

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Optimización de cultivos organotípicos de núcleo supraquiasmático para estudiar la ganancia de funcionalidad del reloj central durante el desarrollo de ratón

Autora:

Iranzu Ros Ramírez

Director:

José Luis Zugaza

Co-directora:

Mariana Astiz

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	1
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	5
4. MATERIALES	5
4.1. RATONES	5
4.2. MEDIOS DE CULTIVO	6
4.3. SOLUCIONES TAMPÓN	6
5. MÉTODOS.....	7
5.1. OBTENCIÓN DE RODAJAS DE TEJIDO DE NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO ..	7
5.1.1. Matriz cerebral	8
5.1.2. Cortador de tejido automático	8
5.1.3. Vibratomo	8
5.2. MEDIDA DE FLUORESCENCIA	8
5.2.1. Lector de microplacas CLARIOstar Plus.....	9
5.2.2. ThermoFisher CellInsight CX7 High-Content Screening Platform.....	9
5.2.3. Análisis de datos.....	10
6. RESULTADOS.....	11
6.1. LECTOR DE MICROPLACAS CLARIOSTAR PLUS	11
6.2. THERMOFISHER CELLINSIGHT CX7 HIGH-CONTENT SCREENING PLATFORM.....	12
7. DISCUSIÓN.....	14
8. CONCLUSIONES	16
9. AGRADECIMIENTOS.....	17
10. BIBLIOGRAFÍA.....	17

1. RESUMEN

Los ritmos circadianos, de casi 24 horas, son sincronizados por un reloj central ubicado, en mamíferos, en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. El NSQ está conectado a la retina a través del tracto retino hipotalámico. El NSQ recibe la luz ambiental, integra la información y la envía mediante señales neuronales y humorales al resto del cerebro y órganos periféricos. Cada célula del cuerpo recibe esas señales y pone en hora al mecanismo molecular del reloj, que consiste en una serie de factores de transcripción, tales como el gen *Periodo 2* (*Per2*), oscilando en su expresión con un periodo de 24 horas. El NSQ del adulto consiste en un circuito formado por neuronas y astrocitos. La interacción neurona-astrocito es responsable de la integración de la señal lumínica y de la elaboración de señales de sincronización. Cómo y cuándo ocurre la maduración de este circuito durante el desarrollo es un aspecto que continúa siendo poco estudiado. Para estudiar la formación del núcleo y la participación de los astrocitos en su maduración se ha optimizado un sistema de cultivo organotípico de rodajas conteniendo el NSQ. Se han utilizado ratones neonatos que expresan una proteína reportera (VENUS) fusionada a una proteína de la maquinaria molecular del reloj (PER2). Se han empleado distintos métodos para cuantificar la fluorescencia emitida por la proteína PER2:VENUS para evaluar las oscilaciones del circuito de NSQ durante al menos dos ciclos circadianos. Como resultado de este trabajo, se han determinado las condiciones óptimas de obtención de la rodaja (cortadas con vibratomo), cultivo organotípico (en medio de cultivo DMEM con suero fetal bovino a 37 °C y 5 % de CO₂), método de cuantificación (ThermoFisher High-Content) y análisis de resultados (CircWave) que permitirán evaluar el papel de los astrocitos en la maduración del circuito neuronal.

2. INTRODUCCIÓN

El sistema circadiano anticipa cambios recurrentes del ambiente, como la transición entre el día y la noche, optimizando en ritmos de casi 24 horas nuestra fisiología. Los ritmos circadianos controlan el metabolismo, regulan los ciclos de sueño/vigilia, la producción hormonal y la expresión génica (Hut & Beersma, 2011) (**Figura 1a**). Por ejemplo, en especies diurnas como los humanos, al comienzo del día (fase de luz) el sistema favorece aquellos mecanismos neuronales que mantienen la atención y la cognición, mientras que, por la noche (fase de oscuridad) se favorecen aquellos procesos necesarios para promover el sueño y la consolidación de la memoria. Sin embargo, en especies nocturnas, como los ratones, se da la misma

regulación, pero en fases opuestas de luz y oscuridad (Hastings et al., 2018). La disrupción de los ritmos circadianos, tales como la exposición a luz durante la fase de oscuridad, tiene consecuencias negativas sobre la salud, incrementando el riesgo de padecer distintas patologías, como cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y metabólicas (Ruan et al., 2021).

Los ritmos circadianos están regulados por la maquinaria molecular del reloj, presente en todas las células. Sin embargo, para que los relojes celulares estén sincronizados entre sí, es necesario un único marcapasos central que sea capaz de recibir, integrar y transmitir la información del ambiente. En mamíferos, el reloj central se ubica en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, región que está conectada al órgano receptor de luz, la retina, mediante el nervio óptico. El NSQ es un marcapasos regulable por la luz, pero tiene una función autónoma, ya que continúa elaborando ritmos de casi 24 horas aun en ausencia de señal lumínica, produciendo señales neuronales y humorales que sincronizan los ritmos a nivel sistémico, tisular y celular.

La maquinaria molecular del reloj funciona como un bucle de retroalimentación negativa a nivel transcripcional y traduccional (Cox & Takahashi, 2019). Consiste en la formación de heterodímeros de CLOCK (Circadian Locomoter Output Cycles protein Kaput) y BMAL1 (Brain and Muscle Arnt-Like protein-1), reguladores positivos, que activan la transcripción de los genes *Periodo* (*Per 1, 3 y 3*) y *Criptocromo* (*Cry 1 y 2*) durante el día. Tras su dimerización, estas proteínas se acumulan en el núcleo e inhiben la actividad de CLOCK-BMAL1 durante la noche. Tras la degradación progresiva de PER y CRY, la inhibición sobre CLOCK-BMAL1 cede, comenzando un nuevo ciclo de aproximadamente 24 horas (**Figura 1b**) (Gekakis et al., 1998).

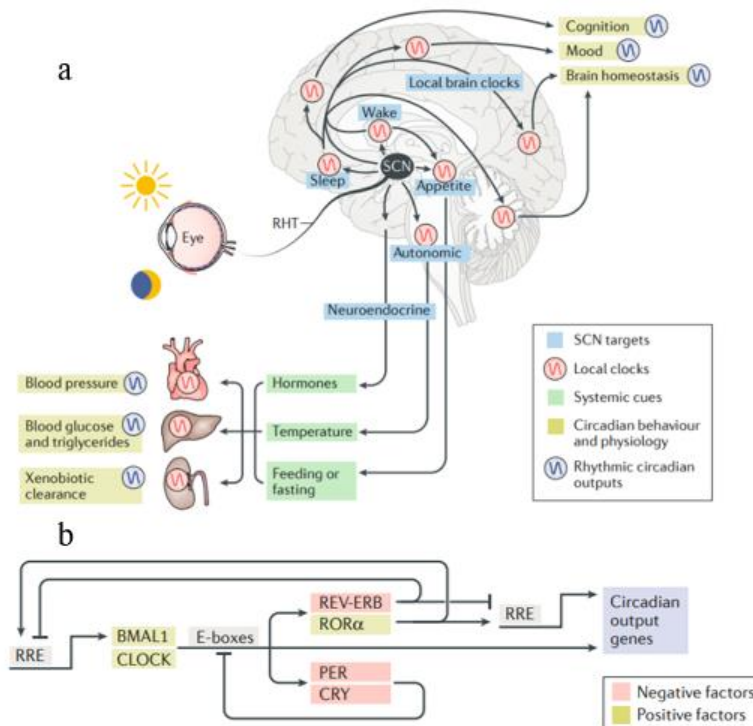


Figura 1. Descripción del funcionamiento del sistema circadiano en mamíferos. a) Los ritmos circadianos están sincronizados por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ), que es quien recibe, a través del tracto retino hipotalámico (RHT) la información lumínica del ambiente. El reloj del NSQ envía señales sincronizadoras a diversos relojes del cerebro (principalmente conexiones neuronales) y a tejidos periféricos (principalmente promoviendo la elaboración de hormonas), donde se regula la expresión circadiana de numerosos genes. **b)** Regulación molecular del reloj circadiano. El heterodímero CLOCK:BMAL1 activa la expresión de los genes *Per*, *Cry*, *Rev-Erb* y *Rora*. PER y CRY son represores de su propia expresión, mientras que REV-ERB inhibe la expresión de *Bmal1*. Por otro lado, ROR α activa la expresión de *Bmal1*. (Adaptado de Hastings et al., 2018).

El NSQ se encuentra en la región anterior del hipotálamo a ambos lados del tercer ventrículo, encima del quiasma óptico. El núcleo se compone de dos zonas, ventral y dorsal, que se diferencian en su conexión con la retina y la expresión de diversos neuropéptidos. Las neuronas de la zona ventral, conectadas a la retina, producen los péptidos vasoactivo intestinal (VIP) y liberador de gastrina (GRP), mientras que en la dorsal se encuentran las neuronas productoras de hormona arginina vasopresina (AVP) (Abrahamson & Moore, 2001). Las neuronas son en su mayoría GABAérgicas, productoras de ácido gamma-aminobutírico (GABA). Las neuronas de ambas regiones están conectadas entre sí, siendo esta interacción esencial para elaborar las señales sincronizadoras. Mas recientemente se ha demostrado que los astrocitos son esenciales para mantener la robustez de las oscilaciones y la integridad del circuito del NSQ (Brancaccio et al., 2017, 2019; Giantomasi et al., 2023; Tso et al., 2017). La información generada en el

NSQ viaja a otras regiones del hipotálamo y se expande por el sistema nervioso y el endocrino, permitiendo que el NSQ sincronice los relojes moleculares de todo el resto de las células del cuerpo (Yan & Okamura, 2002).

Las neuronas del NSQ aisladas pueden mantener ritmos circadianos de expresión génica de forma autónoma, que se desorganizan con el tiempo. Sin embargo, cultivos organotípicos de rodajas de NSQ muestran ritmos robustos que se mantienen de forma indefinida, dado por la extensa interconexión entre: las neuronas que componen el núcleo, y su extensa comunicación paracrina, y los astrocitos, integrando la comunicación entre células más distantes del circuito (Hastings et al., 2018). Los astrocitos inhiben la actividad neuronal del NSQ durante la fase de oscuridad a través de la modulación de los niveles de glutamato y GABA extracelular (Brancaccio et al., 2017, 2019). Si el reloj de los astrocitos está ausente, las oscilaciones del circuito neuronal se ven afectadas (Barca-Mayo et al., 2017; Brancaccio et al., 2017; Tso et al., 2017). Además, se ha comprobado que, en ausencia del reloj molecular de las neuronas, el reloj de los astrocitos es suficiente para inducir oscilaciones moleculares en el NSQ y comportamientos circadianos, tales como la actividad locomotora de forma autónoma (Brancaccio et al., 2019). Es por ello que la ritmicidad de los ciclos circadianos en el NSQ se debe a la interdependencia de la señalización astrocito-neurona (Hastings et al., 2018).

A pesar del conocimiento adquirido en las últimas décadas sobre el funcionamiento del NSQ del adulto como marcapasos central, su ontogenia permanece poco estudiada y esencialmente no se sabe aun cuando comienza a funcionar. En ratones, la neurogénesis tiene lugar entre los días embrionarios E10-E16 (preñez a término 19 días (E19) después de la fecundación) y la astrogliogénesis tiene lugar alrededor del nacimiento (Shimada & Nakamura, 1973). Sin embargo, se desconoce cuándo el NSQ comienza a elaborar ritmos autónomos debido a la sincronización e interconexión de sus células (neuronas y astrocitos). Además, tampoco se conoce cuáles son las señales que intervienen en el establecimiento de las conexiones astrocito-neurona y su sincronización a nivel de circuito. Se ha determinado en ratones que el día embrionario E15,5 es crítico en la maduración del NSQ, ya que, a partir de este momento, prácticamente todas sus células presentan ritmos circadianos. Sin embargo, los ritmos consiguen una estabilidad a nivel de circuito similar a la del adulto alrededor del día postnatal 2 (Carmona-Alcocer et al., 2018).

La existencia de ratones knock-in que expresan la proteína de fusión PER2:VENUS, permite el estudio cualitativo y cuantitativo de la expresión de una proteína endógena del reloj a través del reportero fluorescente verde (Venus). Esta proteína recombinante presenta las mismas

propiedades que PER2 nativa y, en cultivos organotípicos de NSQ, mantiene las oscilaciones de fluorescencia durante al menos 70 horas (Smyllie et al., 2016).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de este estudio es que la comunicación entre astrocitos y neuronas en el NSQ es responsable del mantenimiento de los ritmos de expresión de *Per2* en cultivo. Para probar esta hipótesis se ha planteado, como objetivo inicial, optimizar un protocolo de cultivo organotípico para rodajas de NSQ de ratones que expresan la proteína de fusión PER2:VENUS, permitiendo así seguir a través de la señal fluorescente las oscilaciones moleculares del reloj. Una vez conseguida la optimización, este sistema permitirá inhibir la comunicación entre astrocitos y evaluar el impacto sobre las oscilaciones moleculares.

Los objetivos específicos de este trabajo de fin de grado son: 1) establecer las condiciones del cultivo organotípico de NSQ y 2) seleccionar un método apropiado para cuantificar la fluorescencia producida por la proteína PER2:VENUS.

4. MATERIALES

4.1. RATONES

Se utilizaron ratones C57BL/6 PER2:VENUS de diferente edad, de entre 10 y 20 días postnatales. Estos ratones se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad controladas, con un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas y con agua y comida *ad libitum*.

Estos experimentos en animales han sido aprobados por el comité de ética en Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad del País Vasco según protocolo M20/2022/217. Los ratones Per2Venus son organismos modificados genéticamente habiendo procesado sus tejidos de acuerdo con el protocolo M30/2022/218 aprobado por el Comité de Ética en la Investigación con Agentes Biológicos y organismos modificados genéticamente (CEIAB). Ambos protocolos han sido también aprobados por la autoridad local competente (Diputación Foral de Bizkaia) bajo normas vigentes en la Unión Europea.

4.2. MEDIOS DE CULTIVO

Se probaron dos medios de cultivo diferentes para cultivar las rodajas de NSQ, DMEM (Sigma D2902 – sin rojo fenol) suplementado con Suero Bovino Fetal (FBS) o con B27. En la **Tabla 1** se detallan sus componentes.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados. Se utilizaron dos medios de cultivo, DMEM suplementado con Suero Bovino Fetal (FBS) o con B27, respectivamente. Las cantidades se presentan en unidades de concentración.

DMEM suplementado con FBS	DMEM suplementado con B27
5 g/L de glucosa en polvo	4,5 g/L de glucosa en polvo
2,4 g/L de HEPES	2,4 g/L de HEPES
25000 U/L Penicilina	25000 U/L de Penicilina
0,025 g/L de Estreptomicina	0,025 g/L de Estreptomicina
5 % de FBS	2 % de B27
0,07 g/L de Glutamax	

4.3. SOLUCIONES TAMPÓN

Se utilizaron dos soluciones tampón, a pH 7,4, para el mantenimiento de las rodajas de tejido de NSQ, Tampón fosfato salino (PBS) 1X y Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1X (**Tabla 2**).

Tabla 2. Composición de las soluciones tampón empleadas. Se utilizaron dos soluciones tampón, PBS 1X y HBSS 1X, ambos con pH 7,4. Las cantidades se presentan en unidades de concentración.

PBS 1X	HBSS 1X
0,2 g/L KCl	0,4 g/L KCl
0,24 g/L KH ₂ PO ₄	0,06 g/L KH ₂ PO ₄
8 g/L NaCl	8 g/L NaCl
1,44 g/L Na ₂ HPO ₄	0,09 g/L Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O
	1 g/L D-Glucosa

5. MÉTODOS

Se combinaron distintos métodos para la realización de cada experimento, variando las condiciones de obtención de las rodajas de cerebro y el método de detección de fluorescencia (**Figura 2**), con el objetivo de optimizar el procedimiento experimental.

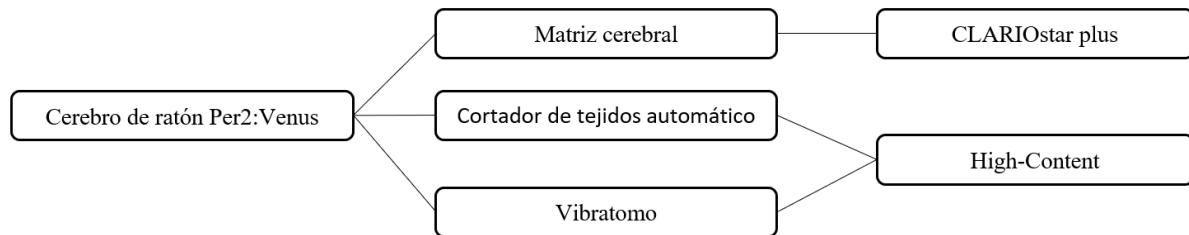


Figura 2. Métodos utilizados. Se utilizaron tres métodos de corte de tejido: matriz cerebral, cortador de tejidos automático y vibratomo. Como detectores de fluorescencia se utilizaron los lectores CLARIOstar plus y Thermo Fisher High-Content.

5.1. OBTENCIÓN DE RODAJAS DE TEJIDO DE NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Las rodajas de NSQ se cultivaron en una placa de 6 pocillos. En cada pocillo se adicionó medio de cultivo y por encima una membrana Millicell® de tamaño de poro de 0,4 μm .

Para preparar las rodajas, se comenzó con la disección del cerebro. Los ratones fueron sacrificados por decapitación utilizando tijeras. Se cortó el cráneo y se retiró, dejando el cerebro al descubierto. Después, se cortaron los nervios ópticos con una tijera pequeña, evitando tocar el hipotálamo, y se separó el cerebro con la ayuda de pinzas curvas.

Los cerebros fueron utilizados para obtener cortes coronales conteniendo el NSQ. Este proceso se realizó de tres formas distintas: con una matriz cerebral, con un cortador de tejido y con un vibratomo.

En los tres casos, las rodajas se depositaron en una placa de Petri con PBS 1X, para los dos primeros métodos, y con HBSS 1X para el vibratomo, a 4 °C. Con la ayuda de un portaobjetos, previamente rociado con etanol y secado bajo luz ultravioleta, se observaron las rodajas y se eligieron aquellas que contenían la zona de interés. El NSQ se cortó cuidadosamente de la rodaja seleccionada. Las porciones obtenidas de tejido se depositaron, con la ayuda de un pincel

y el respectivo tampón, en el centro de la membrana de la placa. Por último, se retiró cualquier resto de tampón que quedase sobre el tejido.

Este proceso se realizó con cada rodaja hasta llenar la placa de 6, es decir, con 6 animales. Después, se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta el momento de la lectura.

5.1.1. Matriz cerebral

Para el primer método, se transfirió el cerebro a una matriz cerebral con ranuras de 0,5 mm de grosor. Era importante que la matriz estuviese fría por lo que este proceso se realizó sobre un bloque acumulador de frío. Utilizando dos cuchillas se realizó un corte coronal en la región donde se encontrase el NSQ, justo en la parte anterior del hipotálamo. Las rodajas obtenidas fueron de 1 mm de grosor. Se repitió el proceso obteniendo dos rodajas por cerebro para estar seguro de obtener el NSQ, seleccionando posteriormente la rodaja de interés bajo lupa.

5.1.2. Cortador de tejido automático

En el segundo caso, se utilizó un cortador de tejido. Se configuró el aparato para obtener rodajas de 400 µm. Se realizaron los cortes bajando la cuchilla manualmente y retirando cada corte por separado, con la ayuda de una pinza y un pincel. Se analizaron los cortes bajo lupa para determinar si la rodaja presentaba la región de interés, el NSQ, y se procedió tal lo explicado anteriormente.

5.1.3. Vibratomo

El tercer método para obtener las rodajas se trata de un vibratomo Leica VT1200. Se fijó el cerebro con pegamento a la base del vibratomo. En este caso, se utilizó como buffer HBSS 1X a 4 °C, por lo que se llenó la cámara del aparato con esta solución. Se realizaron cortes de 350 µm, tomando las rodajas que pudiesen presentar el NSQ.

5.2. MEDIDA DE FLUORESCENCIA

Con el fin de observar la expresión de la proteína de fusión PER2:VENUS durante un intervalo de tiempo, se midió la fluorescencia emitida en el NSQ de los cortes coronales de cerebro durante varios días. Para ello, se utilizaron diferentes métodos.

5.2.1. Lector de microplacas CLARIOstar Plus

El primer método utilizado fue CLARIOstar Plus de BMG LABTECH, un lector de placas que permite medir la fluorescencia emitida en cada pocillo de la placa durante un intervalo de tiempo, excitando a una longitud de onda de $502,8 \pm 10$ nm. Se tomaron medidas cada hora y se seleccionó el autofocus para realizar las mediciones. En este aparato se realizaron 4 experimentos, cambiando las condiciones de cada medición. En cada experimento se analizaron 6 muestras. Los tres primeros experimentos se realizaron con el medio de cultivo DMEM suplementado con FBS, mientras que el cuarto experimento se realizó con DMEM suplementado con B27.

Por otro lado, este lector de microplacas permite medir la fluorescencia por arriba o por debajo de la placa que se introduce. Los tres primeros experimentos se realizaron con la medición por arriba, mientras que el cuarto se midió por abajo.

En el primer experimento se añadieron 2 mL de medio de cultivo a cada pocillo de la placa y esta fue introducida en el lector sin incubación previa. El programa del Clariostar Plus se configuró con una ganancia de 1000. En cambio, el segundo experimento se realizó con 1,5 mL de medio de cultivo en cada pocillo. Además, se incubó la placa a 37 °C durante un día, antes de proceder a su medición. La ganancia se mantuvo en 1000. El volumen de medio se mantuvo para los siguientes experimentos. Sin embargo, en el tercer experimento la placa fue incubada durante 8 días y la ganancia se aumentó hasta un valor de 2000. Por último, el cuarto experimento se realizó en las mismas condiciones que el anterior, pero la placa se incubó durante 4 días.

Los cambios realizados entre los experimentos 1-4 tuvieron como objetivo obtener una señal de fluorescencia de amplitud suficiente para poder evaluar las oscilaciones en la expresión de la proteína de fusión en el tiempo.

5.2.2. ThermoFisher CellInsight CX7 High-Content Screening Platform

El segundo método utilizado fue el ThermoFisher CellInsight CX7 High-Content Screening Platform. En este microscopio se midieron placas con secciones de NSQ durante varios días, obteniendo imágenes con un intervalo de una hora. Primero, con el fin de comprobar el foco del equipo, se analizaron dos rodajas, una teñida con DAPI y otra sin tinción. Posteriormente, se realizaron cuatro experimentos, con 3 muestras de cada animal por pocillo, teniendo 18 muestras por experimento. Estos experimentos se realizaron sin tinción. En todos ellos el medio

utilizado fue DMEM suplementado con FBS. Se tomaron imágenes con una longitud de onda de excitación de 485 ± 20 nm.

Las imágenes se tomaron estableciendo el foco manualmente, fijando la altura focal, para mantenerlo durante toda la adquisición. También se fijó el tiempo de adquisición constante al principio de la grabación para evitar tener un reajuste durante el proceso, ya que podría provocar la pérdida de las oscilaciones.

El primer experimento se realizó con rodajas obtenidas en el cortador de tejidos automático y se tomaron imágenes con un intervalo de 3 horas. En el segundo experimento se realizaron los cortes en un vibratomo y se tomaron imágenes con un intervalo de 1 hora. Debido a la importancia de reconocer la región del NSQ en las rodajas, para los experimentos 3 y 4, se tomaron fotos previamente en un microscopio Carl Zeiss ApoTome2. De esta forma, primero se identificó el NSQ en este microscopio para luego seleccionar el campo de visión fácilmente en el High-Content, y recoger los datos únicamente de la zona del NSQ.

5.2.3. Análisis de datos

Los datos de fluorescencia que se obtuvieron tanto en el lector de placas como del análisis de la intensidad de fluorescencia de las fotos obtenidas en el High-Content, se debieron a la oscilación circadiana (con periodo de casi 24 horas) de la expresión de la proteína de fusión PER2:VENUS. Es decir, en ambos casos, se generaron series temporales de datos. Las mediciones se realizaron durante varios días (dependiendo del experimento), con el fin de evaluar las oscilaciones en más de un ciclo circadiano.

Los datos de intensidad de fluorescencia obtenidos en el CLARIOstar se analizaron realizando el promedio de las primeras 12 horas y, mediante una media móvil, para eliminar cualquier variación lineal de fondo en la serie temporal de datos y obtener los datos normalizados antes de realizar el ajuste de curva sinusoidal.

Ecuación 1. Ecuación para calcular la fluorescencia de la región de interés con respecto al fondo. FC: fluorescencia corregida; DI: densidad integrada; A: área de la región de interés; F: fluorescencia media del fondo.

$$FC = DI - A \times F \quad (1)$$

Por otro lado, las imágenes obtenidas en el High-Content se analizaron con el software ImageJ. Se seleccionó el NSQ como región de interés (ROI) y se midió la densidad integrada respecto del área para cada imagen. Se hizo el mismo procedimiento con el fondo de la imagen, midiendo la fluorescencia media. Así, se calculó la fluorescencia de cada ROI (**Ec. 1**).

La significancia estadística de las oscilaciones circadianas se realizó mediante el software CircWave v 1.4 (R.A. Hut, Groningen, NL), el cual utiliza un ajuste de regresión armónica de curva sinusoidal con un periodo de 24 horas. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1. LECTOR DE MICROPLACAS CLARIOSTAR PLUS

Se obtuvieron valores de fluorescencia cada hora, para los tres primeros experimentos, y de media hora para el cuarto, durante al menos 48 horas, con el fin de obtener una serie temporal de al menos dos ciclos. Se observó que el foco seleccionado por el propio programa fue de aproximadamente 4,5 mm para cada experimento.

El análisis se realizó en Circwave, no obteniendo un ajuste estadísticamente significativo de ninguna de las muestras analizadas (**Figura 3**).

Como puede observarse en la **Figura 3**, los valores de intensidad de fluorescencia no siguen un patrón de oscilación de 24 horas.

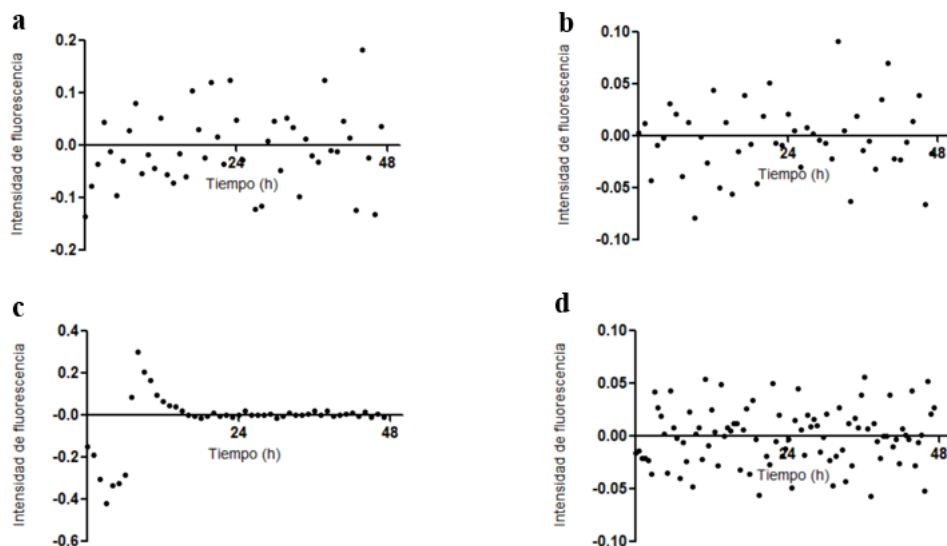


Figura 3. Resultados representativos obtenidos en la medición de la intensidad de fluorescencia en Clariostar Plus. Se representa la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, en horas. **a.** Experimento 1: ratones postnatales de 10 días (P10), 2 ml de medio de cultivo, sin incubación previa. Ganancia 1000. **b.** Experimento 2: ratones P10, 1,5 ml de medio de cultivo, un día de incubación previa. Ganancia 1000. **c.** Experimento 3: ratones P10, 1,5 ml de medio de cultivo, 8 días de incubación previa. Ganancia 2000. **d.** Experimento 4: ratones P12, 1,5 ml de medio de cultivo (DMEM suplementado con B27), 4 días de incubación previa. Ganancia 2000. **Ajuste matemático.** Los datos se analizaron con el software CircWave, pero no se obtuvo un ajuste en la mayoría de los casos.

6.2. THERMOFISHER CELLINSIGHT CX7 HIGH-CONTENT SCREENING PLATFORM

Para cada muestra, se obtuvieron las imágenes de los campos seleccionados, conteniendo el NSQ.

La prueba del autofocus con una rodaja teñida con DAPI y otra sin teñir dio como resultado un foco aceptable en ambas muestras, por lo que permitió realizar los experimentos sin tinción.

Las imágenes obtenidas se analizaron en ImageJ y en el software CircWave v 1.4, obteniendo los valores de fluorescencia y el ajuste matemático (**Figura 4**).

Los resultados del primer experimento no se ajustaron al modelo de CircWave (**Figura 4a**). Por otro lado, 9 de 10 muestras del segundo experimento mostraron un ajuste significativo, obteniendo en todas ellas un valor de $p < 0,01$ (en dos muestras se obtuvo $p < 0,001$) (**Figura 4b**). Los resultados del tercer experimento se ajustaron todos significativamente excepto 3 de las 13 muestras. En este caso, la mitad de los ajustes tuvieron un valor de $p < 0,01$ y la otra

mitad $p < 0,001$ (**Figura 4c**). Por último, el cuarto experimento proporcionó un ajuste de todas las muestras, ocho, siendo $p < 0,001$ en todas ellas (**Figura 4d**).

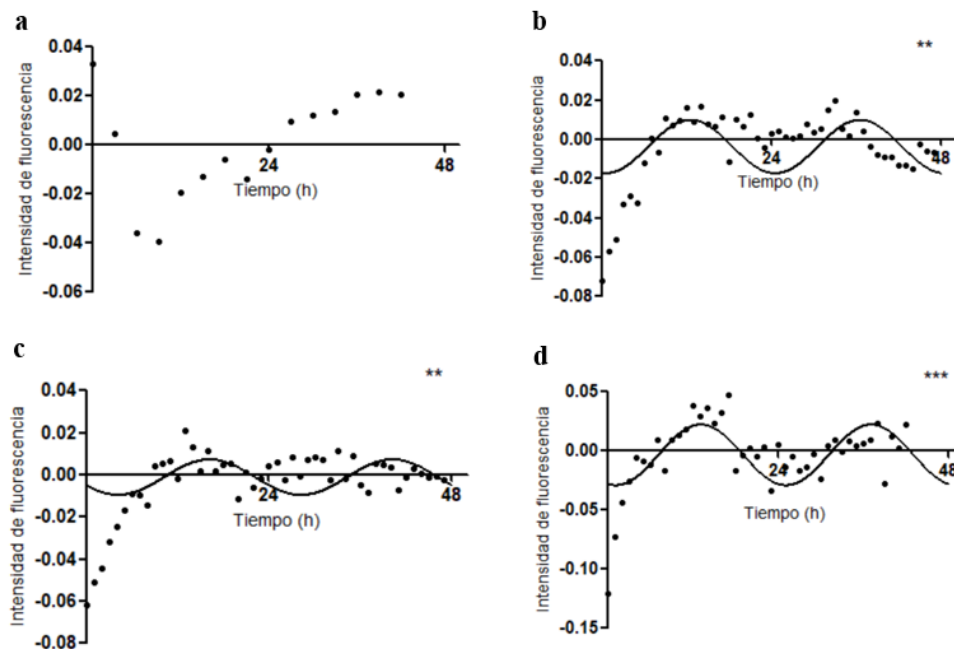


Figura 4. Resultados representativos obtenidos en la medición de fluorescencia con High-Content. Se representa la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, en horas. Se tomaron imágenes durante 48 horas con un intervalo de 3 horas para el experimento 1 (a) y 1 hora para los demás (b, c, d). Las imágenes se analizaron con ImageJ, seguido de la normalización, obteniendo los puntos experimentales representados. **Ajuste matemático:** Se analizaron los datos con el software CircWave para comprobar el ajuste a la ritmicidad circadiana. Se obtuvieron ajustes significativos para todos los experimentos excepto para el primero. **b.** Periodo: 23 h, amplitud: 0,010. **c.** Periodo: 23,8 h, amplitud: 0,008 **d.** Periodo: 23,5 h, amplitud: 0,026. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Las imágenes obtenidas, en los experimentos 3 y 4, con el microscopio Carl Zeiss ApoTome 2 mostraron nítidamente dónde se ubicaba el NSQ en cada una de las muestras. Las imágenes se tomaron con un aumento de 10X (**Figura. 5a**). En la **Figura 5** se muestran imágenes de la misma sección tomadas con los microscopios Carl Zeiss ApoTome 2 y High-Content (durante las primeras 24 horas de adquisición).

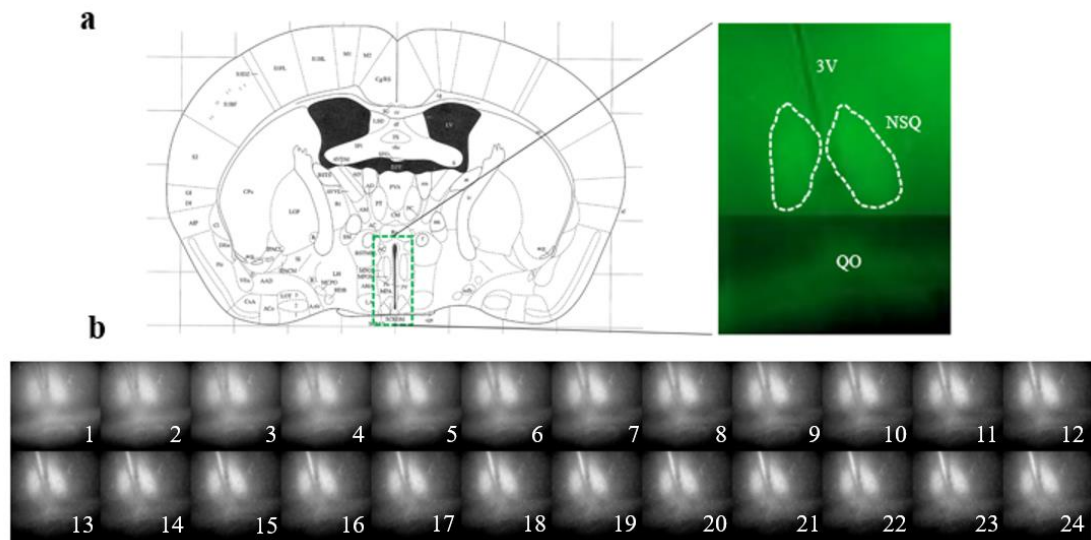


Figura 5. Imágenes de núcleo supraquiasmático (NSQ). a. Mapa coronal del cerebro de ratón junto con imagen de microscopía de la región del NSQ. La imagen fue tomada con un microscopio Carl Zeiss ApoTome 2 a un aumento de 10X. Se observa el núcleo supraquiasmático (NSQ) punteado en blanco, el tercer ventrículo (3V) y el quiasma óptico (QO). El NSQ presenta fluorescencia debido a la expresión de PER2:VENUS. (Mapa coronal adaptado de *(Paxinos & Franklin, 2004)*). b. Imágenes obtenidas en el microscopio High-Content durante las primeras 24 horas de adquisición.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los cuatro experimentos en los que se midió la fluorescencia utilizando CLARIOstar Plus no mostraron oscilaciones estadísticamente significativas de 24 horas de la expresión de la proteína Per2:Venus en el NSQ. Tras la medición del primer experimento, se determinó que era necesario disminuir la cantidad de medio de cultivo añadido a cada pocillo, ya que este se evaporó durante la medición y condensó sobre las muestras de tejido, interfiriendo con la medición de la fluorescencia. Por ello, se decidió reducir el volumen a 1,5 ml de medio en los siguientes experimentos. Además, se consideró que la incubación previa de las rodajas podría ser de importancia, ya que el tejido y las oscilaciones de fluorescencia emitidas podrían estabilizarse (Hastings et al., 2005). Por este motivo, en cada experimento se analizaron placas con distintos tiempos de incubación. Sin embargo, los resultados posteriores no mostraron una mejora significativa. Además, se aumentó la ganancia con el fin de mejorar la señal adquirida, aumentando su amplitud, pero no se vio resultado. En el experimento 3, se observaron oscilaciones durante las primeras horas de adquisición, pero desaparecen tras varias horas. Esto puede deberse al deterioro del tejido, ya que esta placa fue

incubada durante 8 días anteriores a la adquisición de la señal. Por último, en el cuarto experimento se cambió el medio de cultivo, sustituyendo el FBS por B27, componente utilizado para el cultivo de neuronas o del NSQ (Brown, 2021). Además, se decidió medir la fluorescencia por debajo de la placa, ya que el plástico que recubría la placa durante la medición y la condensación del medio de cultivo podían ser factores que alterasen los resultados de fluorescencia. Como se puede ver en el apartado de resultados, en este experimento no se consiguió mejorar la señal, probablemente porque al medir por debajo, la membrana utilizada para el cultivo interfiriese en la medición.

Debido a que hubo diversas variables que podían estar alterando los resultados en el CLARIOstar Plus, se decidió descartar este método para la detección de fluorescencia. Un factor determinante fue que, con este lector de placas, no se pudo observar el tejido y ver la presencia del NSQ. Por lo tanto, podría haber rodajas sin NSQ, siendo complicado determinar si las mediciones se realizaron correctamente. Además, el autofocus del programa pudo ser erróneo, ya que se estableció a 4,5 mm del sensor, pero esta no es la distancia a la que se situaron las muestras de tejido, pudiendo deberse a una baja sensibilidad del detector de fluorescencia en este lector o al grosor de las rodajas. Por estos motivos, se descartó este método.

Posteriormente, se decidió utilizar el High-Content para tomar imágenes durante un periodo de tiempo y cuantificar su fluorescencia. Con este método, se pudo ver aquellas rodajas que presentaban el NSQ, así como determinar si se encontraban en foco. Además, se pudieron analizar más muestras en cada experimento, ya que permitió introducir más de una muestra por pocillo, debido a que se analizan las fotos de manera independiente. Sin embargo, el CLARIOstar Plus solo permite una muestra por pocillo debido a que realiza la media de la fluorescencia detectada en todo el pocillo.

Una de las dificultades de utilizar el High-Content fue que era necesario determinar el campo de visión en el que se encontraba el NSQ, para realizar las fotos únicamente en aquellos campos de interés. Este factor fue determinante en el primer experimento, en el que no se pudieron tomar fotos con un intervalo de 1 hora, debido a la selección de múltiples campos de adquisición. Por ello, en los siguientes experimentos, se realizaron fotos previamente en el microscopio Carl Zeiss, ya que era más fácil identificar el NSQ a través de este microscopio. De esta forma, tras la identificación de las zonas, se introdujeron las placas en el High-Content y se facilitó la selección de los campos de visión. De esta manera se pudieron obtener resultados con significancia estadística, lo que permitió optimizar el método de cultivo de las rodajas. Estos resultados son similares a los descritos en otros estudios donde se analizan las

oscilaciones en la expresión de PER2:VENUS (Carmona-Alcocer et al., 2018; Smyllie et al., 2016).

Con respecto a los tres métodos de corte utilizados, el vibratomo fue el que mejores resultados dio. La matriz cerebral, aunque fue el método más sencillo y rápido, proporcionó rodajas demasiado gruesas para que pudiesen ser analizadas en los distintos microscopios, ya que no era posible enfocar. Por otro lado, el cortador de tejidos automático no permitió obtener rodajas de un grosor uniforme, ya que el cerebro se movía con cada corte. Además, como se puede ver en el apartado de resultados (**Figura 4a**), los resultados del experimento realizado con el cortador de tejidos automáticos no se ajustaron a la ritmicidad circadiana, debido al grosor de las muestras. Por último, el vibratomo permitió la obtención de rodajas del mismo grosor, ya que se inmovilizó el cerebro, y de un tamaño adecuado, 350 μm .

Por último, se cambió la solución tampón PBS por HBSS porque podría ser mejor para mantener la viabilidad de la rodaja.

8. CONCLUSIONES

Con el fin de estudiar si la comunicación entre astrocitos y neuronas en el NSQ es responsable del mantenimiento de los ritmos de expresión de *Per2* en cultivo, era necesario establecer primero un protocolo para realizar cultivos organotípicos de NSQ y para medir la fluorescencia debida a la expresión de PER2:VENUS. Las principales conclusiones de este estudio son: 1) el medio de cultivo DMEM suplementado con FBS permite el cultivo organotípico de NSQ durante, al menos, 48 horas. La intensidad de fluorescencia obtenida y la amplitud de la señal podrían optimizarse aún más a partir del método establecido de obtención de rodajas y medición de la señal emitida; 2) el corte de cerebro con vibratomo a 350 μm proporciona rodajas aptas para su análisis en distintos microscopios; y 3) la expresión de PER2:VENUS en el NSQ puede ser analizada mediante la adquisición de imágenes en el microscopio High-Content.

Por último, no se pudo determinar cuál de los dos medios utilizados sería mejor para el cultivo organotípico de NSQ, ya que la prueba del medio DMEM suplementado con B27 se vio afectada por diversos factores. Por ello, habiendo optimizado el proceso pudiendo analizar las oscilaciones, se intentará probar ambos medios y definir cuál es el que mejor mantiene la viabilidad del tejido y genera unas oscilaciones con mayor amplitud. Además, se realizarán los experimentos con distintos días de incubación previa a la adquisición, para determinar si es necesaria o no para mejorar la señal obtenida.

9. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al centro de neurociencias Achucarro, concretamente al grupo de Mariana Astiz, por ofrecerme este proyecto y guiarme durante su realización. También, agradecer a Laura y Lorea por su ayuda con el Carl Zeiss ApoTome2 y, en especial, a Alejandro Carretero por su ayuda con el manejo del High-Content.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916(1-2), 172-191. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02890-6)

Barca-Mayo, O., Pons-Espinal, M., Follert, P., Armirotti, A., Berdondini, L., & De Pietri Tonelli, D. (2017). Astrocyte deletion of *Bmal1* alters daily locomotor activity and cognitive functions via GABA signalling. *Nature Communications*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms14336>

Brancaccio, M., Chesham, J. E., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2017). Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron*, 93(6), 1420-1435. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.030>.

Brancaccio, M., Edwards, M. D., Patton, A. P., Smyllie, N. J., Chesham, J. E., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2019). Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6423), 187-192. <https://doi.org/10.1126/science.aat4104>

Brown, S. A. (Ed.). (2021). *Circadian Clocks: Methods and Protocols* (Vol. 2130). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0381-9>

Carmona-Alcocer, V., Abel, J. H., Sun, T. C., Petzold, L. R., Doyle, F. J., Simms, C. L., & Herzog, E. D. (2018). Ontogeny of Circadian Rhythms and Synchrony in the Suprachiasmatic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 38(6), 1326-1334. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2006-17.2017>

Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian Clock Genes and the Transcriptional Architecture of the Clock Mechanism. *Journal of molecular endocrinology*, 63(4), R93-R102. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0153>

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, 280(5369), 1564-1569. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1564>

Giantomasi, L., Ribeiro, J. F., Barca-Mayo, O., Malerba, M., Miele, E., De Pietri Tonelli, D., & Berdondini, L. (2023). Astrocytes actively support long-range molecular clock synchronization of segregated neuronal populations. *Scientific Reports*, 13, 4815. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31966-1>

- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(8), 453-469. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>
- Hastings, M. H., Reddy, A. B., McMahon, D. G., & Maywood, E. S. (2005). Analysis of Circadian Mechanisms in the Suprachiasmatic Nucleus by Transgenesis and Biolistic Transfection. En M. W. Young (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 393, pp. 579-592). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)93030-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)93030-9)
- Hut, R. A., & Beersma, D. G. M. (2011). Evolution of time-keeping mechanisms: Early emergence and adaptation to photoperiod. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *366*(1574), 2141-2154. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0409>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact Second Edition* (2.^a ed.). Elsevier.
- Ruan, W., Yuan, X., & Eltzschig, H. K. (2021). Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nature reviews. Drug discovery*, *20*(4), 287-307. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00109-w>
- Shimada, M., & Nakamura, T. (1973). Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Experimental Neurology*, *41*(1), 163-173. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(73\)90187-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(73)90187-8)
- Smyllie, N. J., Pilorz, V., Boyd, J., Meng, Q.-J., Saer, B., Chesham, J. E., Maywood, E. S., Krogager, T. P., Spiller, D. G., Boot-Handford, R., White, M. R. H., Hastings, M. H., & Loudon, A. S. I. (2016). Visualizing and Quantifying Intracellular Behavior and Abundance of the Core Circadian Clock Protein PERIOD2. *Current Biology*, *26*(14), 1880-1886. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.018>
- Tso, C. F., Simon, T., Greenlaw, A. C., Puri, T., Mieda, M., & Herzog, E. D. (2017). Astrocytes regulate daily rhythms in the suprachiasmatic nucleus and behavior. *Current biology: CB*, *27*(7), 1055-1061. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.037>
- Yan, L., & Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, *15*(7), 1153-1162. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01955.x>