cDNA de buena calidad, fue la uniformidad en el  $C_p$  para cada uno de los triplicados de muestra.

La obtención de productos de qPCR únicos y de tamaño esperado para cada transcrito reloj, se muestra en la **Figura 11A y 11B**, para productos finales de mezclas de cDNA y series completas de cDNA total; respectivamente.



**Figura 10. Análisis de la calidad de los cDNAs obtenidos a partir de RNA total de adrenal de rata, mediante amplificación de  $\beta$ -actina por RT/qPCR.** Imagen digital monocromática del gel de agarosa 1,5%/bromuro de etidio. Surcos de izquierda a derecha son: marcador de tamaño de DNA (100 pb); productos de PCR obtenidos para cada uno de los puntos horarios en estudio (0200, 0600, 1000, 1400, 1800, 2200 h). La banda que se observa en los 6 surcos corresponde al fragmento esperado de 75 pb para  $\beta$ -actina. Las muestras provienen de ratas sacrificadas cada 4 h a lo largo de las 24-h.



**Figura 11. Análisis electroforético de transcritos reloj amplificados por RT/qPCR.**

**(A)** Electroforesis en geles de agarosa 1,5% (1,8% para  $\beta$ -actina), preteñidos con bromuro de etidio. Todos los genes reloj estudiados se transcriben en adrenal de rata adulta, rindiendo productos de qPCR únicos y del tamaño esperado después de la amplificación de mezclas de cDNA. **(B-E)** Geles representativos (1 de 3 series) de agarosa 1,5%/bromuro de etidio. Surcos ordenados de izquierda a derecha son: marcador de tamaño de DNA (100 pb); productos de PCR obtenidos para cada uno de los puntos horarios en estudio (0200, 0600, 1000, 1400, 1800, 2200 h). En este caso, donde se amplificaron los cDNAs independientes de cada serie, también se observó un único producto de qPCR de tamaño esperado. **(B)**, Cry2; **(C)**, Clock; **(D)**, Per2; y **(E)**, Bmal1b.

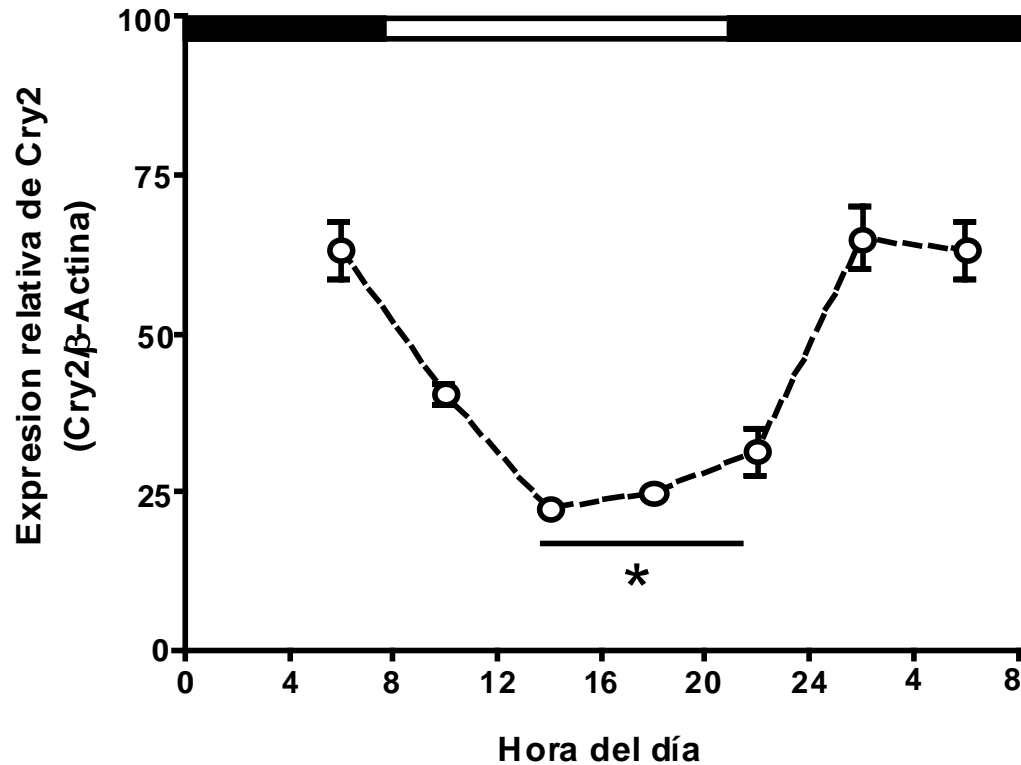
### 4.3.3 Análisis de expresión de genes reloj mediante qPCR

Se sintetizó cDNA total a partir de 1,5 µg de RNA total de adrenales de rata obtenidas a cada una de las horas de interés, con el fin de amplificar los genes reloj *Clock*, *Cry2*, *Bmal1* y *Per2*.

En cada corrida de qPCR se incorporó una curva estándar, la cual se obtuvo por diluciones sucesivas (1:10) de los productos de PCR purificados de cada gen, con el fin de obtener la pendiente. Este valor nos permitió calcular la eficiencia de cada reacción, además de la razón entre el gen reloj y el gen de referencia  $\beta$ -actina (ver Métodos).

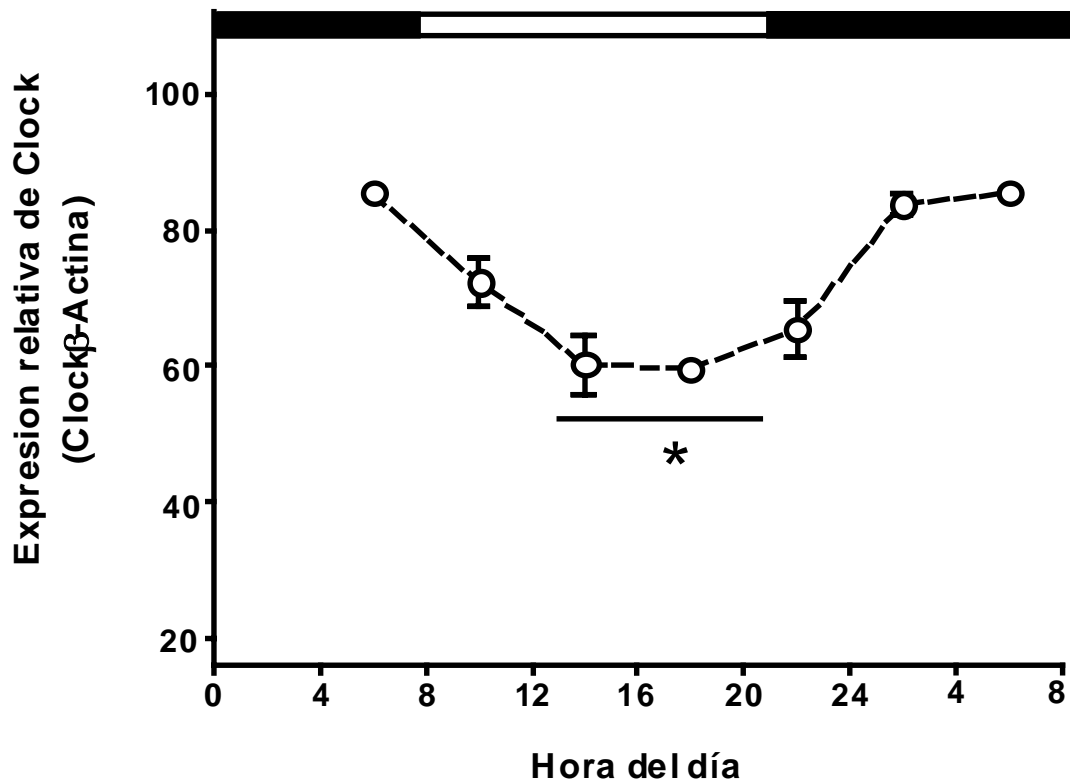
El análisis de expresión relativa mediante qPCR arrojó que los mRNAs de *Cry2* y *Clock* oscilan moderadamente (**Figuras 12 y 13**), en tanto que los mRNAs de *Per2* y *Bmal1* oscilan con alta amplitud (**Figuras 14 y 15**); alcanzando valores máximos en intervalos horarios opuestos ( $P < 0,001$ ).

En la **Figura 16** se muestra la expresión oscilatoria de alta amplitud y en antifase para los mRNAs de *Bmal1b* y *Per2* en adrenal de rata, determinada mediante los presentes experimentos de qPCR. La curva obtenida se ajusta a una función teórica de tipo seno, lo que refleja oscilación en antifase del elemento positivo (*Bmal1b*) y negativo (*Per2*) del mecanismo molecular del reloj contenido en la glándula adrenal de rata *in vivo*.

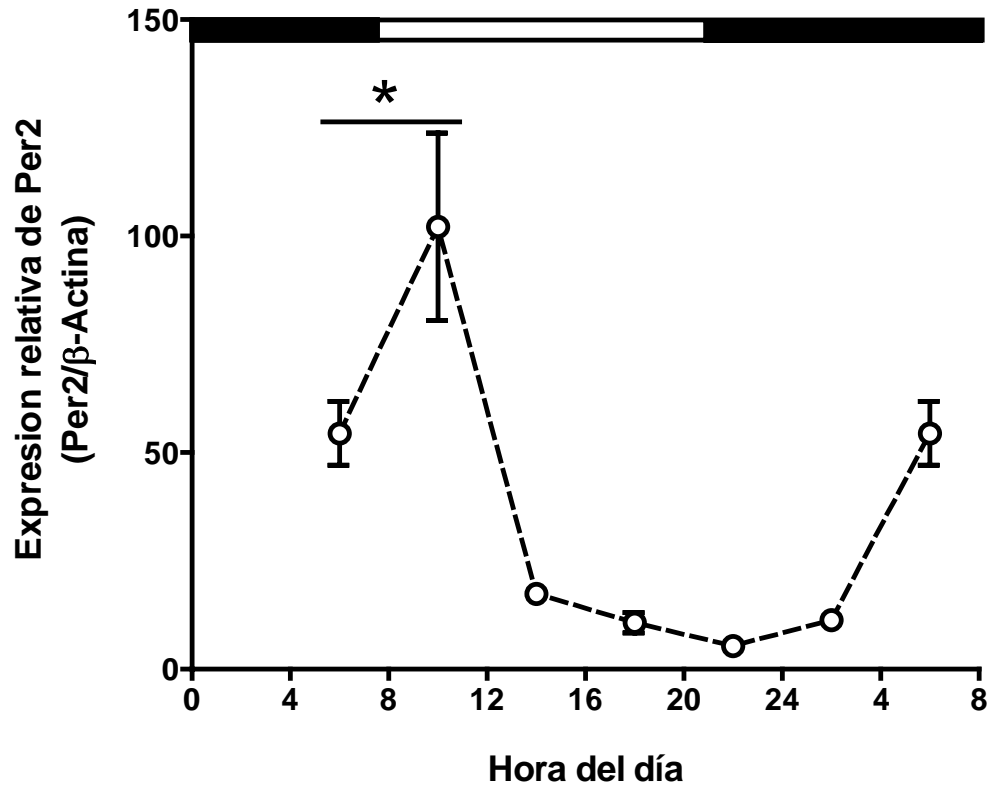


**Figura 12. Expresión relativa de *Cry2* en adrenal de rata *in vivo*.** Análisis estadístico para el cual cada punto de tiempo se midió en triplicado. Promedio  $\pm$  SEM. Se obtuvo RNA total de adrenales cada 4 h a lo largo de las 24-h y se sometió a transcripción reversa seguido de qPCR. Los datos fueron normalizados como se describe en Métodos. \*, distinto a las otras horas del día ( $P < 0,001$ ; ANOVA y Newman-Keuls). La barra horizontal superior en blanco y negro indica luz encendida y apagada, respectivamente. Ver curva de *melting point* en Anexo (7.1 A).

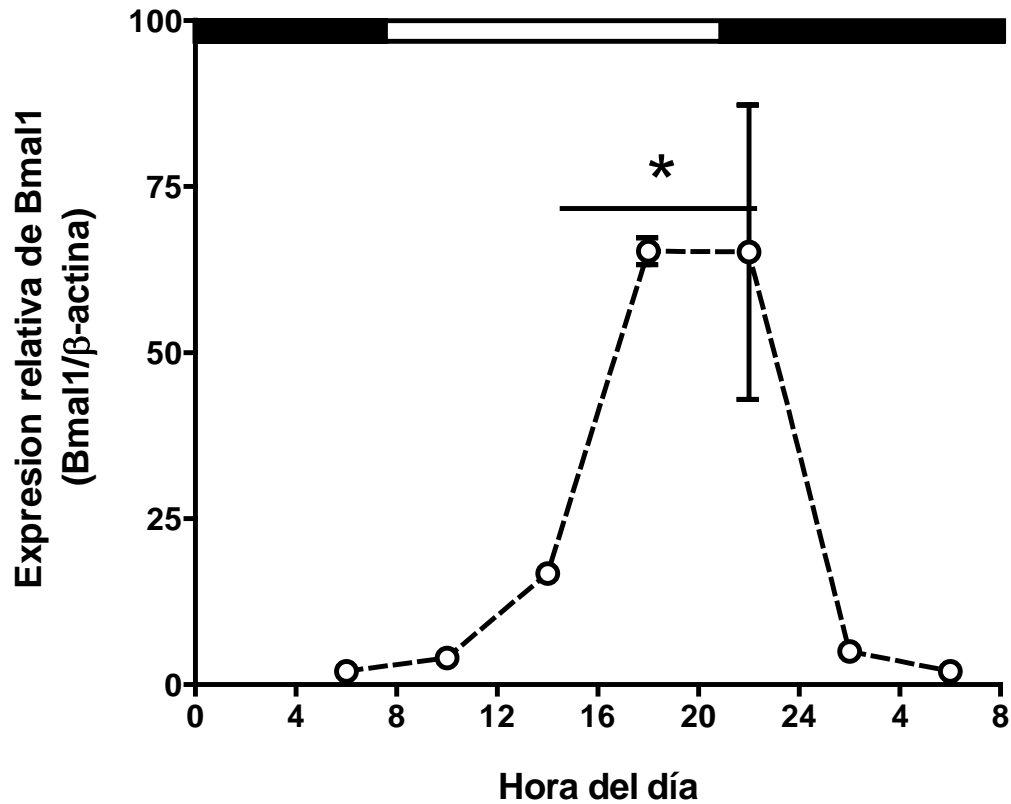




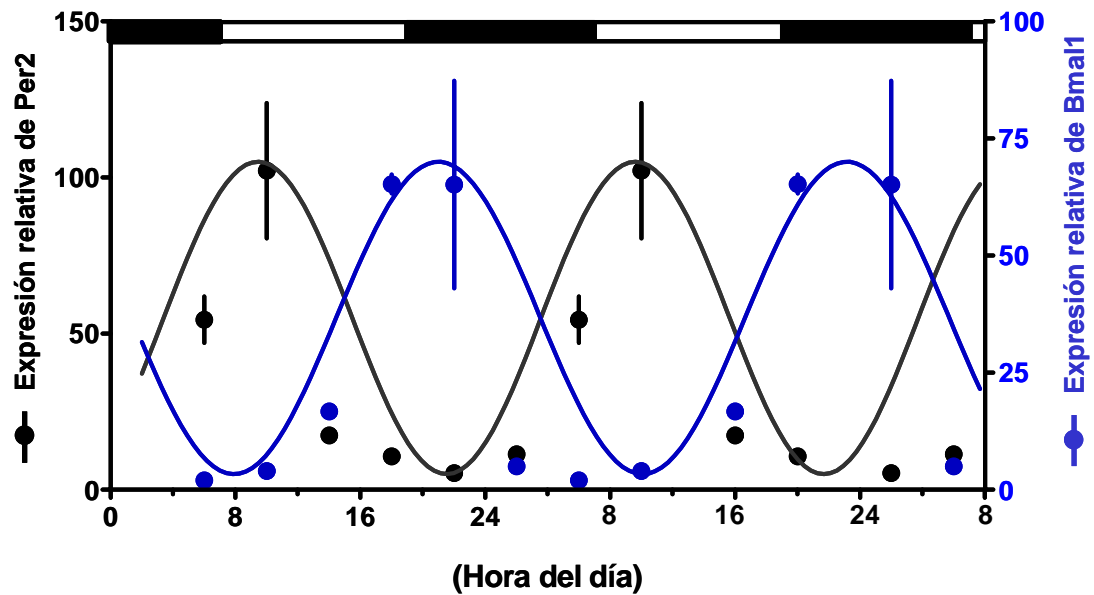
**Figura 13. Expresión relativa de *Clock* en adrenal de rata *in vivo*.** Análisis estadístico para el cual cada punto de tiempo se midió en triplicado. Promedio  $\pm$  SEM. Se obtuvo RNA total de adrenales cada 4 h a lo largo de las 24-h y se sometió a transcripción reversa seguido de qPCR. Los datos fueron normalizados como se describe en Métodos. \*, distinto a las otras horas del día ( $P < 0,001$ ; ANOVA y Newman-Keuls). La barra horizontal superior en blanco y negro indica luz encendida y apagada, respectivamente. Ver curva de *melting point* en Anexo ( **7.1 B**).



**Figura 14. Expresión relativa *Per2* en adrenal de rata *in vivo*.** Análisis estadístico para el cual punto de tiempo se midió en triplicado. Promedio  $\pm$  SEM. Se obtuvo RNA total de adrenales cada 4 h a lo largo de las 24-h y se sometió a transcripción reversa seguido de qPCR. Los datos fueron normalizados como se describe en Métodos. \*, distinto a las otras horas del día ( $P < 0,001$ ; ANOVA y Newman-Keuls). La barra horizontal superior en blanco y negro indica luz encendida y apagada, respectivamente. Ver curva de *melting point* en Anexo (7.1 C).



**Figura 15. Expresión relativa de *Bmal1* en adrenal de rata *in vivo*.** Análisis estadístico para el cual cada punto de tiempo se midió en triplicado. Promedio  $\pm$  SEM. Se obtuvo RNA total de adrenales cada 4 h a lo largo de las 24-h y se sometió a transcripción reversa seguido de qPCR. Los datos fueron normalizados como se describe en Métodos. \*, distinto a las otras horas del día ( $P < 0,001$ ; ANOVA y Newman-Keuls). La barra horizontal superior en blanco y negro indica luz encendida y apagada, respectivamente. Ver curva de *melting point* en Anexo (7.1 D).



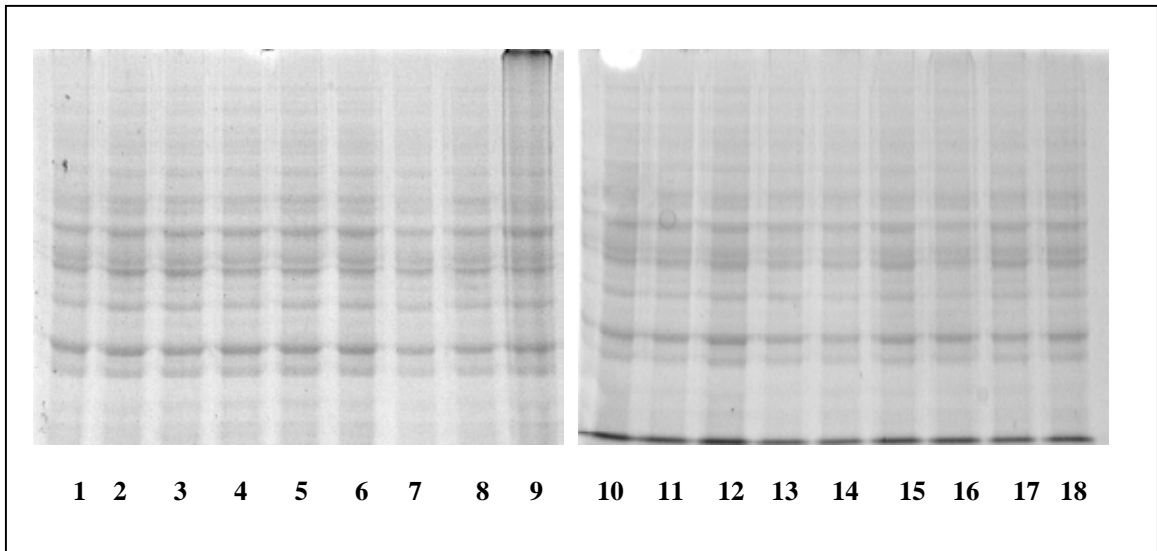
**Figura 16.** Representación de la expresión oscilatoria de *Per2* y *Bmal1*. En líneas se describe la función seno teórica para *Per2* (círculos negros) y *Bmal1* (círculos azules) y que muestran la hora a la que se encuentra la máxima expresión de cada gen (acrofase). Se debe notar que estos genes están en antifase ya que los máximos se encuentran separados exactamente por 12 horas

#### 4.4 Extracción y evaluación de proteínas totales de adrenal de rata

La estandarización de la extracción de proteínas totales se realizó verificando la calidad de los extractos proteicos mediante tinción de geles PAGE-SDS con azul de *Coomassie*.

Los resultados de la cuantificación de proteínas mediante espectrofotometría (método de Bradford), se muestran en la **Tabla 6**.

Los extractos proteicos de adrenal de rata y de los tejidos usados como control (datos no mostrados), presentaron un patrón de bandas continuo y característico para cada tejido, que se mantuvo entre los diferentes extractos obtenidos. Bandas bien definidas fueron aparentes en todo el rango del gel (pesos moleculares altos, intermedios y bajos), lo cual es un buen indicador de ausencia de degradación (**Figura 17**).



**Figura 17. Evaluación electroforética de extractos de proteínas totales de adrenal de rata.** Gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) al 10%, teñido con azul de *Coomassie*. En cada surco se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína; los carriles corresponden al extracto proteico obtenido para cada uno de los seis puntos horarios estudiados. Carriles: 1-2-3, 0200; 4-5-6, 0600; 7-8-9, 1000; 10-11-12, 1400; 13-14-15, 1800; 16-17-18, 2200 h. No se observa degradación de ninguna de las muestras.

**Tabla 6.** Cuantificación de extractos proteicos totales de adrenal de rata por método de Bradford.

Hora del día	Serie	A <sub>595</sub>	Concentración µg/µl	Volumen µl (*)
1000	1	0,139	1,62	30,8
1000	2	0,055(**)	3,20	15,6
1000	3	0,147	1,72	29,0
1400	1	0,151	1,77	28,2
1400	2	0,160	1,87	26,7
1400	3	0,153	1,79	27,9
1800	1	0,139	1,62	30,8
1800	2	0,145	1,69	29,5
1800	3	0,120	1,40	35,7
2200	1	0,162	1,89	26,4
2200	2	0,148	1,73	28,9
2200	3	0,160	1,87	26,7
0200	1	0,139	1,62	30,8
0200	2	0,130	1,52	32,8
0200	3	0,122	1,39	35,9
0600	1	0,148	1,73	28,9
0600	2	0,050 (**)	2,91	17,1
0600	3	0,152	1,78	28,0

(\*) Volumen de extracto requerido para cargar 50 µg de proteína por surco en un gel SDS-PAGE.

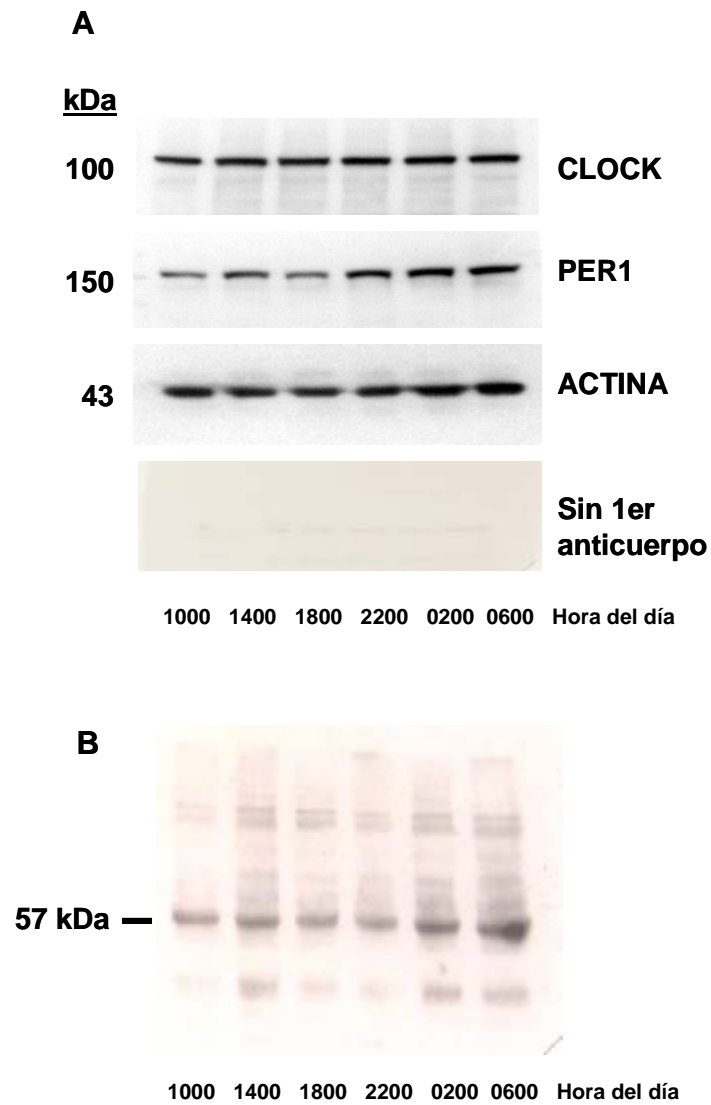
(\*\*) Muestra diluida 5 veces.

#### 4.5 **Western blot de proteínas reloj en adrenales de rata obtenidas cada 4 h a lo largo de las 24-h**

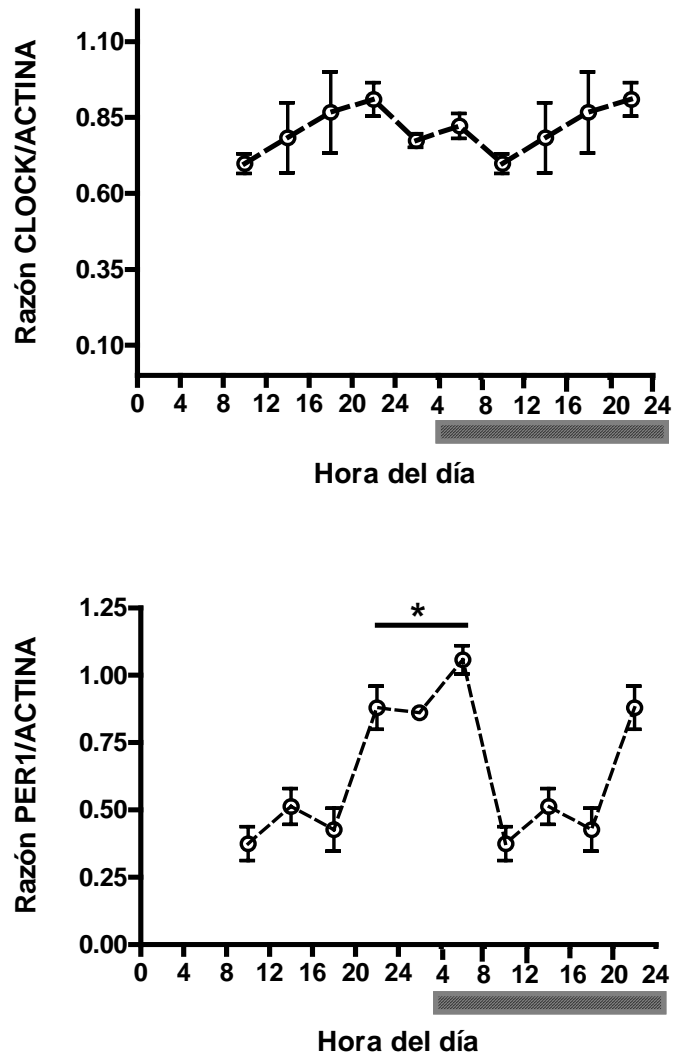
Como se aprecia en la **Figura 18A**, para cada serie de puntos horarios se detectaron consistentemente las proteínas reloj CLOCK y PER1 en extractos de proteínas totales de adrenal, hígado y NSQ (no se muestran datos de los controles positivos; i.e., hígado y NSQ). En el caso de CRY2, aún cuando se usaron diferentes anticuerpos comerciales, no fue posible reproducir confiablemente los resultados para esta proteína reloj; sin embargo, en la **Figura 18B** se muestra el mejor resultado obtenido. De hecho, en la presente investigación, se utilizaron anticuerpos comerciales dirigidos contra otras proteínas reloj (PER2 y BMAL1), los cuales no rindieron resultados satisfactorios.

Mediante densitometría digital seguida por análisis estadístico (ANOVA y Newman-Keuls), se determinó que la proteína CLOCK no oscila, en tanto que la proteína PER1 exhibe una oscilación robusta ( $P < 0,001$ ). Tanto los resultados densitométricos calculados para la proteína CLOCK como PER1, fueron normalizados contra la proteína constitutiva ACTINA (**Figura 19**).





**Figura 18. Detección inmunoquímica de proteínas reloj en adrenal de rata a diferentes horas del día. A)** Resultados consolidados para las proteínas reloj PER1 y CLOCK (antisueros Calbiochem). **B)** Mejor resultado para la proteína reloj CRY2 (antisuero USBiological).



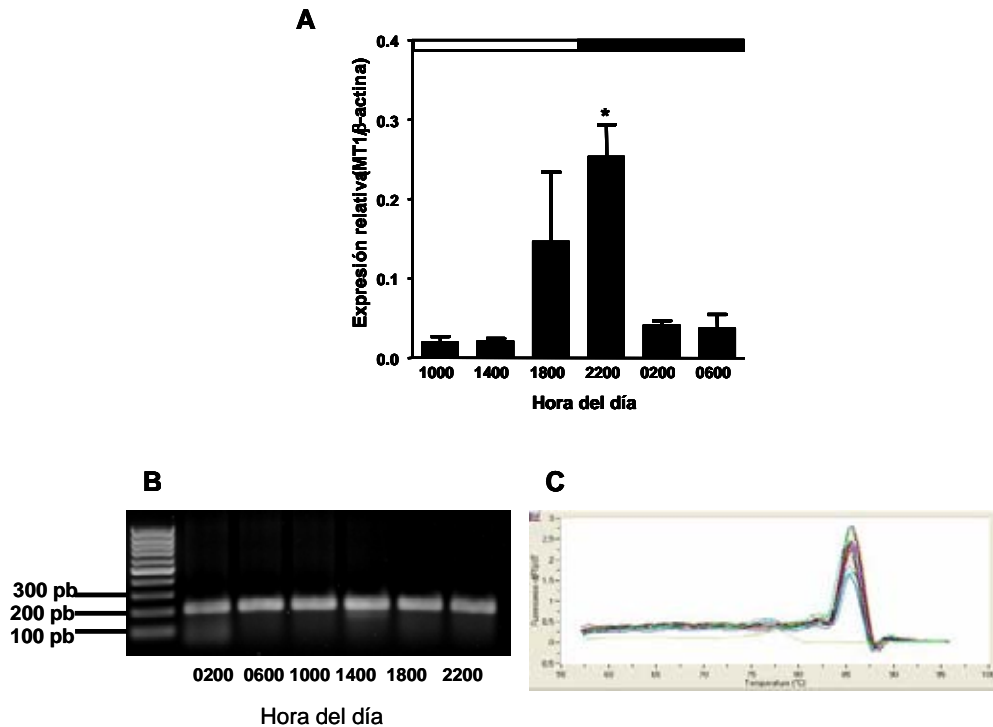
**Figura 19. Expresión relativa de las proteínas reloj CLOCK y PER1 en adrenal de rata *in vivo*.** Análisis estadístico para el cual cada punto de tiempo se midió en triplicado. Promedio  $\pm$  SEM. Se obtuvieron muestras de proteínas totales de adrenales cada 4 h a lo largo de las 24-h. Los datos fueron normalizados como se describe en Métodos. \*, distinto de otras horas del día ( $P < 0,001$ ; ANOVA y Newman-Keuls). La barra gris tachada diagonalmente bajo el eje X indica que los mismos valores están graficados 2 veces ( $P < 0,001$ ).

#### 4.6 Análisis de expresión relativa de la isoforma 1 del receptor de melatonina mediante qPCR

Se sintetizó cDNA total a partir de 1,5 µg de RNA total de adrenales de rata obtenidas cada 4 h a lo largo de las 24-h. Se amplificó el transcrito del receptor *MT1* usando los partidores de PCR mostrados en la **Tabla 2** (estos partidores flanquean el intrón único del mRNA de *MT1*; > 13 Kb). Este experimento fue incluido en la presente Tesis, debido al interés de nuestro grupo de investigación en determinar si melatonina regula la expresión de genes reloj en la adrenal de roedores nocturnos, en particular en rata. De hecho, este hallazgo ha sido descrito en *pars tuberalis* de ratón y rata. Por otra parte, dado que fuimos capaces de establecer variaciones circadianas marcadas de expresión génica en nuestras muestras de RNA total y, considerando datos publicados sobre variaciones diurnas del mRNA de *MT1* en el NSQ y páncreas de rata, se decidió realizar el presente estudio de qPCR de *MT1* a diferentes horas del día.

La estandarización de las condiciones de RT/qPCR del mRNA de *MT1* se llevó a cabo de manera análoga a lo descrito más arriba para genes reloj (datos no mostrados).

El resultado obtenido indica claramente que el mRNA de *MT1* se expresa oscilatoriamente en las 24-h, alcanzando un máximo durante el intervalo 1800-2200 h; con un valor  $P < 0.05$  para las 2200 h (**Figura 20**).



**Figura 20. Expresión relativa del mRNA de *MT1* en adrenal de rata *in vivo* en las 24-h.** (A) Promedio  $\pm$  SEM de puntos de tiempo en triplicado. RT/qPCR de muestras de adrenal obtenidas cada 4-h a lo largo de las 24-h. Los datos fueron normalizados como se describe en Métodos. \*, distinto de otras horas del día ( $P < 0,05$ ; ANOVA y Newman-Keuls). La barra horizontal superior en blanco y negro indica luz encendida y apagada, respectivamente. (B) Gel de agarosa 1,5%/bromuro de etidio de los productos finales (saturados) de qPCR. Surcos de izquierda a derecha son: marcador de tamaño de DNA (100 pb); productos de PCR obtenidos para cada uno de los puntos horarios en estudio (0200, 0600, 1000, 1400, 1800 y 2200 h). Se obtuvo siempre un único producto de qPCR de 206 pb. (C) Determinación del *melting point* del amplímero de *MT1* ( $T_m \sim 85$  °C); indicando que la reacción de amplificación presenta una alta eficiencia, sin formación importante de dímeros.

## 5 DISCUSION

La glándula adrenal es indispensable para la supervivencia. Los glucocorticoides y mineralocorticoides secretados por la corteza adrenal son importantes en la regulación de la homeostasis de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y glucosa, la respuesta inmune y en los mecanismos de respuesta al *stress* (Orth y Kovacs, 1998; Ross *et al*, 2005). En este contexto, es relevante entender la regulación temporal de las complejas vías esteroidogénicas que operan en este tejido. En la mayoría de las especies, la concentración plasmática de glucocorticoides muestra un marcado ritmo circadiano. En la rata, un mamífero nocturno, el máximo de corticosterona plasmática se encuentra al comienzo de la noche, coincidiendo con el inicio de las horas de actividad (Orth y Kovacs, 1998). La producción de glucocorticoides involucra la acción concertada del ritmo circadiano de ACTH, inervación adrenal y factores adrenales locales (Dallman *et al*, 1978; Bornstein y Chrousos, 1999; Engeland y Arnhold, 2005). Sin embargo, existe evidencia muy reciente que sugiere la participación de factores reguladores adicionales tales como la capacidad oscilatoria intrínseca de la glándula adrenal como un reloj periférico (Ishida *et al*, 2005; Lemos *et al*, 2006; Oster *et al*, 2006a; Torres-Farfan *et al*, 2006a; Watanabe *et al*, 2006) y la neurohormona melatonina (Torres-Farfan *et al*, 2003, 2004, 2006b). La presente Tesis muestra, por primera vez, que la glándula adrenal de rata (i) contiene un oscilador periférico y (ii) exhibe transcripción circadiana del receptor de melatonina MT1.

Encontramos una expresión circadiana robusta de los transcritos reloj *Per2* y *Bmal1*, mientras *Cry2* exhibió una oscilación muy atenuada en las 24-h. A su vez, el

nivel del mRNA de *Clock* no cambió con la hora del día. Al comparar los resultados de RT-PCR convencional y cuantitativo, pudimos comprobar una buena correlación entre los transcritos con variaciones diarias de baja amplitud, es decir *Cry2* y *Clock*. Sin embargo, se observaron diferencias horarias en el máximo de expresión de los mRNAs de *Per2* y *Bmal1* en las 24-h, lo cual puede ser explicado de diferentes maneras. Por una parte, las muestras de RNA se obtuvieron usando distintos animales y métodos de extracción. En segundo lugar, los partidores de PCR también fueron distintos y, por lo tanto, la eficiencia de PCR convencional y en tiempo real no son directamente comparables. Finalmente, es difícil establecer un paralelo entre PCR convencional y en tiempo real. En el primer caso, se analizan las densidades relativas de los productos finales de amplificación derivadas de la intercalación de bromuro de etidio; mientras que en PCR en tiempo real, se consideran funciones matemáticas cuantitativas, derivadas de la aparición de productos de amplificación a medida que éstos se van generando.

La robusta oscilación en antifase que determinamos para *Per2* y *Bmal1*, así como la casi nula oscilación circadiana de los mRNAs de *Clock* y *Cry2* en adrenal de rata, concuerdan con hallazgos en el NSQ y otros osciladores periféricos de roedores nocturnos (Reppert y Weaver, 2002; Okamura *et al*, 2002; Balsalobre, 2002; Yamamoto *et al*, 2004).

Un dato consistente de la literatura es que en tejidos periféricos, los genes reloj son expresados con un retardo promedio de 6 h respecto del ritmo del NSQ (Balsalobre *et al*, 2000; Damiola *et al*, 2000; Stokkan *et al*, 2001; Richter *et al*, 2004). En particular, el máximo de expresión de los mRNAs de *Per1-2* y *Cry1-2* se posiciona en la mitad de las horas de luz, mientras que los transcritos de *Bmal1* se acumulan a la mitad de la

noche (revisado en Richter *et al*, 2004). El máximo del mRNA de *Bmal1* que detectamos en adrenal de rata a las 2000 h, presenta un retardo de 18 h respecto del NSQ. Sorprendentemente, este prolongado retardo para el transcrito de *Bmal1* entre adrenal y NSQ de rata, también fue encontrado al comparar ambos tejidos por qPCR en el mono capuchino, un primate diurno (Torres-Farfan *et al*, manuscrito en preparación). Es difícil explicar las 18 h de retardo de los máximos de *Bmal1* para NSQ/adrenal en contraposición a las 6 h descritas previamente para NSQ/otros tejidos periféricos.

Una posibilidad es que el reloj periférico de la adrenal tanto de roedores nocturnos como primates diurnos esté sujeto a un proceso de sincronización temporal diferente a los demás osciladores periféricos. En este contexto, habría que considerar el impacto de señales sincronizadoras adrenal-específicas. En primer lugar, en la rata se ha descrito una vía de inervación que utiliza al sistema nervioso autónomo para conectar al NSQ con la corteza adrenal. La funcionalidad de esta vía se demostró al aplicar un pulso de luz en la noche; tratamiento que disminuyó la concentración plasmática de corticosterona en ratas con el NSQ intacto pero no en ratas sometidas a lesión del NSQ (Buijs *et al*, 1999). En segundo lugar, aún cuando no existe evidencia experimental que sugiera la participación de ACTH en la regulación de la expresión de genes reloj, es importante hacer notar que las señales intracelulares activadas por ACTH involucran cambios en el nivel de cAMP (Orth y Kovacs, 1998). La región promotora de los genes reloj esenciales *Per1* y *Per2* contiene elementos funcionales de respuesta a cAMP (sitios CRE; Travnickova-Bendova *et al*, 2002), lo que permitiría una potencial regulación de su expresión por ACTH. Actualmente, en nuestro laboratorio se está investigando esta posibilidad.

Nuestros estudios inmunoquímicos usando anticuerpos policlonales contra CRY2, CLOCK y PER1, arrojaron pesos moleculares de 57, 100 y 150 kDa, respectivamente; lo cual concuerda con los rangos esperados. Se debe considerar que todas las proteínas reloj sufren una cantidad importante de modificaciones post-traduccionales (Gallego *et al*, 2007), por lo cual sus migraciones electroforéticas pueden variar en varios kDa entre diferentes publicaciones. Al igual que para los mRNAs reloj, en osciladores periféricos se ha mostrado que las proteínas reloj -exceptuando CLOCK- siguen patrones de expresión oscilatorios de alta amplitud en las 24-h; por ejemplo, en el hígado, PER1, PER2, CRY1, CRY2 y BMAL1 son expresadas rítmicamente (Lee *et al*, 2001). Recientemente se demostró que las proteínas reloj son inmunodetectables en la corteza y médula adrenal de ratón y oscilan con la misma fase (Torres-Farfan *et al*, 2006). En el presente trabajo, debido a serias dificultades de estandarización de varios anticuerpos comerciales, nos vimos limitados a seguir sólo los patrones de expresión circadiana de CLOCK y PER1 mediante *Western blot* semicuantitativo. La proteína reloj PER1 presentó un patrón oscilatorio en las 24-h, con un máximo bien definido en el intervalo horario 2200-0600 h. Nuestros resultados también indican niveles estables de la proteína CLOCK en adrenal de rata a lo largo de las 24-h, lo cual concuerda con la situación descrita en ratones; de hecho, la proteína CLOCK es considerada un antígeno nuclear expresado constitutivamente en el NSQ murino (Maywood *et al*, 2003; von Gall *et al*, 2003). Respecto a la expresión de proteínas reloj en el oscilador maestro, la variación circadiana de factores negativos del mecanismo molecular del reloj está bien establecida, dado que PER1, PER2 y CRY1 se acumulan en el núcleo de neuronas del NSQ al término del día y desaparecen al final de la noche (Maywood *et al*, 2003).



Se han identificado diferentes tipos de señales sincronizadoras de los ritmos circadianos, como temperatura, actividad locomotora, privación de sueño, leptinas, péptido liberador de gastrina, esteroides, opiodes y melatonina (revisado en Oster, 2006b); los cuales son colectivamente denominados efectores no fóticos. De ellos, melatonina plasmática es el coordinador circadiano y estacional mejor estudiado (Reiter, 1993). De hecho, se ha mostrado que esta neurohormona afecta la expresión de genes reloj en la *pars tuberalis* de ratones y ratas, región de la hipófisis que presenta una alta densidad de receptores de melatonina (von Gall *et al*, 2002 y 2005; Dardente *et al*, 2003).

Recientemente, nuestro grupo abrió una nueva veta de investigación al demostrar la expresión de los receptores funcionales de melatonina en glándula adrenal de mono capuchino y rata (Torres-Farfan *et al*, 2003, 2004, 2006ayb y Richter *et al*, manuscrito en preparación; respectivamente). La idea de la presente Tesis, de seguir la expresión circadiana del mRNA de MT1 en adrenal de rata *in vivo*, es poder facilitar el análisis de los efectos de melatonina sobre la expresión de genes reloj en cultivos de adrenal, al conocer las horas del día a las cuales la respuesta a melatonina debiera ser mas pronunciada. De hecho, nuestros análisis de los niveles del transcrito de *MT1* por qPCR indicaron una marcada variación diurna (alcanzando valores máximos en el intervalo horario 1800-2200 h). Estos resultados concuerdan bien con datos publicados de variaciones diurnas de la transcripción de *MT1* en el NSQ y páncreas de rata (Gauer *et al*, 1993 y Peschke *et al*, 2006; respectivamente). Por otra parte, el alza y caída abrupta de los niveles del transcrito de *MT1*, el cual es detectable sólo 4 h al día sobre un *background* de expresión marginal, explica muy bien hallazgos recientes de nuestro

grupo de investigación, que indican la presencia de la proteína MT1 y unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina a las 2200 pero no 0800-1000 h (Richter *et al*, manuscrito en preparación). Preliminarmente, el transcrito de *MT2* exhibe un patrón oscilatorio similar al de *MT1*, pero alcanza niveles de expresión mucho más reducidos; en tanto que el mRNA del putativo receptor nuclear de melatonina ROR $\alpha$  también fue detectado, pero no cuantificado (resultados no mostrados).

En una Tesis paralela de nuestro laboratorio, se demostró que melatonina inhibe la producción de corticosterona estimulada por ACTH en cultivos de adrenal de rata. Un hallazgo notable que se desprendió de este experimento, fue que el efecto de melatonina depende fuertemente de la hora del día (Richter *et al*, manuscrito en preparación). Esto abre la interesante posibilidad que la inhibición de la producción de corticosterona por melatonina involucre un efecto de ésta sobre el mecanismo molecular del reloj periférico de la adrenal. En este contexto, cobra relevancia un hallazgo reciente de nuestro grupo de investigación, dando cuenta de efectos de melatonina sobre la expresión de los mRNA reloj *Per2* y *Bmal1* en la adrenal de mono capuchino en cultivo. La administración de 100 nM melatonina inhibió fuertemente el máximo del transcrito *Per2* al inicio del tratamiento, y el de *Bmal1* varias horas después (Torres-Farfan *et al*, manuscrito en preparación). En estos experimentos, no se midió el nivel del transcrito *Cry2*. Sin embargo, otros experimentos involucrando el uso de RNAi (*antisense Cry2*), indicaron una reducción significativa de la producción de cortisol en adrenal de mono capuchino en cultivo (Torres-Farfan C, Valenzuela FJ, Seron-Ferre M; resultados preliminares). Es posible que melatonina juegue un papel como señal de sincronización circadiana para la expresión de genes reloj o, alternativamente, de genes

río abajo de los genes reloj en la glándula adrenal. Esta última posibilidad ha sido demostrada en fetos de mono capuchino, para el mRNA de la enzima limitante de la síntesis de cortisol, 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (Torres-Farfan *et al*, 2004).

La expresión rítmica de cada uno de los genes reloj estudiados sugiere fuertemente que la función de la adrenal de rata cambiaría durante el día y que muchas de sus funciones se verían influenciadas por la expresión de estos genes. Dentro de los relojes periféricos, la glándula adrenal constituye un reloj endocrino importante ya que la secreción de glucocorticoides ha sido implicada en la sincronización de otros relojes esclavos (Basalobre *et al*, 2000). De acuerdo a los resultados de Oster y colaboradores (2006a), la expresión mayoritaria de genes reloj se da en las capas más externas de la adrenal, lo cual es consistente con la secreción rítmica de glucocorticoides y mineralocorticoides. Es importante hacer notar que nosotros medimos expresión circadiana de genes reloj en extractos de RNA total y proteínas solubles de la glándula adrenal completa y que, en consecuencia, lo mas probable es que nuestros resultados reflejen la oscilación combinada de genes reloj de corteza y médula. Usando inmunocitoquímica con anticuerpos comerciales contra proteínas reloj, obtuvimos resultados que de alguna manera sugieren que las proteínas reloj PER1 y CLOCK presentan una distribución preferente en las capas fasciculada y glomerulosa de la corteza adrenal (datos no mostrados). Estos resultados preliminares concuerdan con las observaciones publicadas previamente en ratón (Oster *et al*, 2006a; Torres-Farfan *et al*, 2006b).

En los últimos dos años, mientras se estaba desarrollando la presente Tesis, varios autores publicaron que la glándula adrenal presenta capacidad oscilatoria intrínseca, además de la participación de genes reloj en la regulación de la secreción de glucocorticoides y el posible papel sincronizador de melatonina sobre la función circadiana de este tejido. Oster y colaboradores (2006), mediante qPCR e hibridación *in situ*, mostraron la expresión rítmica de genes reloj en la zona glomerulosa y fasciculada de la corteza adrenal. Además, presentaron evidencia sobre el impacto fisiológico de la expresión de los mRNAs de *Per2* y *Cry1*, ya que ratones doble mutante no presentan expresión circadiana de genes reloj, así como tampoco variaciones diurnas de ACTH y corticosterona plasmática. Lemos y colaboradores (2006), usaron como modelo adrenal de mono Rhesus, para demostrar expresión circadiana de genes reloj tanto a nivel de mensajeros como de proteínas reloj. Adicionalmente, estos autores estudiaron la expresión de proteínas reloj por inmunohistoquímica, localizándolas no sólo en corteza, sino también en médula adrenal. Este hallazgo podría vincular la expresión de genes reloj con la síntesis de catecolaminas. Ishida y colaboradores (2005) observaron que el NSQ, una vez que ha sido estimulado por luz, induce la expresión masiva de genes reloj en la corteza adrenal, siendo este mismo estímulo una potente señal secretora de cortisol; lo cual estaría vinculado a cambios fisiológicos periféricos y centrales. Finalmente, Torres-Farfan y colaboradores (2006b), encontraron expresión de proteínas reloj en corteza y médula adrenal de ratones C3H. Estos autores semicuantificaron la expresión de diversas proteínas reloj (PER1, BMAL1 y CRY2) y determinaron que (i) estos polipéptidos se localizan en la corteza y médula, y (ii) oscilan con diferente amplitud pero en fase en ambas capas de la adrenal murina. En esta publicación, la

expresión circadiana de proteínas reloj en los ratones C3H (melatonina proficientes), fue comparada con la de ratones C57BL (melatonina deficientes), estableciéndose que los últimos presentan niveles aplanados y mas bajos de expresión de genes reloj. En base a estos hallazgos, Torres-Farfan y colaboradores (2006) concluyeron que melatonina podría jugar un papel relevante en la sincronización circadiana de la expresión de genes reloj en la glándula adrenal de ratones.

En síntesis, la presente Tesis contribuye a un mayor entendimiento del funcionamiento del sistema circadiano de roedores nocturnos, al describir detalladamente la existencia de un nuevo reloj periférico en la glándula adrenal de rata. Por otra parte, los presentes y otros resultados recientes de nuestro grupo de investigación, demuestran la expresión circadiana de receptores funcionales de melatonina. Esto abre la interesante posibilidad que melatonina opere como un transductor neuroendocrino entre el NSQ y la glándula adrenal de rata, sincronizando la expresión de genes reloj en este tejido; de manera análoga a lo descrito en *pars tuberalis* de roedores nocturnos (Dardente *et al*, 2003; von Gall *et al*, 2002 y 2005).

## 6 REFERENCIAS

Alvarez JD, Chen D, Storer E, Sehgal A (2003). Non-cyclic and developmental stage specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol Reprod*; 69: 81-91.

Andrews RV, Folk GE Jr (1964). Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands. *Comp Biochem Physiol*; 11: 393

Balsalobre A (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*; 309:193-199.

Bornstein SR, Chrousos GP (1999). Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab*; 84:1729-1736.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* ; 72: 248-254.

Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek A (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*; 11: 1535-1544

Carlberg C, Wiesenberg I (1995). The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res*; 18:171-178

Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ, Sassone-Corsi P(2005). Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science*; 309:1390-1394.

Cermakian N, Sassone-Corsi P (2000). Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*;1:59-67.

Dallman MF, Engeland WC, Rose JC, Wilkinson CW, Shinsako J, Siedenburg F (1978). Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH. *Am J Physiol* 235: R210

Damiola F, Le minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-olela F, Schibler U (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*; 14: 2950-2961

Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, Klosen P, Pevet P, Masson-Pevet M (2003). Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res*; 114: 101-106.

Delgado JM, Ferrus A, Mora F, Rubía FJ (1998). *Manual de Neurociencia*, 1ª Edición. Editorial Síntesis, Madrid, Capítulo 30: 778-799.

Dickstein G, Shechner C, Nicholson WE, Rosner I, Shen-Orr Z, Adawi F, Lahav M (1991). Adrenocorticotropin stimulation test: effects of basal cortisol level, time of day, and suggested new sensitive low dose test. *J Clin Endocrinol Metab*; 72:773-8

Dijk F, Kraal-Muller E, Kamphuis W (2004). Ischemia-induced changes of AMPA-type glutamate receptor subunit expression pattern in the rat retina: a real-time quantitative PCR study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 45:330-41.

Dubocovich ML, Markowska M (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*; 2:101-110

Dunlap JC (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*; 96:271-90.

- Edery I (2000). Circadian rhythms in a nutshell. *Physiol Genomics*; 3: 59-74.
- Engeland WC, Arnhold MM (2005). Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* ;28:325-332.
- Etchegaray JP, Lee C, Wade PA, Reppert SM (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*; 21:177-82.
- Fu Z, Inaba M, Noguchi T, Kato H (2002). Molecular cloning and circadian regulation of cryptochrome genes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Biol Rhythms* 17: 14.
- Ganguly S, Coon SL, Klein DC (2002). Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res*; 309: 127-137.
- Gauer F, Masson-Pevet M, Saboureau M, George D, Pevet P (1993). Differential seasonal regulation of melatonin receptor density in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nuclei: a study in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*, L.). *J Neuroendocrinol*; 5:685-90.
- Gallego M, Virshup DM (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*;8:139-148.
- Hirota T, Fukada Y (2004) Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog Sci* ;21: 359-368.
- Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura H (2005). Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab*;2:297-307.



Kamphuis W, Cailotto C, Dijk F, Bergen A, Buijs RM (2005). Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun*; 330:18-26.

Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Iwata T, Fujimoto K, Furukawa M, Miyazaki K, Honma S, Honma K, Kato Y (2004). A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun*; 313:117-24.

Kobayashi H, Kromminga A, Dunlop TW, Tychsen B, Conrad F, Suzuki N, Memezawa A, Bettermann A, Aiba S, Carlberg C, Paus R (2005). A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *FASEB J*; 19:1710-1712

Korf HW, von Gall C (2006). Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol*; 252:57-68.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685.

Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*; 107: 855-867

Lemos D.R., Downs J.L., Urbanski HF (2006) Twenty-four hour rhythmic gene expression in the rhesus macaque adrenal gland. *Mol Endocrinol*; 20:1164-1176.

Lewy AJ, Tetsuo M, Markey SP, Goodwin FK, Kopin IJ (1980). Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J Clin Endocrinol Metab*; 50: 204-205

Lincoln G, Messenger S, Andersson H, Hazlerigg D (2002). Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 13890-13895.

Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*; 302:255-9.

Maywood ES, O'Brien JA, Hastings MH (2003). Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol*; 15: 329-334.

Meier AH (1976). Daily variation in concentration of plasma corticosteroid in hypophysectomized rats. *Endocrinology*; 98:1475-9.

Miyamoto Y, Sancar A (1999). Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Brain Res Mol Brain Res*; 71: 238-243.

Moore-Ede M, Sulzman F, Fuller C (1982). *The clocks that time us*. Harvard University Press, Cambridge MA. Pp: 30-133

Morse D, Cermakian N, Brancorsini S, Parvinen M, Sassone-Corsi P (2003). No Circadian Rhythms in Testis: *Period1* Expression Is Clock Independent and Developmentally Regulated in the Mouse. *Mol Endocrinol*; 17: 141-151.

Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N (1998a). Antiphase circadian expression between *BMAL1* and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun*; 253: 199-203.

Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N (1998b). Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (*rPer2*) mRNA in peripheral tissues. *Neurosci Lett*; 256: 117-119.

Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K (2002). Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*; 309: 47-56.

Okamura H (2004). Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. *J Biol Rhythms*;19:388-399.

Orth DN, Kovacs WJ (1998) The adrenal cortex. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (Eds), *Williams textbook of endocrinology*, 9<sup>th</sup> Edition, WB Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. Pp: 517

Oster H, Damerow S., Kiessling S (2006a). The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab*;4: 163-173.

Oster H (2006b). The genetic basis of circadian behavior. *Genes Brain Behav*;5:73-79.

Oster H, Damerow S, Hut RA, Eichele G (2006c). Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes. *J Biol Rhythms*;21:350-361.

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*;109:307-20.

Park YJ, Park KS, Kim JH, Shin CS, Kim SY, Lee HK (1999). Reproducibility of the cortisol response to stimulation with the low dose (1 microg) of ACTH. *Clin Endocrinol (Oxf)*;51:153-8

Peschke E, Frese T., Chankiewicz E., Peschke D., Preiss U., Schneyer U., Spessert R, Muhlbauer E (2006). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res*; 40:135–143

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*;29:e45.

Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* ;110:251-60.

Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*;247 :975-8.

Reiter RJ.(1991)Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.*;12:151-80

Reiter RJ (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.*; 49:654-664.

Reppert SM, Weaver DR (2000). Comparing clockworks: mouse versus fly. *J Biol Rhythms* ;15:357-64.

Reppert S, Weaver D (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935

Richter HG, Torres-Farfan C, Rojas-Garcia PP, Campino C, Torrealba F, Seron-Ferre M (2004) The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biol Res* 37: 11-28.

Ross R.H., Kaye G.I, Pawlina W.(2005) Histología:Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular, 4ª Edición. Editorial Medica Panamericana Capítulo 20 644-683

Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K, Ishida N (1998). Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem.*;273:27039-27042.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.

Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*; 291: 490-493

Tamaru T, Isojima Y, Yamada T, Okada M, Nagai K, Takamatsu K (2000). Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J Neurosci* 20: 7525

Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-Garcia P, Vergara M, Forcelledo ML, Valladares LE, Torrealba F, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M (2003). mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metab*;88: 450-458

Torres-Farfán C., Richter H.G., Germain AM. (2004) Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J Physiol*; 554:841-856.

Torres-Farfán C., Rocco V, Monso C, Valenzuela FJ, Campino C, Germain AM, Torrealba F, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M (2006a). Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. *Endocrinology*; 147: 4618-4626.

Torres-Farfán C., Serón-Ferré M., Dinet V, Korf HW (2006b) Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J Pineal Res* 40:64-70.

Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 7728-7733

Vanecek (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 78:687-721

von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, Weaver DR, Korf HW, Hastings MH, Stehle JH. (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci*; 5: 234

von Gall C, Noton E, Lee C, Weaver DR. (2003) Light does not degrade the constitutively expressed BMAL1 protein in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*; 18: 125.

von Gall C, Weaver DR, Moek J, Jilg A, Stehle JH, Korf HW (2005). Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci*; 1040:508-511.

Yagita K, Tamanini F, Yasuda M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT, Okamura H (2002). Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *EMBO J* ;21:1301-14.

Yu W, Ikeda M, Abe H, Honma S, Ebisawa T, Yamauchi T, Honma K, Nomura M (1999). Characterization of three splice variants and genomic organization of the mouse BMAL1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*;260:760-7.

Valenzuela F, Monso C, Torres-Farfan C, Richter HG, Campino C, Torrealba F, Valenzuela G, Seron-Ferre M (2005). Clock gene expression in adult and fetal suprachiasmatic nucleus (SCN) and adrenal gland in the capuchin monkey. *J Physiol*; 565P:C35.

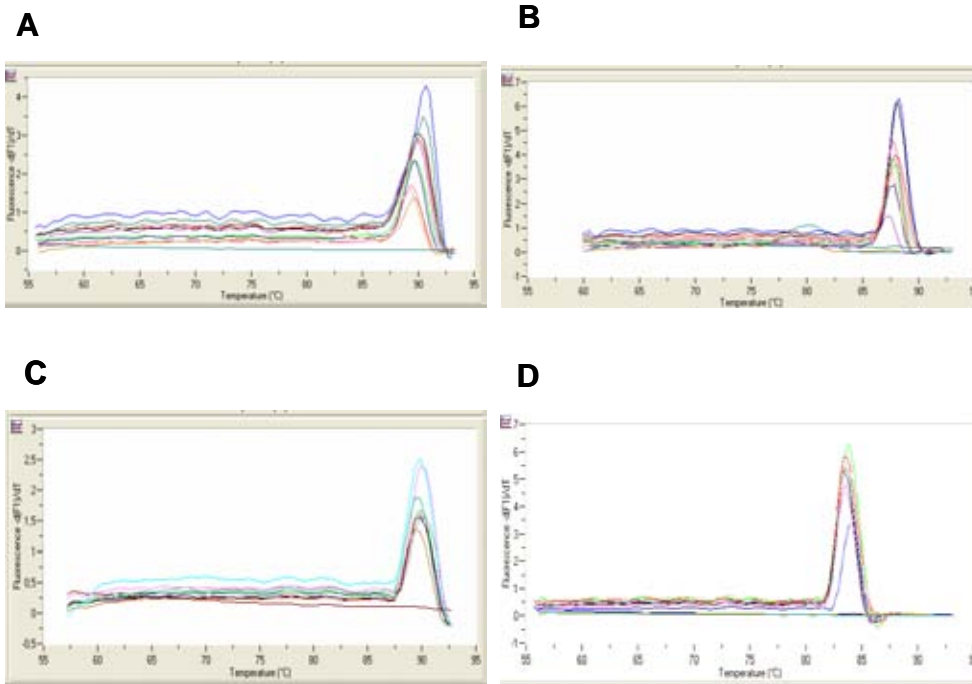
Watanabe T., Kojima M., Tomida S. (2006). Peripheral clock gene expression in CS mice with bimodal locomotor rhythms. *Neurosci Res* 54:295-301.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*;14(4):697-706.

Wijnen H, Young MW (2006). Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annu Rev Genet*;40:409-48.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20: 1103-1110.

## 7 ANEXO



**7.1. Determinación del *melting point* para amplímeros de transcritos reloj. (A) *Cry2* ( $T_m \sim 90^\circ\text{C}$ ). (B) *Clock* ( $T_m \sim 87^\circ\text{C}$ ). (C) *Per2* ( $T_m \sim 90^\circ\text{C}$ ). (D) *Bmal1* ( $T_m \sim 87^\circ\text{C}$ ).** Las reacciones presentaron una alta eficiencia, sin fonrmación importante de dímeros.