



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS**

**FACULTAD DE QUIMICA, BIOQUIMICA Y  
FARMACIA**

**DOCTORADO EN BIOQUIMICA**

**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de las Células Intersticiales y Células  
Pigmentadas de la Glándula Pineal en un Modelo  
de Reproducción Fotoperíodo Dependiente  
(*Lagostomus maximus maximus*)**

**AUTOR: BUSOLINI FABRICIO IVAN**

**DIRECTOR: MOHAMED FABIAN HEBER**

**CO-DIRECTOR: FILIPPA VERONICA PALMIRA**

**SAN LUIS - 2019**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS**

**FACULTAD DE QUIMICA, BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**DOCTORADO EN BIOQUIMICA**

**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de las Células Intersticiales y Células Pigmentadas de  
la Glándula Pineal en un Modelo de Reproducción  
Fotoperíodo Dependiente (*Lagostomus maximus maximus*)**

**Autor**  
**Lic. Busolini Fabricio Ivan**

**Director**  
**Dr. Mohamed Fabian Heber**

**Co-Directora**  
**Dra. Filippa Verónica Palmira**

**SAN LUIS - 2019**

*A mis padres, Juan y Gladys*  
*A mis hermanas, Anto y Flor*  
*A mi hijo Simón...*

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional de San Luis por brindarme la formación profesional y los medios para desarrollar el presente trabajo de Tesis Doctoral.*

*Al consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca interna Doctoral que me permitió fomentar y sustentar mi labor.*

*A la Secretaria de Ciencia y Técnica por mi primera beca (estímulo) la cual me inició en la investigación científica.*

*A la Dra. Nora Susana Domínguez, quien fue la primera en persuadirme de acercarme a la Cátedra de Histología, y junto al Dr. Luis Scardapane me abrieron las puertas al proyecto de investigación “Vizcacha” y a la mencionada Cátedra.*

*Al Dr. Fabian Mohamed por haber confiado en mí en esta aventura, contribuyendo en todo momento con su conocimiento, apoyo y dedicación en el asesoramiento científico le estaré eternamente agradecido.*

*A la Dra. Verónica Filippa, quien como Co-directora de esta Tesis me aportó su invaluable conocimiento científico, experiencia práctica y estricta guía a la hora de realizar las diferentes tareas, también le estaré eternamente agradecido.*

*A la Dra. Claudia Aguilera-Merlo por su valioso aporte científico, asesoramiento y por permitirme acompañarla en las tareas de docencia.*

*A los Dres. Maximiliano Chaves y Albana Cruceño por brindarme su valioso aporte científico, charlas y calidez humana.*

*A los Técnicos Angelina Bernardi y Juan Arroyuelo por su valiosa colaboración y apoyo a lo largo de todo este trabajo.*

*A mis compañeros “becarios” Ezequiel y Gabriela por su compañía, risas y valiosa colaboración.*

*A la Bioquímica Graciela Rodríguez por colaborar cordialmente con algunas tareas para la finalización de esta Tesis.*

*A la Dra. Alfonsina Morales y la Lic. Paula López del IHEM por introducirme en el mundo de la microscopia electrónica y ayudarme a concluir esta Tesis.*



*A los miembros de GAECI por su asesoramiento lingüístico en los procesos de escritura en inglés de mis textos científicos.*

*A mis padres Juan y Gladys, por sus esfuerzos constantes, por procurarme una educación que estaré siempre agradecido, darme libertad para elegir mi camino y apoyarme en mis decisiones.*

*A mis hermanas Anto y Flor, por su constante interés y apoyo durante este camino.*

*A mi tía TONA quien fue la primera en hablarme del CONICET, la investigación científica en la Argentina y siempre confiar en mis logros.*

*Al resto de mis familiares quienes de una forma u otra se interesaron por mi trabajo y me brindaron su aliento.*

*A Yanina y toda su familia quienes me brindaron su APOYO INCONDICIONAL durante todos estos años. Sin ellos no hubiese sido posible concluir con esta Tesis.*

*A mi hijo Simón, por tener que soportar mi ausencia en numerosas ocasiones y entender a su modo inocente dichas ausencias. Pero a pesar de ello siempre con su sonrisa, abrazos y besos me levantaba el ánimo y me incentivaba a continuar con mis estudios. ¡TE AMO HIJO!*

*Por último, a mis amigos quienes me prestaron su oído cuando estaba medio caído por alguna experiencia práctica que no salió, un paper que no entró y todo mambo que pude haber tenido durante estos años. ¡JA!*

# INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>PARTE A: GLANDULA PINEAL</b>	<b>2</b>
Reseña histórica sobre la glándula pineal	2
Anatomía de la glándula pineal	9
Embriología de la glándula pineal	11
Vascularización de la glándula pineal	12
Inervación de la glándula pineal	13
Histología de la glándula pineal	15
Bioquímica de la glándula pineal	18
<b>PARTE B: CELULAS INTERSTICIALES Y CELULAS PIGMENTADAS</b>	<b>25</b>
Generalidades de las células intersticiales	25
Marcadores proteicos de las células intersticiales	26
*Proteína S-100	26
* Proteína Glio-Fibrilar Ácida (GFAP)	29
* Vimentina	30
Generalidades de las células pigmentadas	31
<b>PARTE C: RITMOS BIOLÓGICOS, FOTOPERÍODO Y MELATONINA</b>	<b>33</b>
Ritmos biológicos: definición y clasificación	33
La luz: el principal sincronizador externo del ritmo circadiano	35
Melatonina	36
<b>PARTE D: ANTECEDENTES EN NUESTRO LABORATORIO</b>	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
Objetivo general:	43
Objetivos específicos:	43
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>44</b>
<b>PARTE A: MODELO EXPERIMENTAL</b>	<b>45</b>
Distribución Geográfica	45
Aspecto Externo	46
Hábitat y alimentación	47
Sentidos, hábitos y actividades	48
Edad y dimorfismo sexual	48
Reproducción	49
<b>PARTE B: METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS UTILIZADAS</b>	<b>51</b>
Aspectos éticos sobre el manejo de animales de experimentación	51
Captura y mantenimiento de animales	51
Anestesia, eutanasia y obtención de muestras	53
Fijación y cortes histológicos para microscopia óptica	53
Técnicas histológicas generales	53
*Coloración de Hematoxilina-Eosina (H-E)	53

*Tinción de Van Gieson (vG)	55
Técnicas histoquímicas	55
*Hematoxilina-Acida Fosfotúngstica Modificada (PTAHM)	55
*Método de Masson-Fontana para la determinación de melaninas	56
*Método de Schmorl para lipofuscinas y melanina	57
*Método para decoloración de melaninas	58
*Método para DOPA-Oxidasa	58
*Método del Rojo de Alizarina para Calcio	58
Técnicas inmunohistoquímicas	59
*Técnica Inmunohistoquímica (Método Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa)	59
*Doble-inmunohistoquímica para las proteínas S-100 y GFAP	62
Análisis morfométrico	63
Parámetros morfométricos analizados	64
Análisis estadístico	65
Técnica de microscopía electrónica	66
*Microscopía electrónica de transmisión (MET)	66
*Mezcla fijadora	66
*Técnica de deshidratación	67
*Infiltración en resina de baja viscosidad	68
*Entacado y polimerizado	68
*Cortes semifinos: azul de toluidina	68
*Cortes ultrafinos y contraste	70
Determinaciones bioquímicas para testosterona, estradiol y progesterona	71
<b>RESULTADOS</b>	<b>72</b>
<b>PARTE A: GENERALIDADES DE LA GLANDULA PINEAL</b>	<b>73</b>
Microscopía óptica	73
Microscopía electrónica de transmisión	78
<b>PARTE B: CELULAS INTERSTICIALES DE LA GLANDULA PINEAL</b>	<b>81</b>
Estudio inmunohistoquímico estacional de las células intersticiales en vizcachas machos adultos	81
Estudio morfométrico estacional y recuento de células intersticiales con núcleo S-100 positivo	85
Niveles de testosterona sérica en vizcachas machos adultos	86
Estudio relacionado con la edad	86
Estudio inmunohistoquímico de las células intersticiales en vizcachas hembras	89
Determinaciones bioquímicas de estradiol y progesterona en los diferentes estadios de preñez	96
Análisis ultraestructural de las células intersticiales	98
<b>PARTE C: CELULAS PIGMENTADAS DE LA GLANDULA PINEAL</b>	<b>100</b>
Microscopía óptica	100
Histoquímica para DOPA-oxidasa y reacción de Schmorl	103
Estudio de las células pigmentadas durante la preñez	103
Estudio ultraestructural de las células pigmentadas	105
<b>DISCUSION</b>	<b>108</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>122</b>

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>125</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>160</b>

## ABREVIATURAS

% AI-GFAP:	porcentaje de área inmunopositiva para GFAP
% AI-S-100:	porcentaje de área inmunopositiva para S-100
% CI-S-100:	porcentaje de células inmunorreactivas contra la proteína S-100 con un núcleo visible
% CP:	porcentaje de células pigmentadas
5-HT:	serotonina
AANAT:	arilamina-N-acetil transferasa
AMPc:	adenosín monofosfato cíclico
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
AVP:	arginina-vasopresina
CI:	células intersticiales
CP:	células pigmentadas
DAB:	3,3'-diaminobencidina
DAME-S1:	Dimetilaminoetanol
Doble-IHQ:	doble inmunohistoquímica
DOPA:	3,4-dihidroxifenilalanina
E2:	estradiol
ESM:	error estándar de la media
GABA:	ácido gamma-aminobutírico
GCS:	ganglio cervical superior
GFAP:	proteína glio-fibrilar acídica
GMPc:	guanosín monofosfato cíclico
GnRH:	hormona liberadora de gonadotrofinas
HIOMT:	hidroxindol-O-metil-transferasa
L-O:	luz-oscuridad
MET:	microscopía electrónica de transmisión
NA:	noradrenalina
NAS:	5-hidroxi-N-acetil serotonina
NAT:	N-acetil transferasa
NPY:	neuropéptido Y
NSQ:	núcleo supraquiasmático
OsO <sub>4</sub> :	tetróxido de osmio

OT:	oxitocina
P1:	pinealocitos tipo I
P2:	pinealocitos tipo II
PBS:	buffer fosfato salino
PG:	progesterona
PTAHM:	hematoxilina-ácida fosfotúngstica modificada
RHT:	tracto retinohipotalámico
RIA:	radioinmunoensayo
ROR:	receptor huérfano del retinoide
SNAT:	serotonina-N-acetil transferasa
SNC:	sistema nervioso central
TPH:	triptófano hidroxilasa
TRH:	hormona liberadora de tirotrófina
TSL:	treonilserinilisina
VIP:	péptido intestinal vasoactivo

## UNIDADES DE MEDIDA

cm:	centímetro
mm:	milímetro
$\mu\text{m}$ :	micrómetro
nm	nanómetro
ml:	mililitro
kg:	kilogramo
g:	gramo
mg:	miligramo
ng:	nanogramo
pg:	picogramo
h:	hora
min:	minuto
seg:	segundo
$^{\circ}\text{C}$ :	grado centígrado
M:	molaridad
N:	normalidad
H:	heliofanía
G:	fuerza centrífuga relativa

## RESUMEN

La localización anatómica de la glándula pineal en la encrucijada del sistema nervioso central, su carácter impar en un entorno de estructuras dobles y su aspecto morfológico han atraído la atención de numerosos científicos a lo largo de la historia. En mamíferos la glándula pineal es un órgano endocrino pequeño, impar y de ubicación mediana, que se origina a partir del tubo neural en el segundo mes de vida intrauterina. Es uno de los órganos endocrinos más vascularizados. En el parénquima se distinguen tres tipos celulares: **pinealocitos**, **células intersticiales (CI)** y **células pigmentadas (CP)**. El pinealocito es la célula principal y el encargado de sintetizar la melatonina pineal. Las CI son consideradas de nutrición y sostén. La proteína S-100, la proteína glío-fibrilar ácida (GFAP) y vimentina son los marcadores más utilizados para el estudio de células gliales del sistema nervioso central y de las CI. Estas proteínas desempeñan múltiples funciones a nivel intracelular y algunas extracelulares. La importancia biológica de las CP en pineal aún no ha sido esclarecida. La síntesis y secreción de melatonina está sujeta a un fuerte control lumínico a través del eje retino-hipotálamo-pineal y su inervación simpática. La pineal es considerada un transductor neuroendocrino. Los cambios estacionales en el perfil de secreción de melatonina, regulados por el fotoperíodo, son utilizados por los animales para coordinar un amplio rango de eventos fisiológicos, entre los que destacan la función reproductiva, sueño, hibernación, humor, sistema inmune. Desde hace cuatro décadas nuestro grupo de trabajo estudia al *Lagostomus maximus maximus* (vizcacha). Los numerosos antecedentes sobre reproducción y adaptación en animales de vida silvestre, la importancia de las señales ambientales en la sincronización de estos procesos y los diferentes interrogantes respecto a las funciones de las CI y CP en relación a la estacionalidad, edad y sexo, nos indujeron a plantear las siguientes **hipótesis de trabajo**:

a) “*Las CI de la glándula pineal de vizcacha exhiben variaciones citológicas e inmunohistoquímicas estacionales, sugiriendo una activa participación en la función glandular*”.

b) “*Las CP de la glándula pineal de vizcacha se modifican en relación a los esteroides gonadales*”.

La vizcacha es un roedor autóctono de hábitos nocturnos y la actividad diaria de estos animales está regulada por fotoperíodo natural. El macho adulto es un reproductor estacional dependiente del fotoperíodo. La hembra es un animal monoestral que en



cautiverio se vuelve poliestral. La gestación tiene una duración aproximada de 154 días. Los protocolos experimentales desarrollados en esta Tesis Doctoral fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética Local. La captura de los animales se realizó con un sistema de trampas rectangulares con puertas batientes ubicadas estratégicamente en las bocas de las vizcachas. Los animales fueron trasladados al bioterio, anestesiados, pesados y sacrificados inmediatamente. En machos la condición reproductiva fue determinada por histología testicular y se trabajó con ejemplares adultos para estudios estacionales y con inmaduros sexuales para estudios relacionados con la edad. En hembras la condición reproductiva se determinó por el estudio histológico de los ovarios. Adicionalmente, los cuernos uterinos fueron examinados para evaluar la presencia de embriones y/o fetos y clasificar la preñez en inicial, media y final. Las glándulas fueron extraídas rápidamente, fijadas y procesadas para microscopia de luz o electrónica de transmisión (MET). Se utilizaron 4 pineales por grupo en cada estudio realizado. Además, se extrajo sangre por punción cardíaca para realizar estudios hormonales de testosterona, estradiol (E2) y progesterona (PG). Para el estudio de las CI se realizaron técnicas histológicas de rutina e inmunohistoquímicas utilizando como marcadores a las proteínas S-100, GFAP y vimentina. Para el estudio óptico de las CP se utilizaron diversas técnicas histológicas e histoquímicas. La MET fue utilizada para estudiar ambos tipos celulares. Diversos parámetros morfométricos fueron determinados y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media. Los datos obtenidos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferencias con un valor de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativas.

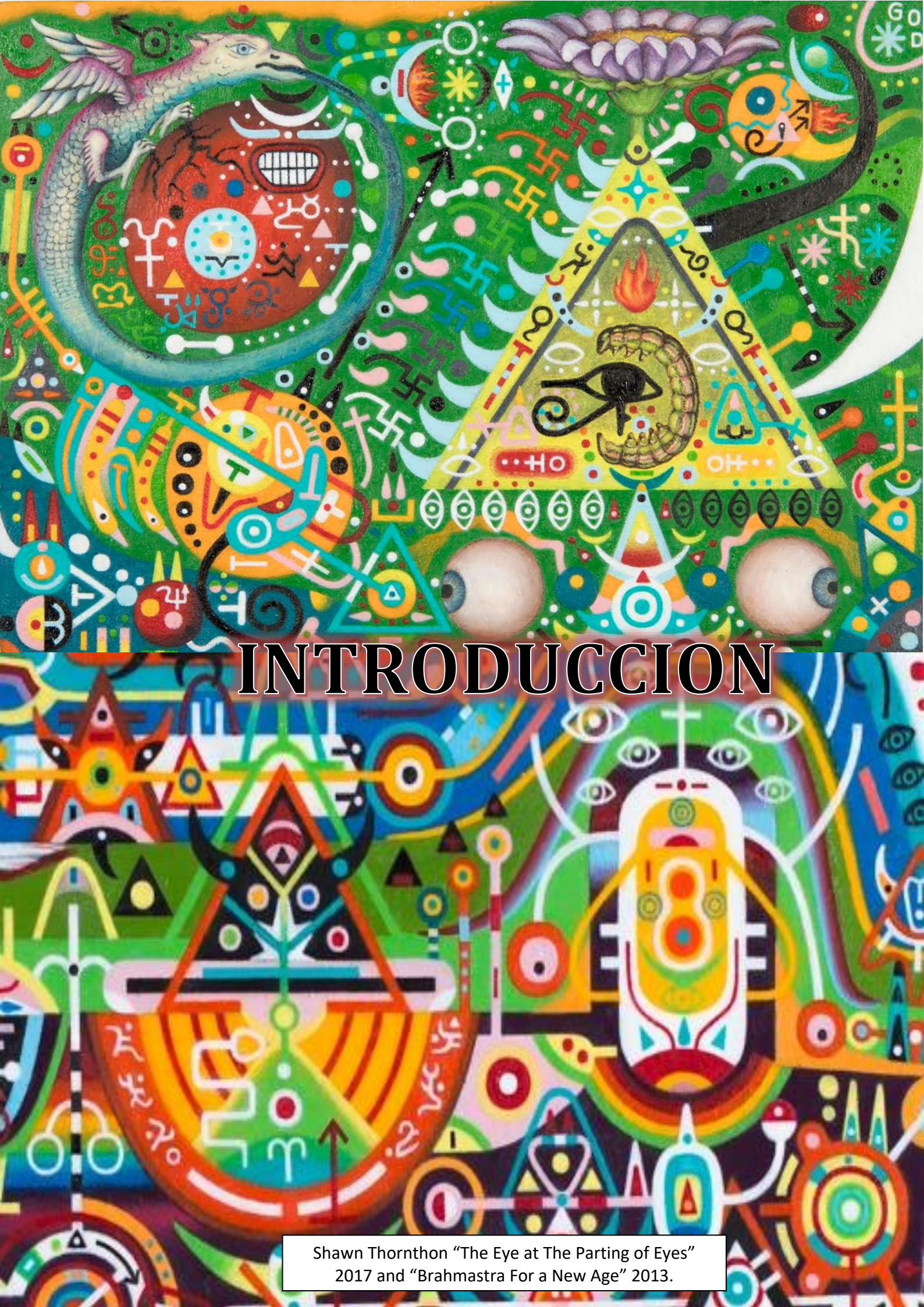
La glándula pineal de vizcacha presentó una forma ovoide, alargada y conectada con un tallo a la base del cerebro. La porción glandular más cercana al tallo fue redondeada y amplia (proximal), volviéndose más delgada y puntiaguda hacia su extremo opuesto (distal) resultando en una típica forma de piña. Una cápsula de tejido conectivo se observó revisiténdola. El parénquima presentó abundante vascularización y se distinguieron 3 tipos celulares al microscopio óptico. Los pinealocitos mostraron citoplasma ligeramente basófilo, núcleo redondo u oval, de cromatina laxa y nucléolo evidente. Las CI fueron minoría y se distinguieron por su menor tamaño, núcleos alargados o triangulares y presencia de cromatina más condensada. Se las observó cerca de los espacios perivasculares. Las CP fueron frecuentes en hembras y excepcionales en machos. Presentaron una forma ovoide o redondeada y exhibieron un color marrón claro

u oscuro. Los gránulos de pigmentos fueron observados también en el espacio intersticial. Las calcificaciones pineales fueron ocasionales. A nivel ultraestructural se diferenciaron 2 tipos de pinealocitos; P1 y P2. A su vez, los P1 pudieron ser claros u oscuros según su densidad electrónica. El estudio inmunohistoquímico estacional de las CI, mediante las proteínas S-100 y GFAP, reveló que en machos adultos estas células se localizaron principalmente en la región proximal, y que en la región distal su presencia fue escasa. La proteína S-100 mostró un patrón de inmunomarcación nuclear y citoplasmático. Las CI exhibieron una forma ligeramente estrellada, un cuerpo celular irregular con abundantes procesos citoplasmáticos rodeando a los pinealocitos y/o alcanzando vasos sanguíneos. La inmunomarcación para GFAP se detectó solo en el citoplasma de las CI, alrededor del núcleo y en los procesos citoplasmáticos. El análisis morfométrico estacional reveló que el porcentaje de área inmunomarcada para S-100 y GFAP (%AI-S-100 y %AI-GFAP) en ambas regiones pineales, fue más alto en los animales capturados en invierno y menor en los de verano. En inmaduros sexuales, los parámetros morfométricos fueron menores que en las vizcachas adultas. Las determinaciones bioquímicas de testosterona variaron significativamente entre los machos adultos y los inmaduros. En hembras, la inmunopositividad de las CI varió significativamente en relación a la preñez, especialmente en la región distal. En las de preñez media, los % AI-S100 y % AI-GFAP fueron más altos en ambas regiones pineales, en comparación a las hembras no grávidas cuyos valores fueron los más bajos. En todos los grupos estudiados, la técnica de doble inmunohistoquímica reveló que algunas CI expresaron colocolización para ambas proteínas, mientras que otras exclusivamente una de ellas. La vimentina fue positiva en los procesos citoplasmáticos de algunas CI y vasos sanguíneos en todos los grupos analizados. La ultraestructura reveló CI con núcleo alargado, electrodenso y con largas prolongaciones citoplasmáticas. El análisis de las CP mostró la presencia de pigmentos en la glándula pineal de hembras no grávidas y grávidas. La técnica de plata de Masson-Fontana, la reacción de Shmorl, la histoquímica para DOPA-oxidasa, fueron positivas para melanina. Se encontraron variaciones significativas en la cantidad de pigmentos pineales en relación con los niveles séricos de hormonas sexuales entre vizcachas no preñadas y preñadas. Las de preñez media presentaron mayor porcentaje de células respecto de las no grávidas. La ultraestructura reveló células redondeadas, electrodensas, con numerosos pre-melanosomas y melanosomas. En hembras E2 y PG exhibieron diferencias significativas entre las vizcachas no grávidas y grávidas.

En la glándula pineal de vizcacha las CI expresaron principalmente la proteína S-100 y la GFAP, y en menor medida la vimentina. Por esta razón proponemos que en nuestro modelo de estudio el origen de las CI es neuroectodérmico. Fue característico de estas células la presencia de numerosas proyecciones citoplasmáticas capaces de generar una intrínseca red de comunicación intercelular intraglandular. Esto nos permite sugerir que las CI mediante esta red de comunicación podrían coordinar la actividad de los pinealocitos, a través de las funciones intracelulares de las proteínas estudiadas, participando activamente en la regulación de histofisiología glandular. En el estudio estacional observamos un aumento en la expresión de las proteínas S-100 y GFAP durante el fotoperíodo corto. Esto se relacionó con la gran actividad glandular, especialmente en los pinealocitos, con mayor síntesis de melatonina. Así, sugerimos una actividad sincronizada entre ambos tipos celulares. En referencia a los inmaduros sexuales podemos indicar que existe una relación directa entre la expresión de estas proteínas y la edad del animal. En las vizcachas hembras los niveles de E2 y PG están sujetos a variaciones durante la preñez. Estas variaciones coincidieron con los cambios observados en las características histológicas y morfométricas de las CI en cada etapa de la preñez. Esto demuestra una relación directa entre la actividad pineal y los niveles de hormonas ováricas en la hembra grávida. Los resultados de doble inmunohistoquímica podrían indicar la existencia de CI en diferentes estadios funcionales, probablemente relacionadas con las necesidades del microambiente celular. Las células vimentina-positivas en especímenes adultos sugiere la existencia de una población de células gliales inmaduras que podrían servir como población de reserva. Respecto a las CP, los cambios reportados en relación al contenido de melanina pineal durante la gestación, indican la influencia de los niveles de hormonas gonadales circulantes sobre el contenido de pigmentos. Por lo tanto, sugerimos que la glándula pineal de la vizcacha hembra es más susceptible a las señales endocrinas durante la preñez y menos sujeta al fotoperíodo ambiental.

Los resultados obtenidos nos permitieron demostrar y aceptar las hipótesis planteadas. Por otro lado, podemos concluir que ambos tipos celulares; CI y CP, desempeñan otras funciones además de sostén y nutrición. Esto sugiere que estas células son necesarias para garantizar un adecuado microambiente celular en la glándula pineal de la vizcacha, asegurando así su óptima función neuroendocrina.





# INTRODUCCION

Shawn Thornton "The Eye at The Parting of Eyes"  
2017 and "Brahmastra For a New Age" 2013.



## PARTE A: GLANDULA PINEAL

Las sucesiones rítmicas del día y la noche han dado forma a la vida en la tierra desde su comienzo. Por lo tanto, la presencia de estructuras sensibles a la luz proporciona una ventaja selectiva para los seres vivos y ha evolucionado en casi todos los *phyla* de plantas y animales (Darwin, 1859; Gehring, 2005; Peirson y Foster, 2006). La luz transporta dos tipos de información que son de suma importancia para la supervivencia: 1) Respecto a la forma tridimensional, color y movimiento de los objetos, y 2) una señal temporal que distingue el día, la noche y la duración relativa de ambos. La capacidad para detectar la luz, fue optimizada con el desarrollo de un oscilador circadiano endógeno que permite al organismo anticipar el crepúsculo, el amanecer y los tiempos para alimentarse y descansar, lo que ayuda a escapar de los depredadores y optimizar la supervivencia. Bajo esta presión selectiva, han evolucionado en el diencefalo de todos los vertebrados dos sistemas visuales especializados para manejar la información de la luz: 1) los ojos laterales, que forman imágenes de objetos, y 2) la glándula pineal o epífisis cerebral, que transduce la sucesión externa de luz y oscuridad en un mensaje hormonal interno (Peirson y Foster 2006).

En esta Tesis Doctoral estudiamos la glándula pineal, el llamado “tercer ojo” de los vertebrados (Mano y Fukada, 2006), en un roedor autóctono de reproducción fotoperiodo dependiente, el *Lagostomus maximus maximus* o vizcacha. Se analizarán exhaustivamente las células intersticiales y células pigmentadas de la glándula pineal y sus modificaciones en relación a diferentes situaciones fisiológicas.

### **Reseña histórica sobre la glándula pineal**

Según los estudios históricos realizados por el neuroanatomista J. Ariens Kappers (1979), en la cultura occidental la primera mención de la glándula pineal en la especie humana se remite al mundo griego. Herófilo de Alejandría (325-280 A.C) afirmaba que este órgano actuaba como “*esfínter que controla el flujo de pensamientos*”. Recogiendo la herencia filósofo-fisiológica de Aristóteles (384-328 A.C) y las viejas concepciones hipocráticas, Herófilo inicia la construcción de una nueva doctrina fisiológica siendo considerado el máximo exponente de la llamada “*anatomía alejandrina*”. Según Aristóteles, el alma tiene tres facultades que residen en las tres partes del sistema ventricular: “*phantasia o imaginato*” situada en los ventrículos laterales; “*anamnesis o*

*discursos mentis o cogitatio*” ubicada en el tercer ventrículo; y por último *“mneme o memoria”* situada en el cuarto ventrículo. De esta forma por su situación entre el tercer y cuarto ventrículo, el sabio de Calcedonia le asignó a la pineal el papel de válvula reguladora en el control del flujo de los pensamientos por el sistema ventricular (Lasso de la Vega, 1972). Esta descripción de la epífisis se debe fundamentalmente a su situación anatómica en el Sistema Nervioso Central (SNC), que desde siempre atrajo la atención, al suponerse que en él estarían situadas las facultades específicamente humanas.

Desde tiempos ancestrales la filosofía hindú recogió la idea de que la epífisis *“es un órgano de clarividencia y meditación que podría permitirnos recordar vivencias pasadas”*, identificando así al órgano pineal con un órgano místico (Hiroshi Motoyama, 1982). En las vedas, el chakra del *“Tercer Ojo”*, también llamado *AJNA* (del sánscrito) otorga la visión de los mundos sutiles, haciendo posible la conexión directa con una fuente ilimitada de sabiduría (Esq. 1). Es el punto energético clave para desarrollar los distintos fenómenos *psi*, tales como intuición y clarividencia. Los yoguis de la India aseguran que la glándula pineal es la ventana de Brahama, el ojo de diamante, el ojo de la polividencia, que mediante cierto entrenamiento especial proporciona la percepción ultra.

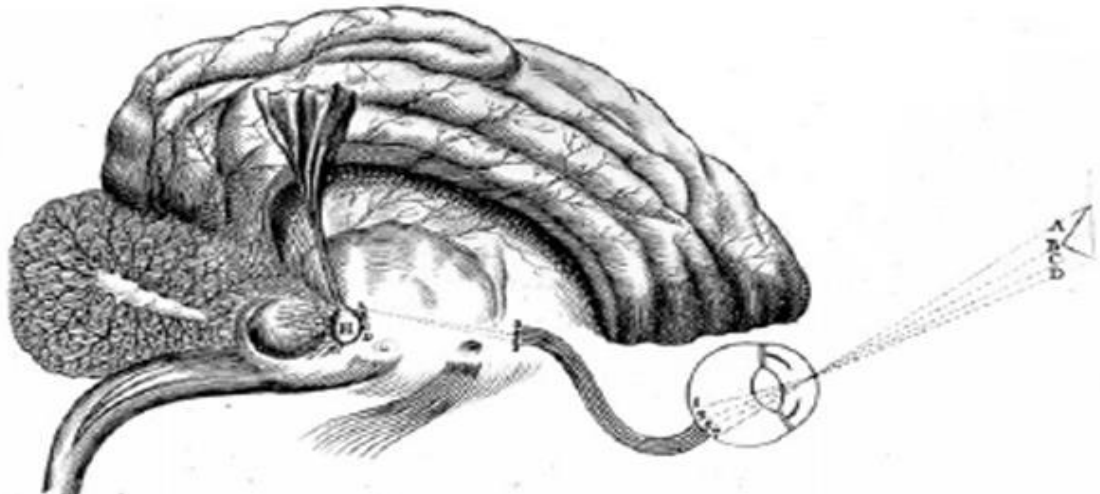


Esquema 1: Disposición de los 7 chakras mayores en la filosofía hindú. Extraído de *“Theories of the Chakras: Bridge to higher consciousness”* de Hiroshi Motoyama. 1982. Ed. New Age

Galeno (130-200) estudió diferentes especies animales y por la analogía entre los órganos, hominizó sus resultados. Se debe precisamente al maestro de Pérgamo, el nombre de “*konarium*” (piña en griego) que se le atribuyó a la glándula pineal. Esto se debió al aspecto piriforme, semejante al de este fruto, que presentaron las epífisís que estudió. Actualmente, dicho término continúa empleándose. Galeno describió con gran detalle la anatomía del “*konarium*” en su libro “*De anatomicis administrationibus*”, pero relegó su papel funcional a un mero órgano pseudoglandular linfático que servía de sujeción a la masa de venas cerebrales que recorren la cara posterior y dorsal del diencefalo, hipótesis defendida en el libro octavo de su obra *De usu partium* (Zrenner, 1985; Rocca, 2003).

El siguiente aporte en el conocimiento de la pineal tuvo lugar en el Renacimiento. Andrés Vesalio (1514-1564) en su obra “*De Humanis Corporis Fabrica*” publicada en 1543, describía la situación anatómica de la glándula pineal, señalando que dicho órgano no forma parte del cerebro, pero se apoya sobre los tubérculos cuadrigéminos anteriores.

En el siglo XVII, René Descartes (1596-1656), introdujo un concepto enteramente mecánico de la actividad del cuerpo humano. Recogiendo en gran parte las ideas de la filosofía griega, Descartes logra embellecer estas concepciones fisiológicas y anatómicas, proponiendo así a la epífisís en su libro “*Traité de l’homme*” como el asiento del alma racional (Van Gijn, 2005; Lokhorst, 2008). La fisiología cartesiana postuló la existencia de un mecanismo ojo-epífisís-músculo, estableciendo intuitivamente y sin base científica su posible significado funcional. La pineal, situada en el centro del sistema ventricular, sería la encargada de extraer ciertas partículas de la sangre y convertirlas en espíritus animales, que posteriormente serían vehiculizados hasta las diferentes partes del sistema ventricular a merced de ciertos movimientos activos de este órgano (Esq. 2). Cada cambio en la posición epifisaria correspondería a una percepción distinta del alma, y ésta por su parte, podría mover la glándula por el mero hecho de percibir (López-Muñoz y Boya 1992; López-Muñoz y Álamo, 2000).



Esquema 2: Situación anatómica de la glándula pineal, según los planteamientos de Descartes y la interpretación del ilustrador, Florent Schuyl (figura XXXIV de *De Homine*, 1662). Extraído de “La glándula pineal como instrumento físico de las facultades del alma: una conexión histórica persistente”. F. López-Muñoz, G. Rubio, J.D. Molina y C. Alamo. *Neurología*, 2012. Ed. ELSEVIER.

Niels Steensen (1638-1686) refuta las teorías cartesianas de Descartes y en su obra “*Discours sur L'anatomie du cerveau*” publicada en 1670, demostró que la glándula pineal se situaba en posición dorsal respecto al sistema ventricular y no en el centro. Además, sus uniones con las meninges la convertían en un elemento inmóvil lo que impedía su papel de esfínter en la convección de los espíritus animales. A esta demostración anatómica se uniría posteriormente el filósofo alemán Immanuel Kant (1724-1804), quién atribuyó al alma un carácter espiritual, por lo que no podría localizarse en un espacio delimitado (Kappers, 1979).

El inglés Thomas Gibbson en su libro “*The Anatomy of Human Bodies Epitomized*” (1682) acuñó el término glándula pineal, al describirla como un “*penit*” suspendido sobre y entre los tubérculos cuadrigéminos inferiores o “*testes*”.

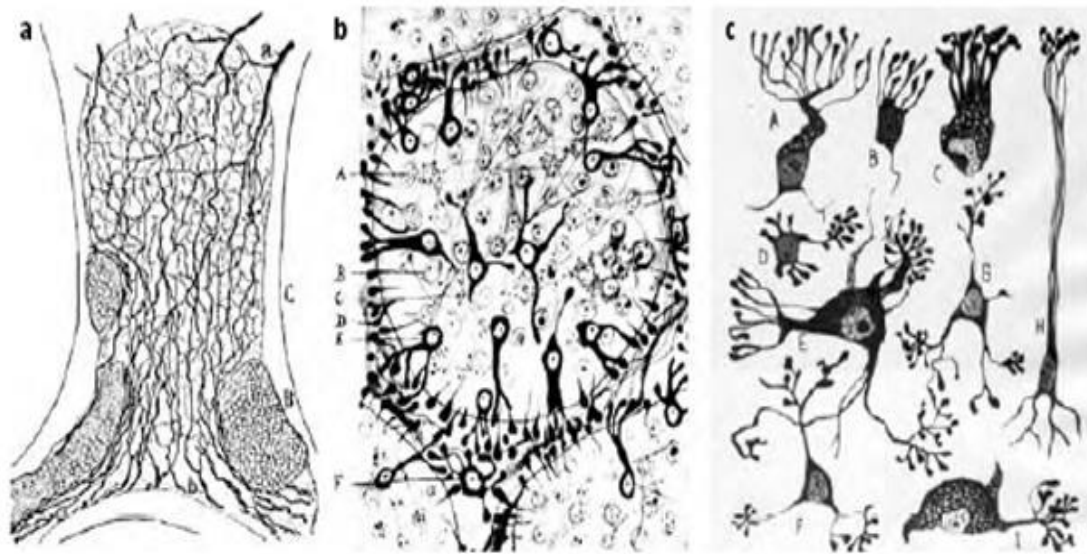
Durante todo el siglo XVIII, la glándula pineal permaneció en el olvido, y el adjetivo “*vestigial*” aplicado a este órgano, era el más corrientemente utilizado.

Tras un siglo de silencio y con este planteamiento se llegó hasta el siglo XIX. Aquí, es cuando renació el interés por esta glándula y se profundizó el estudio de los conocimientos anatómicos, así como también se realizaron avances en el conocimiento de aspectos histológicos y del desarrollo embriológico. Tiedemann (1823) detalló el desarrollo de la epífisis en fetos humanos de tres meses, originando a los cuatro meses de gestación una glándula pequeña y redondeada. “*En el séptimo mes es un pequeño cuerpo*



*blando, que pasa a ser alargado al noveno mes*". Clarke en 1862 describió células de núcleo redondeado y granuloso en la epífisis, mientras que, en 1866, Leydig reportó la presencia de fibras nerviosas en la glándula. Durante la segunda mitad del siglo XIX, las opiniones de los investigadores diferían respecto al órgano pineal: Hagemann (1872) indicó que las células glandulares eran de naturaleza mixta, epiteliales y/o nerviosas. Según Darksche-Witsch (1886) la glándula estaba formada por elementos nerviosos. Henle (1887) le atribuía a la glándula pineal una estructura comparable a la de los ganglios linfáticos. Weiger (1895) admitió su naturaleza neurológica como elementos epiteliales modificados de las células glandulares.

Durante las primeras décadas del siglo XX, la hipótesis de la inhibición gonadal por parte de la pineal, planteada por Gutzeit (1896) al asociar la existencia de un tumor pineal a un síndrome de desarrollo sexual precoz, quedó promulgada por Marburg (1930), quien describió a la pineal como una glándula endocrina con acción inhibitoria sobre el desarrollo y la función gonadal. Previamente Foa (1912) demostró experimentalmente que la pinealectomía producía un desarrollo precoz de los caracteres sexuales secundarios. Es importante destacar que, en esta época, adquiere gran auge la llamada Escuela Española de Histología, a expensas de Ramón y Cajal (1852-1934). Este histólogo consideró a la pineal como una "*glándula vascular sanguínea*" y estudió su inervación simpática, así como las prolongaciones de los pinealocitos (Ramón y Cajal, 1904). Sus discípulos, también se ocuparon del estudio de la estructura histológica pineal: Achúcarro y Sacristán (1912), Achúcarro (1913), Rio-Hortega (1922, 1932). Siendo este último quien consideró al elemento parenquimatoso pineal como una célula equidistante de la neurona y de la neuroglia, dotada de facultades secretoras específicas, confirmando definitivamente la naturaleza glandular del órgano pineal (Esq.3). El propio Rio-Hortega afirma en 1922 algo que parece confirmarse en la actualidad, gracias a la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas: "*los lobulillos de la pineal están constituidos sólo por dos especies celulares perfectamente diferenciadas, en las que existen algunas variedades: son las células parenquimatosas y las células neurógicas*".



*Esquema 3: Dibujos histológicos de la glándula pineal realizados por algunos integrantes de la prestigiosa Escuela Española de Histología, surgida en torno a la figura de Santiago Ramón y Cajal durante el primer tercio del siglo XX. a) Dibujo del propio Cajal que representa la inervación simpática de la epífisis de ratón; b) Esquema ilustrativo de la estructura de la glándula pineal humana del adulto, realizado por Achúcarro; c) Diversos tipos morfológicos de células parenquimatosas pineales, según esquemas de Río-Hortega. Extraído de “El devenir histórico de la glándula pineal: De sede del alma a órgano neuroendocrino” de Francisco López-Muñoz, Fernando Marín, Cecilio Álamo. Neurología 2010.*

Roux (1937) describe la pineal envuelta en una cápsula de tejido conectivo que la relaciona con los plexos coroideos. Este tejido penetra en el interior de la cápsula formando finas trabéculas; se trata de un tejido conectivo fibroso, especialmente abundante en el vértice de la glándula. Afirmaba “*que el tejido conectivo suele faltar en embriones y animales jóvenes, y siempre era más abundante en equinos y cerdos que en ovinos*”. En 1943 Bargmann señaló que la pineal de los mamíferos se originaba a partir del área endimaria diencefálica, situándose entre las comisuras habenuar y posterior. También postuló que en los mamíferos la glándula pineal debería ser considerada como un órgano foto-neuroendocrino. Mikami (1951) estudió las células parenquimatosas de la epífisis de caballo, cerdo y cabras, encontrando gránulos argentófilos, tanto en el citoplasma como en las prolongaciones.

La era actual del conocimiento pineal se inicia en 1954, cuando Kitay y Altschule publican el libro “*The Pineal Gland*”. Estos autores atribuyen a la epífisis la intervención en el control de la función gonadal, así como en la respuesta dérmica, en vertebrados

inferiores, a los cambios de luz ambiental y alguna vinculación con la conducta (Guerrero y col., 2007). Sin lugar a dudas, el hallazgo más influyente en la investigación pineal fue la identificación y aislamiento de la melatonina (5-metoxi-N-acetil-triptamina), llevada a cabo por Lerner y col. (1958). Esta indolamina, reproducía los efectos de extractos pineales y revertía las secuelas de la pinealectomía. Casi de forma simultánea se constató que su síntesis era regulada en los mamíferos por la luz ambiental. Esto se demostró a través de una vía neural iniciada en retina y que terminaba en las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (Axelrod y Wurtman, 1968; Fiske y Huppert, 1968; Quay, 1974, 1986; Guerrero y col., 2007). Luego se demostró la presencia de un oscilador circadiano situado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo que controlaría la síntesis de melatonina en función de la actividad de la enzima N-acetil transferasa (NAT; Klein y col., 1971; Moore y Klein, 1974; Reuss y col., 1996; Simmoneaux y Ribelayga, 2003).

En la década de los 60 comenzó la aplicación de la microscopia electrónica al estudio de la glándula pineal. Wartenberg y Guserk (1965) realizaron un estudio ultraestructural sobre la epífisis de conejo, poniendo de manifiesto la existencia en los pinealocitos de numerosas prolongaciones. Observaron que el núcleo se presentaba pobre en cromatina y mostraba un nucléolo poco desarrollado. Por último, describían escasa cantidad de fibras gliales. Arstila (1967) en pinealocitos de rata, describió características similares a lo referenciado por Wartenberg y Guserk (1965) y destacó la presencia de mitocondrias abundantes, tanto en pericarion como en las prolongaciones próximas a las barras sinápticas. Welser y col. (1968) estudiaron la ultraestructura del pinealocito canino, describiéndolo como una célula redondeada y con pocos procesos citoplasmáticos. Acompañando a este tipo celular más común, también se puso de manifiesto la presencia de pinealocitos oscuros, con núcleo más pequeño y mayor número de organelas citoplasmáticas. González y Álvarez-Uría (1970) analizaron las características ultraestructurales de la célula intersticial de la glándula pineal en rata adulta, destacando: núcleo oval, complejo de Golgi muy desarrollado y mitocondrias alargadas de aspecto granuloso.

En 1965 Wurtman y Axelrod acuñan el término “*transductor neuroendocrino*” para definir la glándula pineal. En esta misma línea, Cardinali y col. (1981, 1983) catalogan al ganglio cervical superior, del que procede la inervación simpática de la glándula pineal, de “*centro periférico neuroendocrino*” (1981) y “*pequeño cerebro*

*neuroendocrino*” (1983), dando a entender su gran importancia como nexo entre el exterior y la epífisis. Actualmente se puede afirmar que la epífisis es una glándula de secreción interna y un componente importante de los sistemas foto-neuroendocrinos.

A partir de la década del 70, se publicaron numerosos trabajos en la literatura científica internacional relacionados al estudio del órgano pineal, principalmente en animales de vida silvestre. Muchos de estos trabajos fueron basados en técnicas inmunohistoquímicas, citoquímicas y mediante el análisis ultraestructural. Es interesante remarcar que dentro de estos primeros intentos por analizar el comportamiento histofisiológico de la glándula, ocupan un lugar cronológico preferencial los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio a partir de los primeros años de la década del 80, utilizando como modelo experimental el *Lagostomus maximus maximus* (Guzmán y col., 1980, 1983; Scardapane y col., 1983; Piezzi y col., 1985; Domínguez y col., 1987)

En la actualidad, con los avances en técnicas de biología molecular y genética, la mayoría de los estudios sobre la glándula pineal y su principal hormona, la melatonina, tienen como base el estudio de enfermedades neurodegenerativas y tumores pineales. Es de importancia destacar la acción de esta hormona como antioxidante, su acción inmunológica, cronobiótica y usos farmacológicos, como así su importancia psicológica, lo que ha llevado que en la actualidad se intensifiquen las investigaciones sobre estos efectos.

### **Anatomía de la glándula pineal**

La glándula pineal es un órgano endocrino pequeño, impar y de ubicación mediana, que se origina en el segundo mes de vida intrauterina como una evaginación de forma cónica desde el techo del diencéfalo (Bertolucci y Foa, 2004; Macchi y Bruce, 2004). Se orienta antero posteriormente sobre el surco que separa los colículos superiores con la pared posterior del tercer ventrículo y encontrándose unida a las comisuras habenuar y posterior por una formación pedicular llamada tallo pineal (Rouvière y Delmas, 2005). Su ubicación, forma, tamaño, y características histológicas son muy variables entre las diferentes especies de vertebrados (González-González y Álvarez-Uría, 1984; Arendt, 1995).

En la mayoría de las especies de mamíferos el tallo pineal conecta la glándula con la comisura habenuar, generalmente unida al tercer ventrículo, y la inserta en una región

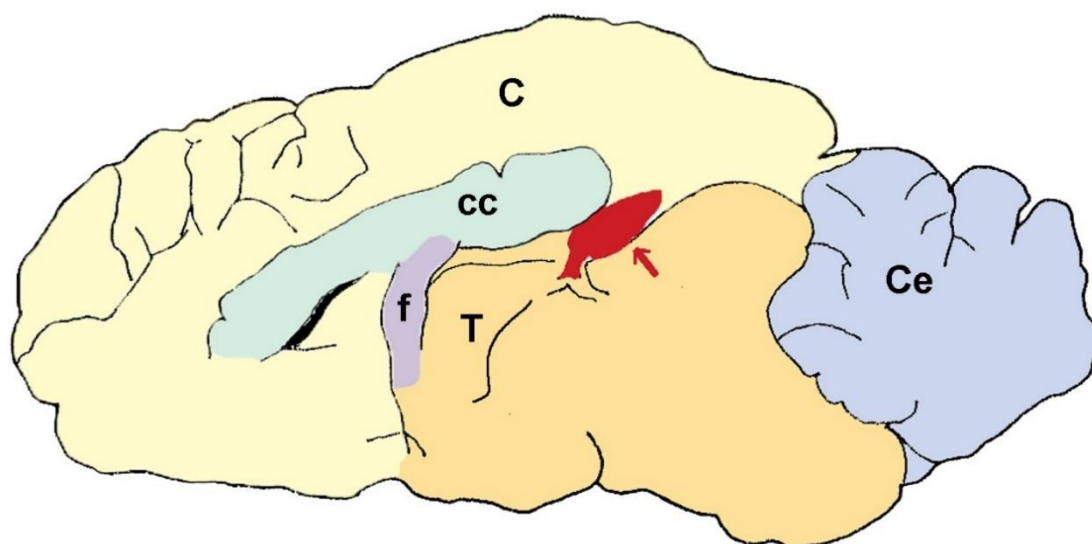
denominada receso pineal (Rouvière y Delmas, 2005). La glándula se encuentra embebida por líquido cefalorraquídeo y cubierta por la piamadre la cual forma una cápsula desde la que se proyectan tabiques por los cuales ingresan gran cantidad de vasos sanguíneos. Posteriormente, dichos tabiques la dividirán en lobulillos incompletos (Koshy y Vettivel, 2001a; Junqueira y Carneiro, 2003). En los roedores esta glándula puede estar dividida en dos partes: una superficial ubicada sobre la cara dorsal del cerebro y una profunda, sobre el tallo cerebral. Ambas partes están conectadas por el tallo pineal, que puede contener algunos pinealocitos en determinadas especies (Vollrath, 1981). Kappers (1960), indicó que el tallo pineal en rata albina está constituido por tejido conectivo, vasos sanguíneos, fibras nerviosas y células parenquimatosas, más o menos diferenciadas como pinealocitos. Calvo y Boya (1985) lo describieron como un delgado cordón integrado por células de naturaleza glial, pocos pinealocitos, numerosas fibras nerviosas y colágenas que une la pineal superficial con el techo del tercer ventrículo. Por otro lado, la pineal profunda se une a la comisura habenular por arriba y a la comisura posterior por abajo, estableciendo contacto frecuentemente con el líquido cefalorraquídeo a través de los recesos intercomisural y suprahabenular (Vollrath, 1981).

La forma y situación de la glándula pineal de los mamíferos presenta una gran variabilidad macroscópica. Vollrath (1981) propuso una clasificación en la que combina la forma del órgano pineal y su relación topográfica con el tercer ventrículo. Así, clasifica la glándula pineal en varios tipos:

- ❖ Tipo proximal o tipo A, en la que la mayor parte del tejido pineal está íntimamente relacionado con el tercer ventrículo.
- ❖ Tipo intermedio-proximal o tipo AB, cuando la longitud de la pineal es ligeramente superior al doble de su ancho mayor.
- ❖ Tipo próximo-intermedio-proximal o tipo ABC, en el caso de una pineal muy larga, cuya mayor parte de parénquima está alejada del tercer ventrículo y situada superficialmente o próxima al cerebelo.

En la vizcacha, la glándula pineal tiene una forma alargada, ovoide-cónica, ligeramente aplanada y de ubicación profunda con un tallo que la une al encéfalo. Se encuentra localizada profundamente entre las comisuras habenular y posterior (Esq. 4).

De acuerdo a la clasificación propuesta por Vollrath, la pineal de vizcacha pertenece al tipo AB (Domínguez, 1990). El parénquima glandular está envuelto por una cápsula de tejido conectivo, elementos derivados de la piamadre y vasos sanguíneos. Su tamaño promedio es de 4 mm de longitud y 2,5 mm de ancho, con un peso promedio de 4,23 mg (Cernuda-Cernuda y col., 2003).



Esquema 4: Dibujo de una sección sagital del cerebro de vizcacha. La flecha indica la glándula pineal. C: Corteza cerebral; cc: Cuerpo calloso; f: Fornix; T: Tálamo; Ce: Cerebelo. Extraído y modificado de "Aspectos morfológicos y ultraestructurales de la glándula pineal del *Lagostomus maximus maximus*". Nora Susana Domínguez, 1990. Universidad Nacional de San Luis. UNSL.

### **Embriología de la glándula pineal**

El desarrollo embrionario de la glándula pineal fue estudiado en detalle en el grupo de los roedores, especialmente en rata (Kappers, 1960; Clabough, 1973; Calvo y Boya, 1981a, 1981b; Ueck, 1986). La glándula pineal se origina a partir del tubo neural (Møller y Baeres, 2002). Es por ello que Leonhardt (1980) la incluya dentro del sistema que denomina como "órganos circunventriculares", y del que forman parte todas las estructuras secretoras de carácter neuroendocrino que proceden de las células ependimarias que revisten los ventrículos cerebrales: órgano subcomisural, órgano subfornical, área postrema, neurohipófisis, eminencia media.

Quay (1974) describió la existencia de tres fases en el desarrollo de la pineal: 1- *Fase Morfogenética*, desde la diferenciación hasta el nacimiento. 2- *Fase de Proliferación Glandular*, desde la diferenciación hasta después del nacimiento. 3- *Fase*



*de Hipertrofia y Diferenciación Celular*, desde el nacimiento hasta la duodécima semana de vida extrauterina.

En rata, la morfogénesis de la glándula pineal tiene lugar durante la segunda mitad de la gestación (días 12 al 21). El primer esbozo pineal aparece entre los días 12 y 14, y se desarrolla como una evaginación o apéndice de la línea media del techo diencefálico, entre la comisura posterior y habenular (Clabough, 1973; Calvo y Boya, 1981b). Esta evaginación va elongándose en dirección dorsocaudal adquiriendo forma de saco aproximadamente el día 16. Es el llamado receso pineal, cuya luz comunica con el tercer ventrículo (Vollrath, 1981; Ueck, 1986). Posteriormente se produce la compactación del receso pineal. Según Calvo y Boya (1981b), dos mecanismos están involucrados. En primer lugar, múltiples invaginaciones del epitelio permiten la aproximación y fusión de las paredes del receso. Posteriormente se produce una invasión de su luz por pinealoblastos procedentes de las paredes epiteliales. Luego tiene lugar la invasión del mesénquima por los vasos sanguíneos, en preferencia por la superficie superior media del receso, aunque algunos entran lateralmente (Ueck, 1986). Después del día 18, comienza una intensa actividad mitótica que no cesa hasta varios días después del nacimiento ocasionando el aumento en el volumen glandular (Clabough, 1973; Walker y col., 1978). La diferenciación del pinealoblasto hacia pinealocito sucede en el día 19. La disposición folicular se pierde, adquiriendo un aspecto morfológico de cordones celulares (Vollrath, 1981). Hacia el día 20 de gestación, aparecen tipos celulares con diferentes características ultraestructurales, aunque sus diferencias no son totalmente nítidas hasta el nacimiento Calvo y Boya (1981a).

### **Vascularización de la glándula pineal**

La glándula pineal es uno de los órganos endocrinos más vascularizados (Møller y Baeres, 2002). Se ha establecido que el flujo de sangre en la rata es de 4 ml/min (Macchi y Bruce, 2004) cifra mucho más alta que cualquier otra glándula endocrina y sólo superada por los riñones (Cignolani y Houssay, 2000). En los mamíferos la vascularización proviene de las arterias cerebrales posteriores de las que se originan las arterias coroideas posteriores que rodean a la cápsula pineal y penetran en ella (Stehle y col., 2011). El drenaje venoso viene a confluir a un grueso vaso que tras unirse a la vena cerebral magna desemboca en la porción anterior del seno recto (Beltrán, 2003).

La glándula pineal puede presentar tanto capilares “fenestrados”, con orificios en su pared endotelial que permiten una elevada permeabilidad de la pared vascular, como así también, capilares no fenestrados. La proporción entre ellos varía entre las diferentes especies de mamíferos. Los capilares pineales de rata son de tipo fenestrado, mientras que en gato y perro (Mashimo, 1965), chinchilla (Matsushima y Reiter, 1975), gerbil (Welsh y Reiter, 1978), entre otros, son de tipo no fenestrado. Adicionalmente, el hámster presenta capilares de tipo fenestrado en su pineal superficial, y predominio de capilares no fenestrados en la pineal profunda (Hewing y Bergmann, 1985; Calvo y col., 1988; Boya y col., 1995; Møller y Baeres, 2002). En la pineal de vizcacha, los capilares presentan endotelio sin fenestraciones. Los mismos están rodeados de escaso espacio perivascular en donde se pueden observar algunos pericitos (Cernuda-Cernuda y col., 2003).

### **Inervación de la glándula pineal**

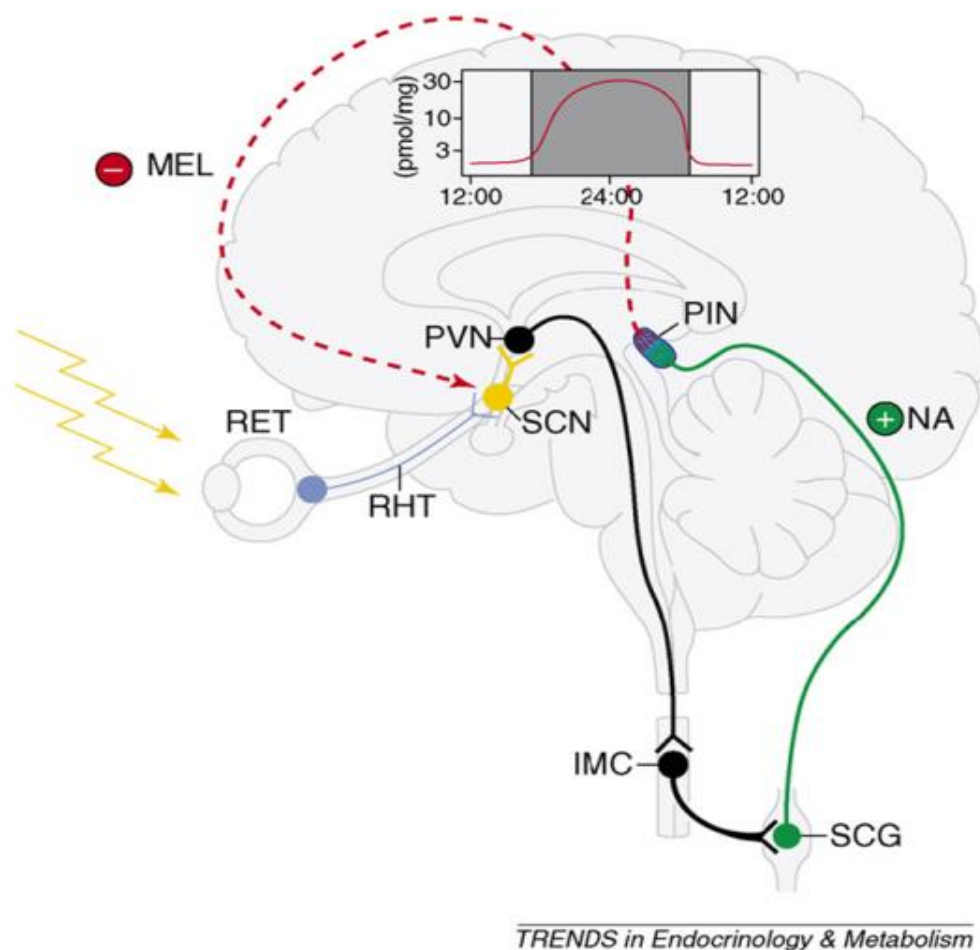
La síntesis y secreción de la hormona melatonina está sujeta a un fuerte control por la información lumínica procedente de la retina que es transmitida al NSQ a través del tracto retinohipotalámico (RHT; Møller y Baeres, 2002). Las fibras nerviosas simpáticas procedentes del ganglio cervical superior (GCS) constituyen, sin duda, la inervación principal de la glándula. Forman parte de una vía multisináptica con origen en la retina y que conduce hasta la pineal información lumínica procesada bajo la forma de impulsos nerviosos, siendo responsable del ritmo circadiano de la biosíntesis y secreción de melatonina. Las conexiones neurales entre la retina y la pineal son similares en todos los mamíferos, incluida la especie humana. Los impulsos nerviosos generados en las células fotorreceptoras de la retina son enviados hacia el hipotálamo anterior mediante un haz de que constituyen el tracto RHT (Moore, 1982). En lo referente al quiasma óptico, estas fibras se separan del tracto principal para dirigirse al NSQ del hipotálamo anterior, donde se inicia una vía multisináptica que hace escala en el núcleo paraventricular del hipotálamo y en la columna celular intermediolateral de la espinal torácica. Desde este núcleo espinal parten los axones preganglionares que proyectan hacia el GCS, cuyas fibras postganglionares alcanzan glándula pineal (Reiter, 1986). Los terminales simpáticos liberan noradrenalina (NA) hacia el espacio intercelular sin llegar a establecer verdaderos contactos sinápticos con los pinealocitos (Korf y Møller, 1984). Esta vía que conecta la retina con la glándula recibe el nombre de Tracto Retino-Hipotálamo-Pineal



(Esq. 5; Vrang y col., 1995; Larsen y col., 1998; Teclemariam-Mesbah y col., 1999; Munch y col., 2002).

En diversas especies de roedores se han descrito conexiones de naturaleza neuronal entre ciertas regiones del SNC y la glándula pineal, lo que ha venido a denominarse inervación central o pinealopetal (Korf y Møller, 1984). En su mayoría, estas vías tienen su origen en núcleos del hipotálamo e implican a neurotransmisores clásicos, como serotonina (5-HT), acetilcolina y dopamina, o péptidos como la arginina vasopresina (AVP), arginina-vasotocina (AVT), hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), neuropeptido Y, somatostatina y hormona liberadora de tirotrófina (TRH).

La inervación parasimpática de la glándula pineal está a cargo de vías provenientes desde los ganglios esfenopalatino y ótico (Møller y Baeres, 2002).



Esquema 5: Representación gráfica del eje retino-hipotálamo-pineal y su inervación simpática. RET: retina; RHT: tracto retino-hipotalámico; SCN: núcleo supraquiasmático; PVN: núcleo paraventricular; IMC: columna celular intermediolateral; SCG: ganglio cervical superior; NA: Noradrenalina; PIN: glándula pineal; MEL: melatonina. Extraído de "The mammalian pineal gland known facts unknown facets". Erik Maronde and Jörg H. Stehle. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2007.

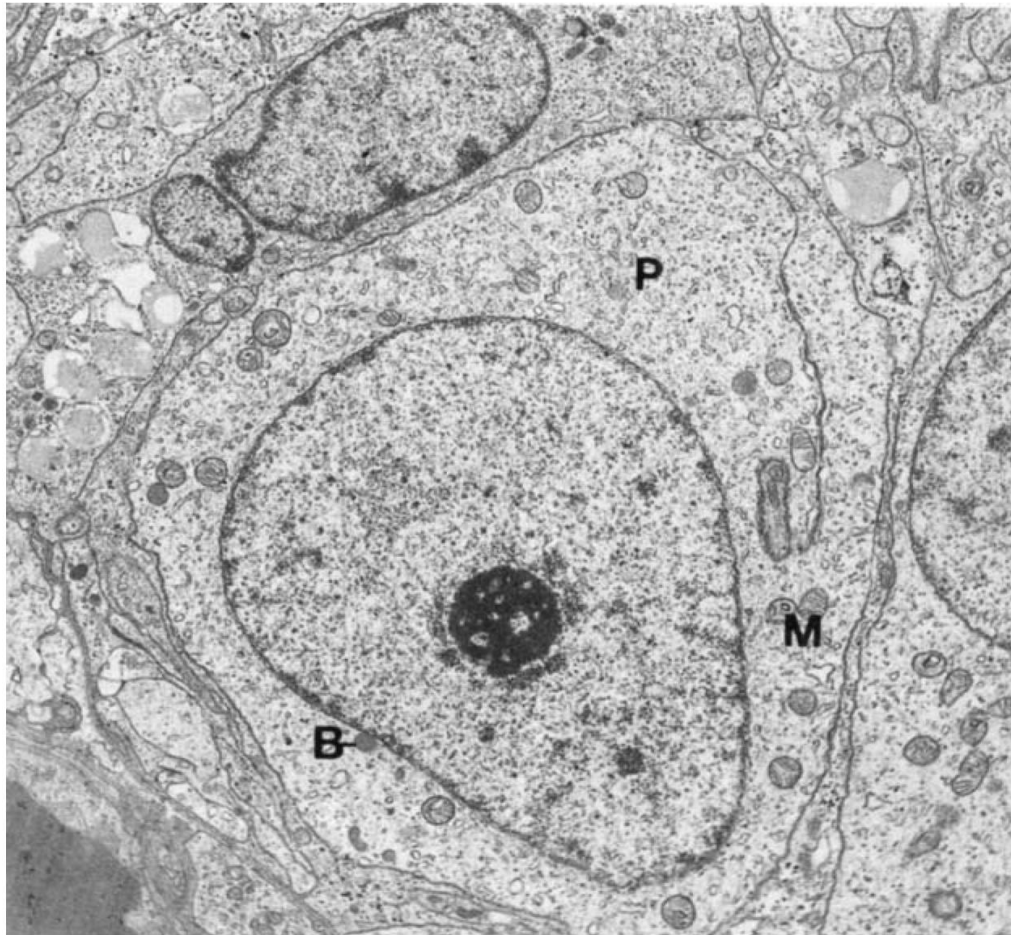
### **Histología de la glándula pineal**

La glándula pineal de los mamíferos es una estructura parenquimatosa muy vascularizada y constituida por agrupaciones celulares cuya morfología difiere en función de la especie estudiada (Vollrath, 1981). Tanto es así, que Rio-Hortega en 1932 afirmaba: *“La glándula pineal no posee un patrón histológico fijo, comparable con el existente en otras glándulas exocrinas y endocrinas; por lo tanto, no se puede afirmar que existan dos glándulas pineales con agrupamientos similares de sus masas celulares”*.

En los mamíferos, se distinguen tres tipos celulares en el parénquima pineal: **pinealocitos, células intersticiales y células pigmentadas** (Vollrath, 1981; Calvo y col., 1992). En menor medida pueden encontrarse otros tipos celulares como fagocitos, fibroblastos y neuronas. Es importante destacar la presencia de calcificaciones pineales (arenilla cerebral; *corpora arenácea*) en las glándulas pineales, en especial aquellas envejecidas (Beltrán, 2003)

El pinealocito, célula epifisaria o célula principal es la célula parenquimatosa más abundante de la glándula pineal. Comprende la mayor parte del parénquima pineal entre el 80% y el 90%) en los mamíferos (González-González y Álvarez-Uría, 1984), como puede observarse en rata (Møller y Baeres, 2002), gerbil mongol (Welsh y Reiter, 1978), vizcacha (Domínguez y col., 1987; Cernuda-Cernuda y col., 2003), entre otros. Es una célula grande que en preparaciones coloreadas con hematoxilina-eosina muestra un citoplasma claro débilmente basófilo, en ocasiones de aspecto vacuolizado, y cuyos límites no están claramente definidos. El núcleo es grande, redondeado u ovalado y presenta cromatina laxa y nucléolo prominente. Puede exhibir un número variable de invaginaciones (Junqueira y Carneiro, 2003). Con impregnación argéntica se observan prolongaciones citoplasmáticas que le dan a la célula aspecto estrellado. Estas prolongaciones citoplasmáticas terminan en expansiones bulbosas que se relacionan con sus homónimas de otros pinealocitos o con los cuerpos de estos con prolongaciones de astrocitos o con el espacio perivascular (Beltrán, 2003). Estudios a nivel de microscopia óptica permiten describir dos variedades de pinealocitos en glándulas pineales humanas, una de aspecto oscuro y otra más pálida (Koshy y Vettivel, 2011a). En microscopía electrónica los pinealocitos exhibieron un núcleo con nucléolo evidente y heterocromatina dispuesta periféricamente. El citoplasma es poco electrodens y rico en organelas. Se encuentran abundantes mitocondrias, retículo endoplásmico liso y granular

bien desarrollados y un discreto complejo de Golgi. En las prolongaciones celulares se observan microtúbulos y en sus extremos vesículas pequeñas en ocasiones electrodensas. Con cierta frecuencia se observan cuerpos multivesiculares, esférulas y barras sinápticas (Kappers, 1976; Vollrath y Huss, 1973; Cernuda-Cernuda y col., 2003). En algunas especies, como en el caso de la rata vieja, se ha descrito la presencia de cilios (Karasek, 1970). Del cuerpo celular del pinealocito se extienden prolongaciones citoplasmáticas de distinta longitud y en número variable, que acaban en la cercanía de otras células pineales o de los vasos sanguíneos. El citoplasma de estas prolongaciones contiene las mismas organelas que el soma celular con la excepción del complejo de Golgi, centriolos y sus derivados (Wartenberg, 1968; Ito y Matsushima, 1968; Lues, 1971). En vizcacha, se describe pinealocitos con características ultraestructurales muy semejantes a lo reportado en otras especies (Fig. 1; Domínguez y col., 1987; Cernuda-Cernuda y col., 2003).



*Figura 1: Ultraestructura de un pinealocito de vizcacha macho capturado durante el verano. La micrografía muestra un pinealocito (P) en el cual se exhiben numerosas mitocondrias (M) y algunos cuerpos densos (B). Magnificación 7200X. Extraído y modificado de "A light and electron microscopic study of the pineal gland of the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*)" Domínguez y col., (1987). J Pineal Res 4:211-219.*

Por otro lado, y en menor medida, se encontró el segundo tipo celular el cual ha sido clasificado como célula densa (Gusek y col., 1965; Matsushima y Reiter, 1975), astrocito (Duncan y Micheletti, 1966; Wallace y col., 1969), célula intersticial (Wolfe, 1965; Arstila, 1967; Gregorek, 1973) o célula glial (Anderson, 1965; Wartenberg, 1968; Herbert, 1971).

En glándula pineal, la presencia de pigmentos ha sido descripta en diferentes especies de mamíferos: por ejemplo, en vacas (Meyer-Arendt y Santamarina, 1956; Santamarina, 1958); chinchilla (Matsushima y Reiter, 1975); caballo (Cozzi, 1986); murciélago (Bhatnagar, 1988; Bhatnagar y Hilton, 1994) perro (Calvo y col., 1988); gato (Calvo y col. 1992); oveja (Regodón y col., 1998; Redondo y col., 2003) e incluso en humanos (Møller, 1974; Min y col., 1987; Koshy y Vettivel, 2001b). Estos pigmentos pineales han sido definidos como células pigmentadas y constituye el tercer tipo celular.

***En vizcacha las denominaremos células intersticiales (CI) y junto a las células pigmentadas (CP) son objeto de estudio del presente trabajo de Tesis Doctoral.***

Además de estos tres tipos celulares, se pueden distinguir células fagocíticas, las cuales se localizan principalmente en los espacios perivasculares (Møller y Baeres, 2002). Estudios inmunohistoquímicos demostraron que son células con funciones macrofágicas (Pedersen y col., 1993; Sato y col., 1996). También pueden encontrarse neuronas, que en algunas especies pueden llegar a formar ganglios dentro del parénquima pineal. La mayoría de éstas son neuronas parasimpáticas inervadas por ganglios periféricos (David y Herbert, 1973).

Finalmente, en la glándula pineal se describió la presencia ocasional de concreciones extracelulares denominadas *corpora arenácea*, *acevuli cerebro*, “arenilla cerebral” o simplemente calcificaciones pineales. Están constituidas principalmente por fosfatos y carbonatos cálcicos que se depositan concéntricamente (Bargmann, 1981; Fawcett 1995; Koshy y Vettivel, 2001a; Junqueira y Carneiro, 2003; Kim y col., 2012). Su origen no es bien conocido, aunque Banks (1993) apuntó que podría ser estromal o glial. No se consideran patológicos ya que pueden encontrarse en la infancia, pero tienden a aumentar en número y tamaño con la edad, sin implicar una disminución de la actividad pineal (Bargmann, 1981; Boya y col., 1984; Cozzi, 1986; Martínez Soriano, 1987; Fawcett, 1995; Vigh, 1998; Junqueira y Carneiro, 2003; Kim y col., 2012).

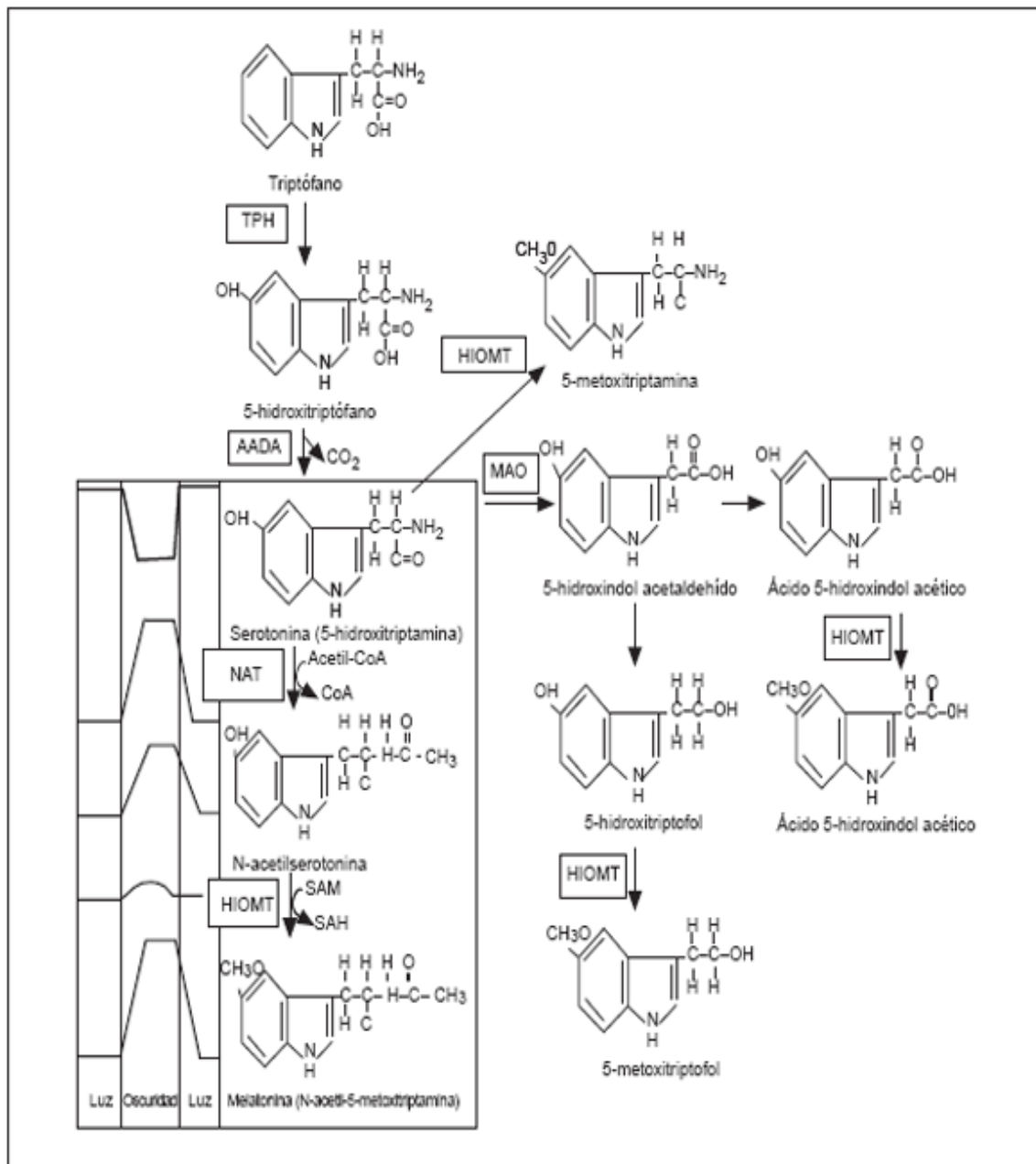
### **Bioquímica de la glándula pineal**

La glándula pineal de los mamíferos es un órgano que desarrolla una elevada actividad bioquímica, como lo demuestra la presencia de abundantes aminas biógenas (melatonina, 5-HT, NA, histamina) y de múltiples sustancias peptidérgicas (AVP; treonilserinilisina TSL; Oxitocina OT; Péptido intestinal vasoactivo VIP; entre otras). Se puede hablar de la pineal como de un órgano neuroendocrino capaz de sintetizar y liberar sustancias activas, que ejercerían su acción hormonal sobre una serie de órganos y tejidos diana, entre los que se encontrarían el hipotálamo, hipófisis, gónadas, tiroides, que a su vez regularían la función pineal mediante un mecanismo de feedback (Kappers, 1978; Cardinali, 1981; Zarazaga y col., 2000). La melatonina aislada por Lerner y col., (1958), una indolamina amarilla, poco soluble en agua y soluble en etanol, es sin lugar a dudas el indol más importante de la glándula pineal y el de mayor estudio (Lerner y Case, 1959; Arendt, 1988, 1995; Ganguly y col., 2002; Stehle y col., 2002; Guerrero, y col., 2007).

La ruta de síntesis de toda la serie de hidroxí y metoxiindoles en la glándula pineal, tales como la 5-HT y la propia melatonina, ha sido extensamente estudiada y descrita por varios autores (Quay, 1974; Klein 1979; Ebadi, 1984; Hernández Díaz y col., 2002; Singh y Jadhav, 2014). El primer paso en la biosíntesis de melatonina es la captación de su precursor, el triptófano, desde el torrente circulatorio. Este proceso se lleva a cabo en contra de un gradiente de concentración (Sugden, 1979). El triptófano es hidroxilado en la posición 5 del anillo indólico, reacción catalizada por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH; Lovenberg y col., 1967). El 5-hidroxitriptófano formado es rápidamente transformado a 5-HT mediante una descarboxilación llevada a cabo por la enzima L-aminoácido-aromático descarboxilasa. La 5-HT sufre una reacción de N-acetilación en su extremo amino catalizada por la enzima serotonina-N-acetil transferasa (SNAT), originando la 5-hidroxi-N-acetil serotonina (NAS), siendo éste el paso limitante en la biosíntesis de melatonina (Klein y Berg, 1970). La SNAT presenta diferencias cinéticas y estructurales con la arilamina-N-acetil transferasa (AANAT) existente en tejidos, como el hígado, sangre o la propia pineal (Voisin y col., 1960). Finalmente, la NAS es transformada en melatonina mediante una reacción de metilación del grupo hidroxilo situado en la posición 5 del anillo indólico, paso catalizado por la enzima hidroxindol-O-metil-transferasa (HIOMT; Simmoneaux y Ribelayga, 2003; Lewczuk y col., 2014). Sin embargo, la síntesis de melatonina implica otras transformaciones químicas de menor magnitud que se llevan a cabo en forma paralela y no enmascaran la reacción principal



que lleva a la síntesis de melatonina. De todos estos productos formados en esta compleja cascada enzimática, es el ácido 5-hidroxitriptol acético el que se elimina a través de la orina, utilizándolo en clínica para investigar el comportamiento metabólico de indoles y por la tanto la producción de melatonina (Esq. 6).



Esquema 6: Metabolismo indólico en la glándula pineal. El cuadro de la izquierda representa los principales pasos enzimáticos en la síntesis de melatonina, y evidencia esquemáticamente las variaciones diarias en la concentración de cada compuesto y la actividad de las enzimas implicadas. AADA: aminoácido aromático descarboxilasa; CoA: coenzima A; HIOMT: hidroxindol-O-metil-transferasa; MAO: monoaminooxidasa; NAT: N-acetiltransferasa; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; TPH: triptófano hidroxilasa. Extraído de "La glándula pineal como transductor neuroendocrino" F. J. Hernández Díaz, J. J. Sánchez, P. Abreu González, R. Alonso Solís. *Endocrinología y Nutrición*. 2001.

En mamíferos, se han descrito 3 subtipos de receptores para melatonina: MT1, MT2 y MT3 (Dubocovich y col., 2003; 2010). Los receptores MT1 y MT2, también denominados Mel1a y Mel1b, son receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Se ha clonado un tercer subtipo, Mel1c, que no se encuentra en mamíferos (Vanecek, 1998; Dubocovich y col., 2003). Los efectos de la unión de melatonina a su receptor son múltiples, siendo el principal efecto, la inhibición de la acumulación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y de guanosín monofosfato cíclico (GMPc; Cardinali y Pevet, 1998). MT1 y MT2 inhiben la formación de AMPc, mientras que MT2 también inhibe la formación de GMPc. (Singh y Jadhav, 2014). Esta unión también ejerce una disminución del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma, inhibición de la conversión de ácido araquidónico y de la síntesis de prostaglandinas, además de una acción directa sobre calmodulina y otras proteínas celulares (von Gall y col., 2002). No se descarta la implicancia de receptores de melatonina intracelulares, teniendo en cuenta la naturaleza lipofílica de esta hormona, aunque este mecanismo no ha sido debidamente comprobado. Respecto al receptor MT3 (quinona reductasa II) se sabe que es un blanco molecular para medicamentos antipalúdicos, como la cloroquina. No está claro que cumpla todos los criterios de receptor acoplado a proteína G. Su activación estimula la hidrólisis de fosfoinositol (Dubocovich y col., 2003; 2010). Indirectamente, la melatonina podría funcionar a través de receptores huérfanos, como el caso del receptor huérfano del retinoide (ROR)  $\alpha$  y la familia del receptor de retinoide Z (Nosjean y col., 2001). En glándula pineal de hámster, se ha evidenciado la coexpresión de los receptores de membrana tipo MT1, con los receptores nucleares ROR  $\alpha$ 1 (Tomás-Zapico y Coto-Montes 2005).

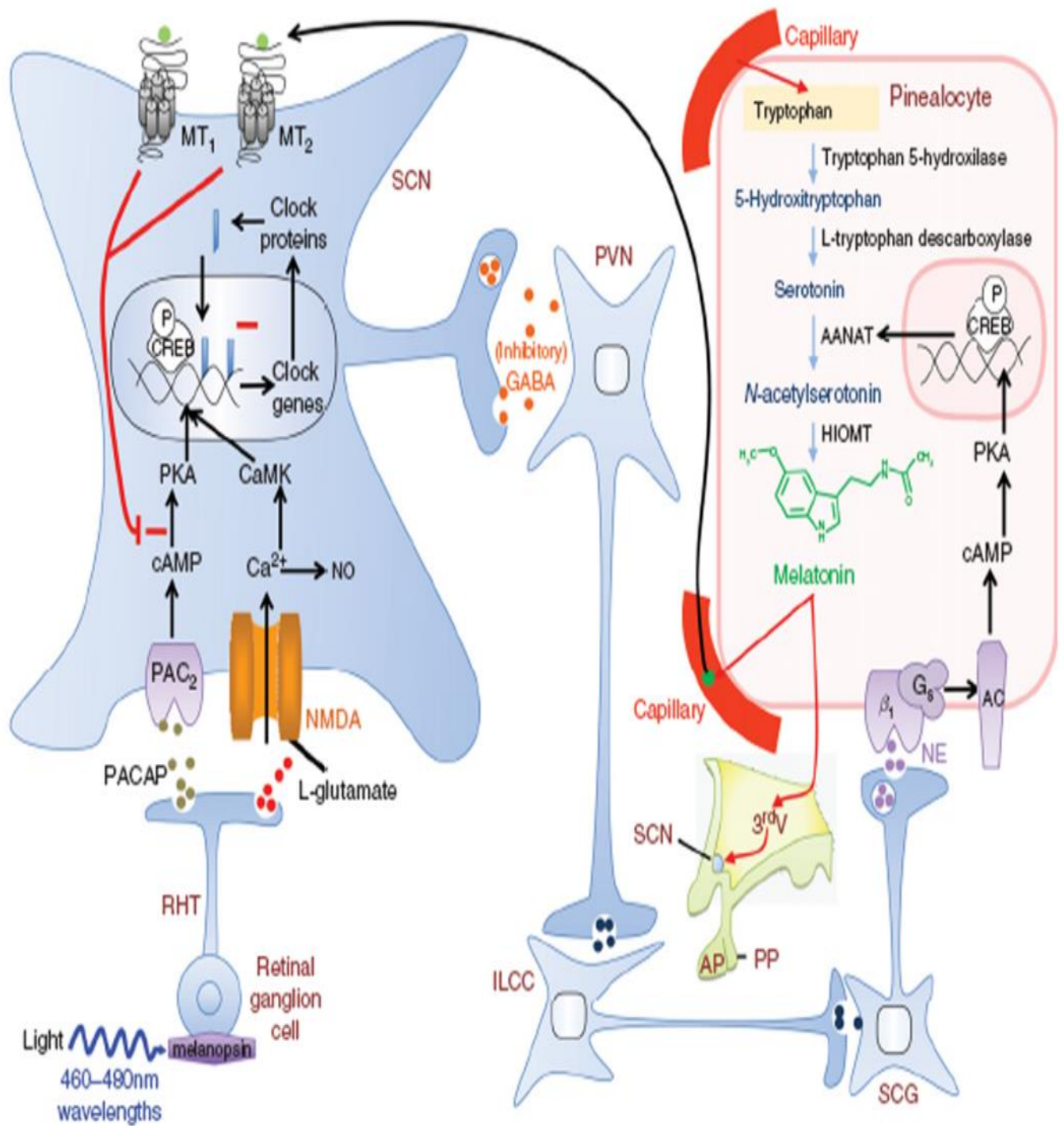
Teniendo en cuenta que la biosíntesis de melatonina pineal está regulada por el fotoperíodo, no es de extrañar que, tanto las actividades enzimáticas como los productos de las reacciones que catalizan, sufran variaciones circadianas (Reuss y col., 1996; Simmoneaux y Ribelayga, 2003). En todas las especies estudiadas, la producción y secreción de melatonina es mínima durante el día y se incrementa de forma brusca durante las horas de oscuridad (Forcada y col., 2000). Precisamente es este comportamiento rítmico y predecible de la luz ambiente la principal señal que sincroniza muchos ritmos biológicos internos, por ejemplo, la actividad reproductiva, adaptativa, la tasa metabólica, entre otros, en aquellos mamíferos fotoperíodo-dependientes (Fuentes y col., 1991; El Qandil y col., 2005; Guerrero y col. 2007).

La sincronización entre la biosíntesis de la hormona y el ciclo luz-oscuridad (L-O) ambiental se realiza fundamentalmente a través de la innervación periférica simpática. Así, se ha descrito un incremento nocturno en la concentración de NA liberada desde los terminales simpáticos durante la fase oscura del ciclo (Wurtman y Axelrold, 1974). También se reportó una pérdida del ritmo circadiano en la actividad de SNAT y disminución de los valores de melatonina pineal después de la ablación de la ruta neural iniciada en la retina (Reiter y col., 1979), o la evocación del mismo mediante la estimulación eléctrica de las neuronas del GCS (Chang y col., 1989).

Durante la noche, el NSQ envía una señal nerviosa a la glándula pineal a través de la vía que, tras hacer sinapsis en el GCS, alcanza la glándula mediante las neuronas posganglionares simpáticas, que descargan NA de forma masiva en las cercanías de las células pineales. El incremento en los valores nocturnos de NA en la glándula pineal conduce a un aumento en la expresión y actividad de la SNAT, y a un aumento en la síntesis y liberación de melatonina hacia la mitad de la fase oscura (Klein y col., 1992; Borigin y col., 1995). Consecuencia de ello es que la 5-HT, sustrato de la SNAT, presenta un marcado ritmo circadiano, con valores máximos durante la fase de luz, que descienden bruscamente durante la noche (King y col., 1984). Quizá como forma de paliar este déficit, la TPH, enzima limitante en la biosíntesis de la 5-HT, también incrementa su actividad durante la fase oscura (Hernández y col., 1994), reduciendo de igual forma las concentraciones nocturnas de triptófano (Sudgen, 1979). El ciclo L-O también afecta a la expresión de los receptores de NA presentes en el pinealocito (Pangerl y col., 1990). En este sentido, se ha descrito un ritmo circadiano en valores de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de los receptores b1 (Møller y col., 1997) y  $\alpha$ 1-adrenérgicos (Coon y col., 1997), con máximos hacia la mitad de la fase oscura, coincidiendo con los valores más elevados de unión para el receptor b1 (González-Brito y col., 1988). Durante el día las señales nerviosas procedentes de la retina alcanzan el NSQ a través del tracto



retinohipotalámico y deprimen su actividad disminuyendo así la producción y liberación de melatonina hasta concentraciones basales (Esq. 7).



*Esquema 7: Los axones de las células ganglionares se proyectan al núcleo supraquiasmático (SCN) a través del tracto retinohipotalámico (RHT) en el nervio óptico. Estas neuronas liberan glutamato y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PCACP) lo que causa el aumento de la expresión de genes relojeros. Para modular la producción de melatonina pineal, los axones de las neuronas SCN se proyectan al PVN del hipotálamo donde liberan ácido g-aminobutírico (GABA). Los cuerpos de células nerviosas en el PVN tienen axones que descienden a través del tronco encefálico y, finalmente, sinapsis de neuronas en la columna celular intermediolateral (ILCC), que son neuronas simpáticas preganglionares. Los axones de estas neuronas finalmente terminan en pinealocitos después de una sinapsis adicional en el ganglio cervical superior (SCG). La liberación de norepinefrina, que ocurre durante la noche, estimula la síntesis y liberación de melatonina. Esta se descarga en el sistema vascular sanguíneo y posiblemente también en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del tercer ventrículo. Tanto la sangre como la melatonina del LCR tienen acceso rápido a las neuronas SCN donde actúa sobre los receptores MT1 y MT2. Esto significa que la melatonina influye en la velocidad de disparo de las neuronas SCN restableciendo el marcapasos circadiano y regulando procesos circadianos como el sueño. AANAT = N-acetiltransferasa de arilalquilamina; AC = adenilato ciclasa; AP = glándula pituitaria anterior; b1 = receptor beta-adrenérgico; CaMK = calmodulina quinasa; cAMP = monofosfato de adenosina cíclico; CREB = proteína de unión al elemento de respuesta cAMP; GS = proteína estimulante G; HIOMT = hidroxindol-O-metiltransferasa (también conocida como acetil-serotonina-O-metiltransferasa); NO = óxido nítrico; PKA = proteína quinasa A; PP = hipófisis posterior. Extraído y Modificado de "Melatonin: A multitasking molecule". R. J. Reiter, Dun-Xian Tan, L Fuentes-Broto. Progress in Brain Research. 2010.*

Respecto a los péptidos y proteínas pineales, Pevet (1986) lo clasificó en tres clases:

Péptidos y proteínas de clase I: AVP, OT, VIP, sustancia P, somatostatina, vasotocina, neurofisinas, 3-endorfinas, encefalinas. Estas sustancias corresponderían a las fibras nerviosas peptidérgicas originadas en otras estructuras cerebrales (Korf y Møller, 1985). Serían neurotransmisores o neuromoduladores de efectos no fisiológicamente relevantes (Pevet, 1986).

Péptidos y proteínas clase II: hormona liberadora de melanocitos alfa, hormona hipotalámica inhibidora de la MSH, TRH, GnRH, hormona adrenocorticotrofina, hormona folículo-estimulante, hormona luteinizante, prolactina (Ebeis y Noteborg, 1985). Esta serie de péptidos corresponderían a hormonas circulantes originadas en otros órganos endocrinos y acumuladas en la pineal y su función se asociaría al ejercicio del control (feedback) existente entre la epífisis y esos otros órganos de los que son originarias (Cardinali, 1981).

Péptidos y proteínas clase III: aquí se situarían las sustancias específicamente sintetizadas por las células pineales y cuya función, según Pevet (1986), además de ser factores activos pineales, podría ser la de proteínas transportadoras de los indoles

epifisarios de secreción. Destacan AVT, de propiedades oxitócicas y vasoactivas (Bowie y Herbert, 1976) y TSL, de débil acción antigonadotrópica (Vaughan y col., 1981).

## **PARTE B: CELULAS INTERSTICIALES Y CELULAS PIGMENTADAS**

### **Generalidades de las células intersticiales**

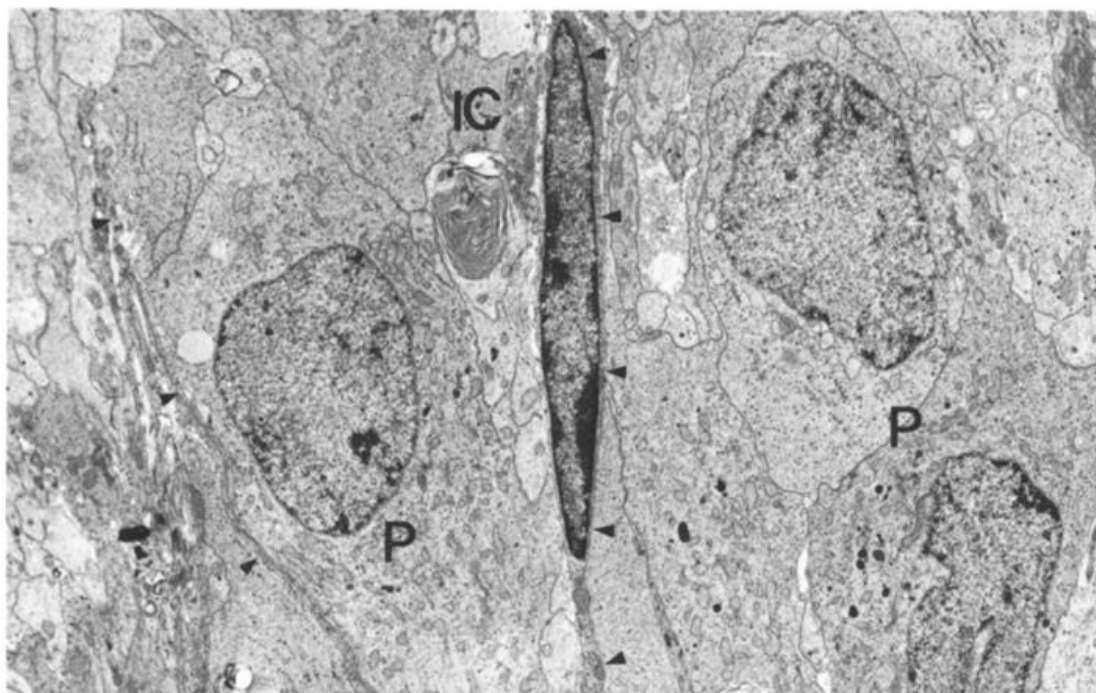
Como hemos indicado previamente, estas células han recibido numerosas denominaciones a lo largo de los años, siendo la más aceptada en la actualidad la de CI, debido precisamente a su disposición entre los pinealocitos y sus prolongaciones. Calvo y col., (1988a) proponen definitivamente, en rata, el término “célula glial” para designar este segundo tipo de células parenquimatosas, dejando el término “astrocito” para las especies en que estas células son morfológicamente similares a los astrocitos del SNC (Vollrath, 1981; Karasek, 1983).

La morfología de estas células fue estudiada en 1922 por Rio-Hortega a través de impregnación argéntica. En la actualidad, se las estudia mediante el uso de la microscopia electrónica, técnicas inmunohistoquímicas y de biología molecular. Las CI, son más pequeñas que los pinealocitos, sus núcleos se tiñen más intensamente y son ovalados, ligeramente alargados o triangulares, con cromatina condensada. A nivel ultraestructural, destaca en el citoplasma la presencia de numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico granular bien desarrollado, depósitos de glucógeno, abundantes filamentos intermedios y prolongaciones citoplasmáticas largas y ramificadas que se conectan a otras prolongaciones de CI, pinealocitos o terminan frecuentemente en las proximidades de los vasos sanguíneos (Junqueira y Carneiro, 2003).

Es característico de estas células gliales, la presencia de vacuolas citoplasmáticas (Calvo y Boya 1984b; Roa y del Sol, 2014). En algunas especies, es posible encontrar en su interior abundantes gránulos de pigmento y de glucógeno, como en el caso del conejo (Romijn, 1973a; Romijn y col., 1977). García-Mauriño y col. (1992) han detectado mediante inmunohistoquímica la presencia de factor de crecimiento nervioso en células gliales de la pineal de rata, apuntando un papel trófico y trópico de este tipo celular con respecto a la inervación simpática procedente del GCS.

Tradicionalmente, y debido a su localización entre los pinealocitos, se les ha atribuido a estas células una misión de sostén similar a la de los astrocitos de SNC (López-Muñoz, 1992a, b). Estas células, tienden a situarse con cierta preferencia en las proximidades de los espacios perivasculares. Numerosos investigadores describieron la tendencia que tienen los procesos citoplasmáticos de las CI a ubicarse en las cercanías de

los espacios perivasculares, por lo que se considera la posibilidad que estas células participen activamente en el intercambio de sustancias entre la glándula pineal y la sangre (Fig. 2; Møller y col., 1978; Sozos Pasozomenos 1983 Huang y col., 1984; Schachner y col., 1984; Cozzi, 1986; Calvo y col., 1988a, b; Boya y Calvo, 1993, Franco y col., 1997, Safwat, 2012).



*Figura 2: Ultraestructura de la glándula pineal del hámster dorado. La micrografía muestra una célula intersticial (IC) y sus respectivos procesos citoplasmáticos (puntas de flecha) que separan grupos de pinealocitos (P). Magnificación 3700X. Extraído y modificado de "Interstitial and parenchymal cells in the pineal gland of the golden hamster. A combined thin-section, freeze-fracture and immunofluorescence study" Huang SK y col., (1984). Cell Tissue Res 235:327-337.*

### **Marcadores proteicos de las células intersticiales**

#### **\*Proteína S-100**

La proteína S-100, ha sido objeto de extensa investigación desde que el primer miembro de esta familia de proteínas fue identificado por Moore (1965). Este investigador aisló una fracción subcelular del cerebro bovino, la cual contenía proteínas específicas, y una propiedad característica: era soluble en soluciones saturadas (100%) de sulfato de amonio a pH neutro, por lo que fue llamada S-100. Estudios posteriores demostraron que dicha fracción contenía dos componentes proteicos diferentes, estrechamente relacionados, y no específicos del cerebro: la proteína S-100A1 y la proteína S-100B



(Isobe y Okuyama, 1978, 1981). Ambos polipéptidos contenían dos dominios de unión al calcio de alta afinidad de tipo mano EF, unidos por una región bisagra. Posteriormente, se descubrió la existencia de varias otras proteínas S-100, como así también sus proteínas dianas. Hasta el momento, se encuentran descriptas 25 proteínas que constituyen la familia de proteínas S-100.

Actualmente, se conoce que los genes que codifican la expresión de las proteínas S-100 en el hombre se encuentran repartidos en varios cromosomas. Trece proteínas S-100 (S-100A1 a S-100A13) son codificadas por un grupo de genes ubicados en el cromosoma 1 (Zimmer y col., 1995; Schäfer y Heizmann, 1996; Donato, 1999), mientras que la proteína S-100B es codificada en el cromosoma 21q22.3 (Allore y col., 1988; Griffin y col., 1989) con una subsecuente sobre-expresión en el síndrome de Down. En tanto que el gen que codifica para S-100G; también conocida como calbindina D<sub>9k</sub>, se encuentra en el cromosoma X y es hasta el momento la única proteína S-100 monomérica (Jeung y col., 1994). Curiosamente, las bases de datos genómicas disponibles para las plantas, la levadura, el nematodo *C. elegans* y en moscas de género *Drosophila*, demuestran que las proteínas S-100 canónicas no se expresan en estos organismos, sugiriendo que las mismas son filogenéticamente nuevas (Donato, 2001).

Todas las proteínas S-100 actúan en forma dimérica (Skelton y col., 1994), mientras que algunos miembros pueden tener formas activas tetraméricas, hexaméricas y oligoméricas (Ostendorp y col., 2007; Kiryushko y col., 2006; Leukert y col., 2006; Moroz y col., 2002, 2003; Xie y col., 2007). Estas proteínas ejercen diferentes roles regulatorios dentro de la célula y también actúan, luego de ser liberadas al espacio extracelular, sobre numerosas células blanco (Donato, 2001; 2003; Santamaría-Kisiel y col., 2006; Donato y col., 2009). Algunos miembros de la familia de proteínas S-100 además de unirse al calcio, pueden unirse al zinc con relativa alta afinidad (Zimmer y col., 1995; Schäfer y Heizmann, 1996; Donato, 1991; 1999), S-100B y S-100A5 pueden hacerlo con el cobre (Nishikawa y col., 1997; Schäfer y col., 2000).

Muchas de las funciones de estas proteínas, al ser ligadoras de calcio, dependen de su acción como segundo mensajero. En general, las funciones dependientes del calcio se pueden agrupar en:

- ❖ Regulación de la fosforilación mediada por proteínas quinasas.
- ❖ Modulación de la actividad enzimática.

- ❖ Promoción de la homeostasis del calcio.
- ❖ Mantenimiento de la forma y movilidad celular.
- ❖ Regulación del crecimiento y diferenciación celular.

A pesar de las múltiples funciones dependientes de calcio ejercidas por la proteína S-100, no todos sus efectos dependen de este catión. Así, se han descripto numerosas funciones independientes de calcio como, por ejemplo: la proteína S-100A1 puede unirse y estimular la actividad de adenilatociclasa (Fano y col., 1989), S-100A4 incrementa la apoptosis dependiente de p53 en tumores (Chen y col., 2001), entre otros.

El mayor número de interacciones que las proteínas S-100 tienen dentro de las células, son con los componentes del citoesqueleto, incluyendo dentro de ellos a las tubulinas, los filamentos intermedios de actina, miosina y tropomiosina. Por ejemplo, la proteína S-100B controla el ensamblaje-desensamblaje de los microtúbulos (Sorci y col., 1998) y de los filamentos intermedios (Rambotti y col., 1990; Sorci y col., 1998; Frizzo y col., 2004), entre los cuales se encuentran los filamentos de desmina y de GFAP.

A nivel extracelular, las acciones de las proteínas S-100 incluyen:

- ❖ Acción neurotrófica.
- ❖ Efectos tóxicos en trastornos neurodegenerativos.
- ❖ Acción sobre el comportamiento cognitivo.
- ❖ Regulación de procesos inflamatorios.
- ❖ Rol en la coagulación sanguínea.

En células gliales, han sido reportadas diferentes funciones extracelulares de algunos miembros de la familia de proteínas S-100, en especial S-100B. La proteína S-100B en concentraciones nanomolares posee efectos neurotróficos, estimulando la extensión/crecimiento del cilindroeje o axón (Kligman y Marshak, 1985; Winningham-Major y col., 1989), la supervivencia de neuronas durante el desarrollo (Bhattacharyya y col., 1992; Whitaker-Azmitia y Azmitia, 1994; Ueda y col., 1995) y luego de una injuria (Barger y col., 1995), previene la degeneración de las motoneuronas en ratas recién nacidas luego de la sección del nervio ciático (Iwasaki y col., 1997). En contraste, los niveles micromolares extracelulares de la proteína S-100B tienen efectos deletéreos,

principalmente al inducir apoptosis en varios tipos celulares cultivados *in vitro* (Hu y col., 1997; Fulle y col., 2000).

Elevados niveles de S-100B se han detectado en cerebros de pacientes con Síndrome de Down y con enfermedad de Alzheimer (Whitaker-Azmitia y col., 1997). S-100B ha sido implicada en la modulación del aprendizaje y la memoria. Se demostró que la inyección de un antisuero de proteína (anti-S-100) en el cerebro de la rata causa déficit de memoria para tareas que implican transferencia de destreza (Murakami y col., 1995), aprendizaje de laberinto (Tulchinsky y col., 1993) y reflejo alimentario condicionado (Uozumi y col., 2000), y la inyección en el hipocampo inhibió la potenciación a largo plazo (Lee y col., 1992). De acuerdo con estos estudios, la S-100B extracelular jugaría un rol en los procesos de memoria, pero el mecanismo por el cual actuaría no está dilucidado.

Se ha propuesto que varios miembros de S-100 desempeñan un papel en la inflamación, actuando tanto dentro como fuera de las células. La expresión de S100A8 y S100A9 está restringida a neutrófilos y macrófagos activados, células endoteliales en la epidermis en el curso de la psoriasis y trastornos malignos, y en células microgliales residentes activadas en procesos inflamatorios cerebrales y en la enfermedad de Alzheimer, como así también en lesiones cerebrales isquémicas (Kerkhoff y col., 1998).

La proteína S-100A10, podría desempeñar un papel regulatorio en la vía extrínseca de la coagulación sanguínea uniéndose al plasminógeno y estimulando el activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA) ya sea solo o formando complejo con anexina II (Kassam y col., 1998).

#### **\* Proteína Glio-Fibrilar Acídica (GFAP)**

Inicialmente GFAP fue aislada como una proteína altamente concentrada en placas desmielinizadas de cerebros con esclerosis múltiple y luego se encontró que estaba asociada inmunohistoquímicamente con astrocitos reactivos en dichas placas y en otros contextos patológicos (Eng y col., 1970; Eng y col., 2000). GFAP pertenece a la familia de filamentos intermedios de clase III, que incluyen a la vimentina, entre otros, y es considerada el principal filamento intermedio hallado en los astrocitos maduros del SNC (Eng y col., 1970, 1971, 2000; Uyeda y col., 1972; Bignami y col., 1972; Pekny y Pekna, 2004; Oshima, 2007). En el hombre está constituida por 432 residuos aminoacídicos y se encuentra codificada por un gen ubicado en el cromosoma 17q21.1-q25, el cual da lugar



a la formación de tres isoformas del ARNm de GFAP:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La forma  $\alpha$  es la que predomina en el SNC, la  $\beta$  en el SNP (Eng y col., 2000; Reeves y col., 1989). El ARNm de GFAP  $\gamma$  se ha encontrado tanto en tejidos del SNC como en otros, incluyendo la médula ósea y el bazo de ratón (Brenner, 1994). Condorelli y col. (1999) han informado sobre la posible existencia en cerebro de rata de un nuevo ARNm para la isoforma GFAP  $\delta$  que difiere en el dominio carboxi-terminal.

Uyeda y col. (1972) prepararon inicialmente el anticuerpo de conejo anti-GFAP humana. Desde entonces, este anticuerpo se ha convertido en un marcador para la identificación inmunohistoquímica de los astrocitos, para estudiar sus diferentes aspectos, como así también diferentes poblaciones celulares relacionadas con ellos (Hajós y Bascó, 1984; Hajós y Halasy, 1998).

A nivel astrocitario, las funciones de GFAP no han sido completamente dilucidadas. Es conocido el papel de esta proteína en la modulación de la movilidad y forma astrocitaria al proveer estabilidad estructural a los procesos celulares (Eng y col., 2000). Algunos estudios sugieren que GFAP está involucrada en el mantenimiento a largo plazo de la arquitectura cerebral (Liedtke y col., 1996), en el adecuado funcionamiento de la barrera hemato-encefálica (Liedtke y col., 1996; Pekny y col., 1998), como así también en la modulación de algunas funciones neuronales (McCall y col., 1996; Shibuki y col., 1996). Por otro lado, se ha propuesto que GFAP y vimentina, son requeridos para la adecuada formación de las cicatrices gliales luego de una injuria en el SNC (Pekny y col., 1999; Sofroniew, 2009). GFAP se encuentra relacionada con el síndrome de Alexander, una enfermedad neurodegenerativa en la cual se describió una mutación de esta proteína (Quinlan y col., 2007; Eriksson y col., 2009).

#### **\* Vimentina**

Esta proteína, junto a GFAP, desmina y periferina, forma parte de los filamentos intermedios de clase III (Oshima, 2007). Es el principal filamento intermedio que se encuentra en células gliales inmaduras (Dahl y col., 1981), como así también en células de origen mesenquimatoso (Lehtonen y col., 1985), aunque también es utilizada como proteína marcadora de otras células y tejidos en desarrollo (Ivaska y col., 2007). Vimentina se expresa durante el desarrollo del sistema nervioso de ratón en numerosas células astrogiales siendo luego gradualmente reemplazada por GFAP en la mayoría de

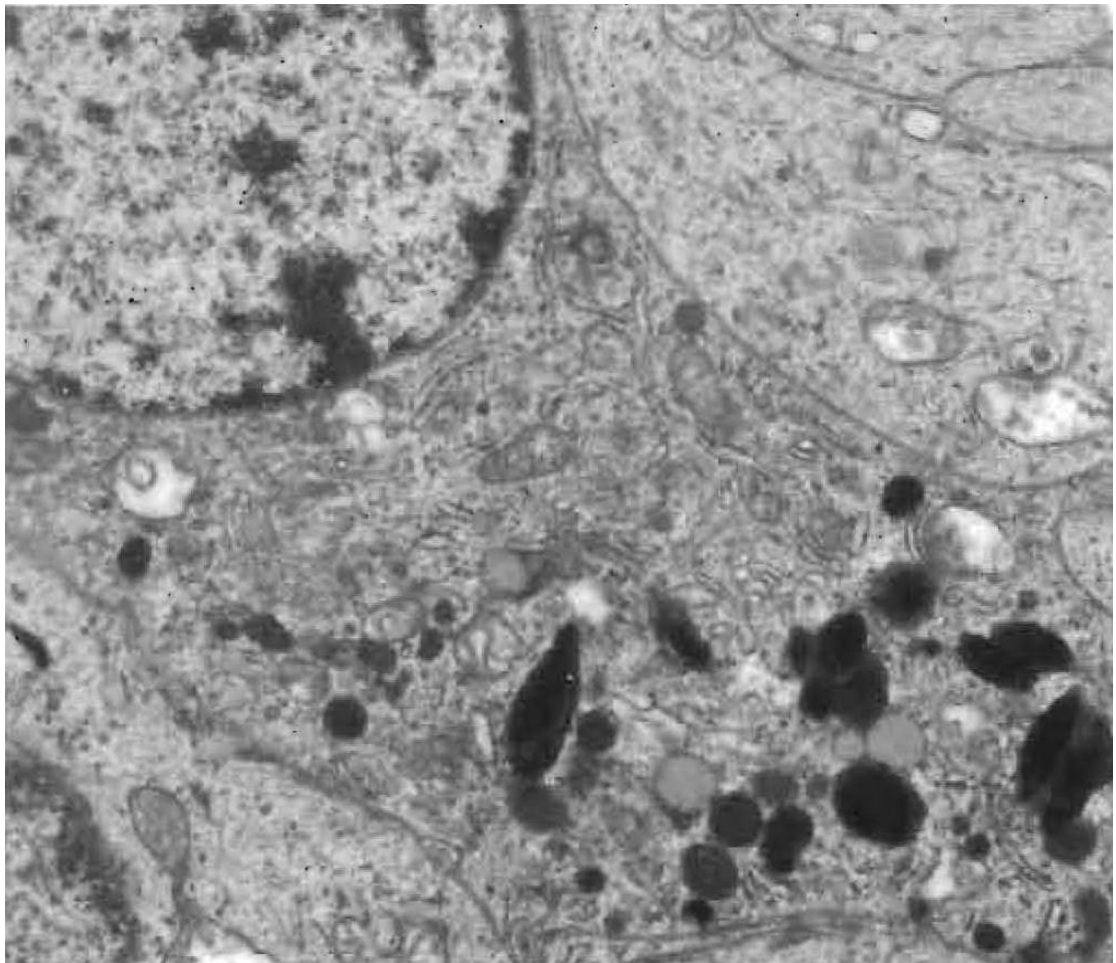
estas células (Duprey y Paulin, 1995). Sin embargo, puede existir un subgrupo de células astrogliales que expresa ambos filamentos intermedios.

Vimentina participa en una serie de funciones críticas para el organismo, siendo su principal función el mantenimiento de la integridad celular y tisular (Fuchs y Weber, 1994; Nieminen y col., 2006). Además de actuar como soporte estructural, vimentina participa en los procesos de adhesión y migración de diferentes tipos celulares, mediante su interacción con integrinas, moléculas de adhesión, y con proteínas citoesqueléticas de entrecruzamiento (Homan y col., 1998; Correia y col., 1999; Gonzalez y col., 2001; Tsuruta y Jones, 2003; Kreis y col., 2005; Ivaska y col., 2005; Nieminen y col., 2006). También es capaz de interaccionar con varias proteínas que participan en la señalización celular (Sin y col., 1998; Janosch y col., 2000; Tzivion y col., 2000; López-Egido y col., 2002; Runembert y col., 2002; Ivaska y col., 2005; Perlson y col., 2005; Yang y col., 2005) y modular el posicionamiento de organelas como las mitocondrias (Tang y col., 2008). Por otra parte, vimentina participa en la apoptosis a través del secuestro de diferentes factores reguladores (Yang y col., 2005; Schietke y col., 2006), como en la inmunodefensa, activando células del sistema inmune innato (Ivaska y col., 2007) y regulando la localización celular de componentes virales (Stefanovic y col., 2005; Bhattacharya y col., 2007). Se ha informado sobre el rol de la vimentina en la reparación y recombinación del ácido desoxirribonucleico (Wang y col., 2000; Tolstonog y col., 2000, 2001a, b; López-Egido y col., 2002).

### **Generalidades de las células pigmentadas**

La presencia de pigmentos pineales ha sido reportada en diferentes especies de mamíferos. Las CP suelen encontrarse a lo largo de todo el parénquima pineal, pero generalmente suelen presentarse en las cercanías de los vasos sanguíneos y algunas veces en las inmediaciones de la cápsula (Calvo y col., 1988; 1992; Bhatnagar y Hilton, 1994; Regodón y col., 1998; Redondo y col., 2003). Estas células presentan gránulos de pigmento que exhiben un color marrón claro u oscuro. Dichos gránulos pueden blanquearse con peróxido de hidrógeno o ácido per-acético y presentar una intensa reacción argentafín, la cual puede ponerse de manifiesto mediante el método de plata de Masson Fontana (Calvo y col., 1988; 1992). La reacción de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) oxidasa también es positiva (Calvo y col., 1992). A nivel ultraestructural, estas células presentan un núcleo redondeado u oval con pequeños y abundantes cúmulos de

heterocromatina, con uno o dos nucléolos. El citoplasma es rico en organelas, se observan abundantes y pequeñas mitocondrias, el retículo endoplásmico granular está bien desarrollado y el complejo de Golgi presenta numerosas vesículas (Fig.3; Calvo y col., 1988, 1992; Bathnagar y Hilton 1994). A medida que la edad avanza, estos acúmulos de pigmentos extracelulares se incrementan gradualmente, volviéndose más concentrados y presentan una tonalidad más clara (Koshy y Vettivel, 2001b). Además de las CP, los gránulos de pigmentos pueden encontrarse tanto en pinealocitos (Calvo y col., 1992; Gil y col., 2005) como en CI (Regodón y col., 1998; Redondo y col., 2003).



*Figura 3: Ultraestructura de una célula pigmentada en glándula pineal de gato macho. La micrografía muestra una célula pigmentada con abundantes pre-melanosomas y melanosomas distribuidos en su citoplasma. Magnificación 22000X. Extraído y modificado de "Presence of Melanin in the Cat Pineal Gland" Calvo JL y col., (1992). Acta Anat; 145:73-78.*

## PARTE C: RITMOS BIOLÓGICOS, FOTOPERÍODO Y MELATONINA

### Ritmos biológicos: definición y clasificación

Los ambientes terrestres presentan características cíclicas, es decir que debe existir una armonización temporal entre los ciclos ambientales y la ritmicidad biológica (Marques y col., 1997). La rotación y traslación de la tierra dotan al medio que nos rodea de una ritmicidad en las condiciones de luz y temperatura. Así, cuando el ambiente se modifica, las especies deben adaptarse a él. Estos cambios conllevan una serie de comportamientos como las migraciones, la reproducción estacional o el ajuste del período de actividad al período óptimo del día. Esta dependencia temporal de la conducta tiene detrás una compleja regulación fisiológica que lleva a una mejor adaptación de los organismos al medio en el que viven.

Los “ritmos biológicos” se definen como la recurrencia de fenómenos dentro de un sistema biológico a intervalos regulares (Mora y Sanguinetti, 2004). Estos ritmos suponen una adaptación frente al medio y una vez establecidos, son generados por el propio organismo independientemente de las variables externas (García Fernández, 1998).

En condiciones constantes de luz y temperatura los ritmos manifiestan su frecuencia intrínseca (frecuencia en curso libre o *free running*). Según su frecuencia en curso libre los ritmos biológicos se clasifican en (García Fernández, 1998):

- ❖ Ritmos de frecuencia alta (período en curso libre < 30 min.). Como por ejemplo el latido cardíaco y la frecuencia respiratoria.
- ❖ Ritmos de frecuencia media (período en curso libre entre 30 min y 6 días):
  - **Ritmos ultradianos** (entre 30 min y 20 h). Como las fases del sueño de ondas lentas y sueño paradójico.
  - **Ritmos circamareales** (aproximadamente 12 h). Las especies costeras presentan ritmicidad circamareal que afecta diferentes conductas.
  - **Ritmos circadianos** (20 - 28 h). El ciclo sueño-vigilia, la liberación de melatonina y la temperatura presentan patrones rítmicos circadianos.
  - **Ritmos infradianos** (28 h - 6 días). Por ejemplo, el nivel de las hormonas de la glándula adrenal tiene ritmo infradiano.

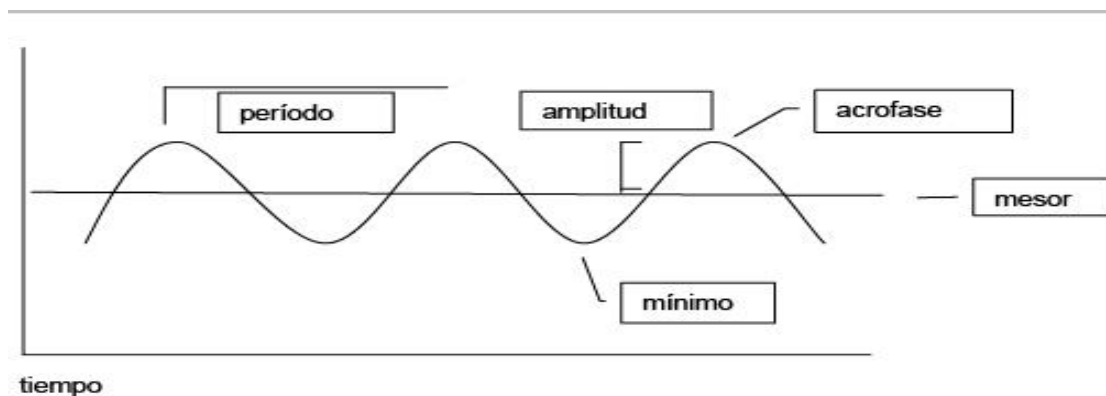
- ❖ Ritmos de frecuencia baja (período en curso libre  $> 6$  días)
  - **Ritmos circalunares** (aproximadamente 29 días). El ciclo sexual femenino y la reproducción en animales de zona intermareal se dan con ritmos circalunares.
  - **Ritmos circanuales** (aproximadamente 365 días). Las especies de reproducción estacional, la migración, la hibernación y la estivación presentan un patrón rítmico de estas características.

De acuerdo a la dependencia de factores externos, los ritmos pueden clasificarse en:

- **Ritmos exógenos:** son aquellos que requieren de un mecanismo cíclico ambiental para poder expresarse;
- **Ritmos endógenos:** son aquellos que se expresan aun en ausencia de la ciclicidad ambiental.

Los componentes de un ritmo biológico se pueden analizar mediante una función sinusoidal (Esq. 8). Los parámetros que definen un ritmo son los siguientes (García Fernández, 1998):

- El *Período*, es el intervalo de tiempo entre dos puntos iguales de ritmo.
- El *valor medio o mesor*, es la media aritmética de todos los valores obtenidos dentro de un ciclo. Es el valor alrededor del que oscila la variable.
- La *amplitud*, es la diferencia entre el valor máximo (o mínimo) y el valor medio de una oscilación.
- La *fase*, es el valor de una variable en un momento dado. La *acrofase* es el momento en el que la variable alcanza el valor máximo a lo largo del período. Mientras que la *batifase* es cuando la variable alcanza su valor mínimo. Para caracterizar la fase normalmente se determina el *mapa de fases*. Es una representación de las acrofases de los distintos ritmos e indica la relación temporal entre los distintos procesos fisiológicos, apareciendo con una secuencia característica dentro de un ciclo.



Esquema 8. Algunos componentes de un ritmo biológico: periodo, amplitud, acrofase y mesor, expresados en una función sinusoidal. Extraído de “La cronofarmacología: un nuevo aspecto a considerar en la variabilidad de la respuesta terapéutica”. G Tamosurias y M Toledo. Archivos de Medicina Interna. 2010.

### **La luz: el principal sincronizador externo del ritmo circadiano**

Los ritmos circadianos se caracterizan por generarse de forma endógena y por su capacidad de ajustarse a las condiciones ambientales externas caracterizadas principalmente por el fotoperíodo. El fotoperíodo es el agente sincronizador más potente de los ritmos circadianos (Benstaali y col., 2001). En el sistema circadiano, la actividad se basa en el funcionamiento de relojes biológicos que miden el tiempo y “son puestos en hora” por un sincronizador externo o *zeitgeber*. En condiciones de oscuridad constantes el periodo de los ritmos se desvía de las 24 horas. En animales nocturnos el período de los ritmos circadianos es mayor en condiciones de luz continua que en condiciones de oscuridad continua, mientras que, en animales diurnos, entre ellos el hombre, el período permanece igual o se acorta en condiciones de luz continua, comparado con el período en condiciones de oscuridad continua (Benstaali y col., 2001; Meijer, 2001).

En mamíferos, el principal reloj biológico se localiza en el hipotálamo ventral, más precisamente en NSQ. La información de la luz se transduce a información nerviosa que se transmite desde las células ganglionares retinianas al NSQ. En mamíferos los receptores que captan la información de intensidad luminosa se encuentran en la retina. Pero estos fotorreceptores especializados no son conos ni bastones, sino neuronas de la capa ganglionar que contienen un fotopigmento basado en la opsina y la vitamina A, que se denomina melanopsina. Este fotopigmento tiene un pico de sensibilidad cerca de los 480 nm (Cermakian y Sassone-Corsi, 2002; Erren y col., 2003; Foster, 2004). Estas

neuronas proyectan al NSQ a través del tracto RHT. Si se lesiona este tracto no desaparecen los ritmos en curso libre pero sí la sincronización con el fotoperiodo externo, lo que muestra que la información del fotoperiodo llega al reloj endógeno a través de esta vía nerviosa (Morin, 1994). Los neurotransmisores del tracto RHT son los aminoácidos excitadores, aspartato y glutamato, que estimularían las neuronas del NSQ en presencia de luz (Rusak y Bina, 1990; Morin, 1994). Se ha observado que la concentración extracelular de glutamato en los alrededores del NSQ presenta una variación circadiana (Honma y col., 1996). La administración de agonistas glutamatérgicos mimetiza la curva de fase respuesta producida por los pulsos de luz y, la de antagonistas del ácido N-metil-D-aspartico anula el efecto del glutamato sobre el NSQ (Ding y col., 1994).

### **Melatonina**

La glándula pineal juega un papel importante como fototransductor neuroendocrino circadiano. Los cambios regulados fotoperiodicamente en el perfil de secreción de melatonina son utilizados por los animales para coordinar un amplio rango de eventos fisiológicos que varían con la estación, entre los que se destacan la función reproductiva, el sueño, la hibernación, el humor o el estado de ánimo y el sistema inmune (Arendt, 1986; Urbanski, 1999). El fotoperíodo es un potente estímulo ambiental que afecta la reproducción en numerosas especies de roedores (Bronson, 1989).

La glándula pineal modula numerosos ritmos biológicos al ciclo L-O del ambiente al generar un ritmo diario y anual de secreción de melatonina. Normalmente la hormona es secretada durante la fase de oscuridad del día y su producción está relacionada con la longitud de la noche (Arendt, 1986). La oscilación diaria en la producción de melatonina es generada por la acetilación de serotonina mediada por una enzima específica AANAT. El paso final de la síntesis de melatonina es catalizado por la enzima HIOMT.

El ritmo circadiano de melatonina está influido por la edad, ya que las diferencias día-noche en la concentración de melatonina son de 3 a 5 veces más marcadas en los niños y son menores en ancianos. La estación del año también afecta al ritmo circadiano de melatonina, en verano el comienzo de la secreción de melatonina se adelanta una hora y en invierno se retrasa. Otros factores que afectan al ritmo circadiano de melatonina son el ciclo menstrual, el tiempo diario de exposición al sol, el consumo de algunos fármacos como  $\beta$ -bloqueantes o benzodiazepinas, estrés o el ejercicio (Ariznavarreta y col., 2002).



Finalmente, como en todo sistema de regulación, es importante tener en cuenta los mecanismos de retroalimentación. Los pinealocitos poseen sitios de unión a esteroides gonadales (Cardinali y col., 1983). Las marcadas variaciones en los niveles de esteroides gonadales alteran el funcionamiento de esta glándula, aunque de modo diferente en machos y hembras; en general la testosterona tiene un efecto estimulante sobre el metabolismo pineal.

La melatonina ejerce distintas acciones en el organismo:

- Regula los ritmos circadianos endógenos: La administración exógena de melatonina sincroniza los ritmos circadianos que se encuentran en curso libre. Entre ellos el ritmo circadiano de la actividad de las neuronas del NSQ, ésta sincronización se produce a través de los receptores de alta afinidad para la melatonina existentes en este núcleo. En humanos, la administración de melatonina sincroniza los ritmos de temperatura, sueño/vigilia y el de la melatonina endógena. La curva de respuesta de fase es una imagen especular de la que producen los pulsos de luz. (Cassone y col., 1986; Reiter, 1993; Vanecek, 1998).
- Regula los ritmos circanales: Bajo fotoperíodos naturales, la duración del pico nocturno de melatonina es directamente proporcional a la duración del periodo de luz. El fotoperíodo cambia con las estaciones del año, siendo las noches más cortas en verano y más largas en invierno, y, en consecuencia, los picos de melatonina duran menos en verano que en invierno. En animales de reproducción estacional, la melatonina regula el tamaño de los órganos sexuales, la secreción de hormonas asociadas con la fisiología reproductiva y el ciclo estral (Reiter y col., 1993; Moore, 1999).
- Regula la sensibilidad a la luz en la retina: La melatonina participa en la regulación de las variaciones diarias de fotorreceptores y de la función de epitelio pigmentado, regula la cantidad de luz que llega al receptor controlando el movimiento de los melanosomas en el epitelio pigmentado (Vanecek, 1998).
- Está implicada en la regulación de la función vascular y de la secreción hormonal (Vanecek, 1998).

- Tiene una importante función como agente antioxidante y protector frente a los radicales libres (Poeggeler y col., 1993).

## PARTE D: ANTECEDENTES EN NUESTRO LABORATORIO

Desde hace cuatro décadas, nuestro grupo de trabajo estudia al *Lagostomus maximus maximus* (vizcacha). Los numerosos antecedentes sobre reproducción y adaptación en animales de vida silvestre y la importancia que tienen las señales ambientales en la sincronización de dichos procesos, nos llevaron al estudio del efecto de la iluminación natural (fotoperíodo) en este roedor de particulares hábitos nocturnos. Las fluctuaciones en los parámetros ambientales tales como: longitud del fotoperíodo, temperatura, disponibilidad hídrica y de alimentos, agentes estresores e interacciones sociales, modifican la conducta fisiológica y comportamental de la vizcacha.

Este roedor habita en madrigueras construidas en la profundidad del suelo y sólo durante el crepúsculo y las horas de la noche abandona sus cuevas para alimentarse. Durante este breve período de exposición, la luz actúa sobre el sistema regulador intrínseco de esta especie habituada a la penumbra y a la oscuridad durante la mayor parte del día. En el verano, la vizcacha recibe una señal lumínica de mayor intensidad y duración con respecto a los meses invernales. Esto permitió plantear el interrogante respecto a si la luz ambiental provocaba, en este animal nocturno, un mayor efecto en relación a otros roedores de hábitos diurnos.

Los estudios realizados en el *Lagostomus maximus maximus* macho permitieron comprobar que los cambios anuales en la longitud del fotoperíodo constituyen la señal primaria para la sincronización del ciclo reproductivo.

La glándula pineal del *Lagostomus* fue objeto de numerosos estudios morfológicos y bioquímicos en nuestro laboratorio (Guzmán y col., 1980, 1983; Domínguez y col., 1987; Pelzer y col., 1999; Cernuda-Cernuda y col., 2003; Gil y col., 2005; Calderón y col., 2008). Durante el verano la glándula mostró una escasa actividad celular de los pinealocitos y en los meses de invierno exhibieron un gran desarrollo de sus organelas (Guzmán y col., 1983; Domínguez y col., 1987; Cernuda-Cernuda y col., 2003). Además, el estudio de las enzimas reguladoras de la síntesis de melatonina determinó que bajo el régimen natural del ciclo L-O (Invierno L10-O14; verano L14-O10) la actividad de HIOMT fue mayor durante la noche (Guzmán y col., 1980) y, a lo largo del año, presentó un significativo incremento de actividad durante el invierno (Pelzer y col., 1999). Por otro lado, Gil y col., (2005) demostraron que las actividades de las enzimas AANAT y

HIOMT eran significativamente superiores en vizcachas hembras grávidas respecto a las no gravidas. Se ha reportado que el sistema adrenérgico podría estar involucrado en el ciclo diario que activa la síntesis de melatonina pineal (Calderón y col., 2008). Se ha observado que existen ritmos diarios en la secreción de melatonina de origen pineal y retiniana. Dos picos fueron registrados, el máximo en la fase de oscuridad y el mínimo en la fase de luz. Además, se encontraron variaciones estacionales en la concentración de melatonina sérica, con valores máximos en invierno y mínimos en verano (Calderón y col., 2001). Estudios en retina han demostrado diferencias en la distribución de los gránulos que contienen melanina. Durante la noche, cuando los niveles de melatonina retiniana son máximos, los gránulos se encuentran agregados, mientras que durante el día se presentan dispersos. También se describió la existencia de un ciclo diario de renovación de los fotorreceptores y variaciones diarias en la unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonina. Estos resultados sugirieron que en la retina las interacciones entre melatonina y los sitios de unión pueden ser responsables de la regulación de los cambios morfológicos diarios observados en este órgano (Calderón y col., 2002).

Los órganos integrantes del eje reproductivo pineal-hipófisis-gonadal y adaptativo pineal-hipófisis-adrenal, fueron estudiados morfológica y bioquímicamente. En ellos se demostró la acción reguladora del fotoperíodo natural y moduladora de la actividad pineal (Scardapane y col., 1983; Mohamed y col., 1994, 1995, 2000; Muñoz y col., 1997, 1998, 1999, 2001; Ribes y col., 1999; Aguilera-Merlo y col., 2005a, 2005b; Filippa y col., 2005; 2008; Gil y col., 2005, 2007; Pérez-Romera y col., 2005, 2010; Filippa y Mohamed, 2006a, 2006b, 2008, 2010; Rodríguez y col., 2007, 2013; Acosta y col., 2009; 2010, 2011, 2013; Chaves y col., 2011, 2012; Cruceño y col., 2012, 2016; Rosales y col., 2016; Gallol y col., 2018).

Los antecedentes anteriormente mencionados en vizcacha, principalmente aquellos relacionados con glándula pineal, sumados a los diferentes interrogantes respecto a las funciones de las CI y CP y a sus posibles variaciones en relación a la estacionalidad, edad y sexo, nos indujeron a plantear las siguientes **hipótesis de trabajo**:

***“Las células intersticiales de la glándula pineal de vizcacha exhiben variaciones citológicas e inmunohistoquímicas estacionales, sugiriendo una activa participación en la función glandular”.***

***“Las células pigmentadas de la glándula pineal de vizcacha se modifican en relación a los esteroides gonadales”.***





# OBJETIVOS

Shawn Thornton "Solar Scars and Scrying Discs" 2006



**Objetivo general:**

- ❖ Estudiar las células intersticiales y células pigmentadas de la glándula pineal en un modelo de reproducción estacional fotoperíodo dependiente (vizcachas; *Lagostomus maximus maximus*), y su participación en la función glandular.

**Objetivos específicos:**

- ❖ Describir las características histológicas a nivel óptico y ultraestructural de la glándula pineal de vizcachas machos adultos en forma estacional.
- ❖ Analizar las células intersticiales de la glándula pineal utilizando como marcadores las proteínas S-100, GFAP y vimentina.
- ❖ Estudiar las células intersticiales de glándula pineal de vizcachas machos inmaduros sexualmente y comparar sus características con animales adultos.
- ❖ Estudiar las características histológicas de las células intersticiales de la glándula pineal durante la preñez.
- ❖ Analizar las probables variaciones morfométricas de las células intersticiales de la glándula pineal y su relación con los pinealocitos.
- ❖ Analizar las células pigmentadas en la glándula pineal de vizcachas machos y hembras mediante la aplicación de diferentes técnicas histológicas.





# MATERIALES Y METODOS

Shawn Thornton "The Cryptogram of The Sun" 2007



## PARTE A: MODELO EXPERIMENTAL

En el presente Trabajo de Tesis Doctoral, el modelo animal utilizado fue el *Lagostomus maximus maximus*, comúnmente conocido como **vizcacha** (Fig. 4).

### Distribución Geográfica

La vizcacha, es un roedor autóctono sudamericano. Su distribución abarca la región de las Pampas y las regiones semiáridas del Monte y Chaqueña de Argentina, y el sur de Bolivia y Paraguay. Se encuentra principalmente en las extensas regiones llanas del centro del País y en la Mesopotamia (Llanos y Crespo, 1954; Jackson, 1989; Redford y Eisenberg, 1992). En la provincia de San Luis, la presencia de este roedor se observa en toda la amplitud de su territorio.

La vizcacha pertenece al género *Lagostomus* y a la especie *maximus*. Su ubicación taxonómica es la siguiente:

CLASE: *Mammalia*

ORDEN: *Rodentia*

SUBORDEN: *Hystricomorpha*

SUPERFAMILIA: *Chinchilloidea*

FAMILIA: *Chinchillidae*

GENERO: *Lagostomus*

ESPECIE: *Lagostomus maximus*

SUBESPECIE: *Lagostomus maximus maximus*



Figura 4: Fotografía de un ejemplar macho adulto de *Lagostomus maximus maximus*.

### **Aspecto Externo**

El *Lagostomus* es uno de los roedores más grandes del territorio argentino. Presenta un peso y tamaño variado; los machos adultos pueden pesar entre 4.000 a 8.000 g y medir de 65 a 80 cm de longitud. Las hembras son de menor tamaño y su peso oscila entre 2.000 y 5.000 g. La cabeza es grande y achatada inferiormente, el hocico es corto, presentando largos y gruesos anexos pilosos, posee ojos grandes y orejas ovaladas de mediano tamaño. En la boca se observan cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, ambos pares largos y anchos. El cuerpo es fornido y robusto. Las extremidades anteriores son cortas y terminan en manos pequeñas con cuatro dedos, las cuales están provistas de uñas bien desarrolladas y adaptadas para excavar. Las extremidades posteriores están muy desarrolladas, con fuerte musculatura y poseen tres dedos. Es interesante destacar el notorio desarrollo de la uña del segundo dedo de la pata, la cual probablemente el animal utilice para desplazarse con mayor facilidad dentro de las madrigueras subterráneas. La cola es encorvada y se caracteriza por presentar un plano de autonomía entre la quinta y sexta vértebra, por dónde puede cortarse en caso de quedar trabada. Su superficie basal es almohadillada lo que le permite utilizarla como un miembro más. El pelaje presenta

características especiales, los pelos se agrupan en tufos de 20 a 30 unidades cada uno y se distinguen dos clases: unos largos y fuertes; otros cortos, suaves y numerosos. El color y la textura del pelo varían con el sexo, edad del animal y con la época del año (Quintanilla y col., 1973). En general, es suave, corto y sin ondulaciones, siendo más suave y denso en el invierno que en el verano. Su coloración es grisácea y heterogénea, con un ligero jaspeado de color crema. Las regiones laterales del cuerpo son más claras y la parte interna de los miembros es blanca. En la cabeza se observa una franja de color blanca que la recorre casi ininterrumpidamente por debajo de los ojos, hasta la base de las orejas. Resalta una franja negra, más notable en el macho que en la hembra, que se origina del hocico y se dirige hacia atrás. La frente es oscura, negruzca, con dos manchas centrales, alargadas de color blanco. Los miembros son de color gris, generalmente más oscuros en las extremidades. La cola es castaño-grisácea en su porción dorsal, es más clara en los costados y es castaña en la región ventral. Las hembras son ligeramente más grises que los machos y de una textura más suave.

### **Hábitat y alimentación**

La madriguera donde habitan una o más vizcachas recibe el nombre de vizcachera, la cual presenta un piso limpio, firme y liso. En lugares de escasa vegetación, la ubicación y orientación de éstas es indistinta, en tanto que en sitios arbolados están dispuestas próximas a troncos y raíces (Bontti y col., 1999). En general, la vizcachera presenta numerosas bocas de entrada, túneles de comunicación y cámaras de residencia; formando una estructura de disposición laberíntica subterránea. Cuando varios ejemplares habitan una vizcachera se habla de una familia. Estas están constituidas por un número variable de individuos, habiéndose encontrado familias de hasta 40 miembros. Para referirse a varias familias se utiliza el término de colonia, las cuales son regidas por un macho líder, el cual presenta el mayor tamaño y robustez, y se lo denomina vizcachón. El conjunto de vizcacheras habitadas por una colonia recibe el nombre de vizcacheral.

La vizcacha, al ser un roedor exclusivamente herbívoro, se alimenta con la vegetación que encuentra en las proximidades a las vizcacheras. Pueden alimentarse de especies cultivables como el maíz o competir con animales domésticos por el forraje en las zonas ganaderas. Los daños que ocasionan al alimentarse bajan notablemente el rendimiento de cultivos y campos de pastoreo. Cada animal puede consumir por día aproximadamente 2.500 g de vegetales. Por otra parte, las vizcacheras suelen cubrir un

área extensa de 20 a 300 m de diámetro y son construidas a una profundidad de 0,5 a 2 m por debajo del nivel del suelo; disminuyendo así la superficie apta para la siembra o el pastoreo.

### **Sentidos, hábitos y actividades**

El sentido más desarrollado que posee este roedor es el oído. Este favorece en gran medida al animal en la búsqueda de protección frente al peligro. Ante situaciones de riesgo, se establece entre ellos una comunicación a través de gruñidos, los cuales se transmiten de cueva en cueva, y los mantienen resguardados en sus madrigueras hasta que desaparece la amenaza. Presentan un sentido de cooperación notable, al igual que un gran sentido de orientación. Se ha observado que un ejemplar herido en las proximidades de una cueva es ayudado por otros a penetrar en misma.

Durante la época de celo pueden ocurrir contactos agresivos, de lo contrario son pacíficas y es frecuente observar vizcachas alimentándose en grupos, lo que confirma sus hábitos gregarios. La actividad diaria de estos animales está regulada por fotoperíodo natural. Durante las horas de luz permanecen en sus madrigueras, alternando momentos de descanso y actividad. Al llegar el crepúsculo y durante la noche, abandonan las vizcacheras para alimentarse. Sin embargo, este comportamiento se modifica en función de los peligros que se presenten (Llanos y Crespo, 1954; Branch, 1993; Weir, 1971b).

### **Edad y dimorfismo sexual**

El cálculo de la edad individual ha sido un problema complejo para resolver y varios pueden ser los métodos y recursos para calcular la edad de un mamífero. Sin embargo, ninguno de ellos es perfecto y totalmente satisfactorio. La mayoría de las veces se expresan como *edades relativas*, siendo las *absolutas* muy difíciles de calcular. Llanos y Crespo (1954) para calcular la edad relativa de las vizcachas, optaron por utilizar como principal parámetro el peso del animal, debido a que este es un valor prácticamente de evolución continua a través de la vida de cada ejemplar. En los machos el peso corporal aumenta desde el momento del nacimiento (200 g) hasta el estado adulto (8.000 g), alrededor de 40 veces, mientras que el largo total aumenta 3,2 veces (de 22,5 a 81,6 cm). En las hembras que son menos corpulentas, el aumento del peso corporal es algo menor, aproximadamente unas 25 veces (de 200 a 5.000 g), y el largo total aumenta unas 2,9 veces (de 25,5 a 73,5 cm). En las vizcachas macho y hembra se han establecido tres

categorías de edades, teniendo en cuenta principalmente el peso corporal. Para los machos, se consideraron dentro de la categoría **A** jóvenes o impúberes (200 a 1.999 g), a los ejemplares recién nacidos y hasta el primer año de vida aproximadamente, que es cuando presumiblemente están en condiciones de entrar en actividad sexual; categoría **B** semiadultos o prepúberes (2.000 a 4.999 g), comprende desde el año de vida hasta los 3 años aproximadamente y categoría **C** adultos (de 5.000 g en adelante), los cuales pueden alcanzar hasta los 7 u 8 años de edad. En las hembras, se aplicó el mismo criterio variando los límites de los pesos debido al menor desarrollo físico de las mismas. Por lo tanto, las vizcachas jóvenes **A** (200 a 1.499 g) se consideraron desde su nacimiento hasta los 8 meses de edad, que generalmente coincide con la iniciación de su actividad sexual; semiadultas **B** (1.500 a 3.499 g) a partir de los 8 meses hasta alrededor de los 2 años de edad y finalmente las adultas **C** (de 3.500 g en adelante) desde esa época hasta los límites de máxima edad, posiblemente de 5 a 6 años.

La vizcacha presenta un marcado dimorfismo sexual en cuanto al tamaño corporal. Los machos manejan pesos comprendidos entre los 4500 a 8000 g y las hembras entre 2000 a 5000 g. El pelaje es más oscuro en los machos y la textura más suave en las hembras. Los genitales en los machos son externos y las hembras pueden distinguirse también por la presencia de dos pares de mamas torácicas ubicadas lateralmente.

### **Reproducción**

La vizcacha hembra es un animal monoestral, que se aparee, gesta y pare sólo una vez al año. Nacen generalmente dos crías bien desarrolladas, rara vez una y excepcionalmente tres. En cautiverio, el roedor se vuelve poliestral y el ciclo estral dura entre 40 y 45 días aproximadamente, en tanto que la gestación tiene una duración media de  $153,7 \pm 0,5$  días (Weir, 1971b).

En su hábitat natural la etapa de celo transcurre durante la segunda mitad del mes de marzo. Las manifestaciones del celo se aprecian a través de la actividad demostrada por ambos sexos, en especial por los machos cuyas luchas adquieren grandes proporciones, encontrándose toda la colonia en un estado de gran excitación. El apareamiento transcurre dentro de la vizcachera. Durante el otoño se observan los primeros estadios de preñez. Se pueden formar hasta 6 embriones en cada oviducto, de los cuales la mayoría son reabsorbidos alrededor del día 70 de gestación, y sólo los embriones implantados más cerca del cérvix son los que permanecen y cumplen todo el

ciclo (Weir, 1971b, Roberts y Weir, 1973; Jensen y col., 2008). Una particularidad reproductiva de este roedor, es la formación continua de folículos pre-ovulatorios durante la preñez y un evento de pseudo-ovulación en la mitad del ciclo gestacional, con generación de cuerpos lúteos secundarios accesorios que retienen el oocito y presentan actividad esteroidogénica (Jensen y col., 2008; Dorfman y col., 2013; Fraunhoffer y col., 2017). Como la gestación se extiende por un período de cuatro meses, estos cuerpos lúteos secundarios aportarían niveles significativos de PG que impedirían la reabsorción de todos los fetos (Jensen y col., 2008). Esto es interesante porque se opone a lo descrito clásicamente en la mayoría de las hembras de mamíferos, donde el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal sufre un proceso de inhibición durante la gestación debido al efecto de neurotransmisores inhibitorios como el ácido gamma-aminobutírico (Adler y Crowley, 1986; Herbison y Dyer, 1991) y a esteroides gonadales como el estradiol (E2) y la progesterona (PG; Wildt y col., 1981; Beshay y Carr, 2013). De igual modo que el apareamiento, el nacimiento se produce en forma subterránea. Las crías al nacer presentan un estado completo de desarrollo físico, característica sobresaliente de los histicomorfos. Pesan aproximadamente 200 g, están cubiertas completamente de pelos y se independizan con cierta rapidez. Posiblemente se alimenten de leche materna sólo las primeras semanas de vida ya que es frecuente observar pasto en el estómago de ejemplares jóvenes. Desde el punto de vista de la estrategia reproductiva, la vizcacha produce una sola camada al año, posee un bajo potencial reproductivo y pubertad avanzada. Las hembras conciben por primera vez a una edad promedio de 214 días, mientras que los machos alcanzan la madurez sexual entre los 12 y 17 meses (Jackson, 1989).



## **PARTE B: METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS UTILIZADAS**

### **Aspectos éticos sobre el manejo de animales de experimentación**

Los protocolos experimentales desarrollados fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Res. N° 10/2014). Además, el Área de Control de Biodiversidad del Ministerio del Medioambiente de la provincia de San Luis (Argentina) aprobó el protocolo de estudio para llevar a cabo investigaciones científicas en la provincia (Res. N° 47-PBD-2015 y Res. N° 18-PMA-2018). La manipulación y sacrificio de los animales fueron realizados en conformidad con los estándares internacionales de uso de animales de experimentación, definidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos. Los procedimientos fueron diseñados para optimizar las muestras y minimizar el número de animales utilizados y el sufrimiento. Los tejidos no utilizados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, como las glándulas hipófisis, harderiana, adrenales, retina, testículo, epidídimo, glándulas anexas del sistema genital masculino y ovario, fueron utilizados por otros miembros del equipo de investigación.

### **Captura y mantenimiento de animales**

Las vizcachas fueron capturadas en las proximidades de la ciudad de San Luis (33° 20' de latitud Sur y 760 m de altitud). La captura de los animales se realizó con un sistema de trampas rectangulares (120 x 25 cm) con puertas batientes diseñadas a tal fin y ubicadas estratégicamente en las bocas de las vizcacheras. Los animales fueron trasladados al bioterio y tratados con hexaclorociclohexano para eliminar los ectoparásitos de su pelaje. Se sacrificaron inmediatamente o se mantuvieron en cautiverio un corto tiempo.

Los valores estacionales medios de irradiación solar, expresados como heliofanía (H), de precipitación (en mm) y de temperatura (en °C) fueron provistos por el Servicio Meteorológico Nacional San Luis. En invierno se observaron los valores más bajos de heliofanía, precipitación y temperatura (Tabla 1).

**Tabla 1: Condiciones ambientales estacionales**

PARAMETROS	VERANO	OTOÑO	INVIERNO	PRIMAVERA
HELIOFANIA, (H)	9,38	7,09	6,82	9,09
PRECIPITACION, (mm)	90	27	11	58,5
TEMPERATURA, (°C)	22	13	12	19,66

Los animales fueron clasificados en base al peso corporal y condición reproductiva. En los machos, la condición reproductiva fue determinada por el estudio histológico de los testículos. Se trabajó con los siguientes grupos:

- ❖ Vizcachas machos adultos capturadas en verano.
- ❖ Vizcachas machos adultos capturadas en otoño.
- ❖ Vizcachas machos adultos capturadas en invierno.
- ❖ Vizcachas machos adultos capturadas en primavera.
- ❖ Vizcachas machos inmaduros sexualmente capturadas en verano e inicios del otoño.

En las hembras, la condición reproductiva fue determinada por el estudio histológico de los ovarios. Adicionalmente, los cuernos uterinos fueron examinados para evaluar la presencia de embriones y/o fetos. Estos criterios fueron aplicados previamente en nuestro laboratorio (Gil y col., 2005). Se trabajó con los siguientes grupos:

- ❖ Vizcachas hembras adultas no preñadas. Fueron capturadas en verano e inicio del otoño.
- ❖ Vizcachas hembras adultas en preñez inicial. Fueron capturadas en otoño y presentaron dos o más embriones de entre 1 a 3 cm de largo desde cabeza a cola incluida.
- ❖ Vizcachas hembras adultas en preñez media. Fueron capturadas en invierno y presentaron dos fetos de entre 10 a 14 cm.
- ❖ Vizcachas hembras adultas en preñez final. Fueron capturadas en primavera y presentaron dos fetos de más de 22 cm.

**Anestesia, eutanasia y obtención de muestras**

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular con una combinación de 12 mg/kg clorhidrato de Ketamina (Ketamina 50; Holliday-Scott® Buenos Aires, Argentina) y 0,4 mg/kg de clorhidrato de Xilazina (PharmaVet® S.A. Santa Fe, Argentina). Una vez anestesiados, se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca. Posteriormente, las vizcachas fueron rápidamente sacrificadas por inyección intracardiaca de 0,25 ml/kg peso corporal de Euthanyle® (pentobarbital sódico, difenilhidantoína sódica, Brouwer S.A., Buenos Aires, Argentina). El cerebro fue rápidamente expuesto y se extrajo la glándula pineal, la cual fue fijada y procesada para microscopía óptica o electrónica de transmisión.

**Fijación y cortes histológicos para microscopia óptica**

Luego de la extracción, las glándulas pineales se fijaron en *Líquido de Bouin*, empleado de rutina en el procesamiento de las muestras para microscopía óptica y preparado de la siguiente forma:

Solución saturada de ácido pícrico	19 ml
Formol al 40%	5 ml
Ácido acético glacial	1 ml

Las glándulas se fijaron entre 18 y 24 h, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (50°, 70°, 96° y 100°), fueron aclaradas en xileno y finalmente incluidas en parafina. Cortes de 5 µm de espesor fueron realizados con un micrótomos de rotación Microm HM 325.

**Técnicas histológicas generales****\*Coloración de Hematoxilina-Eosina (H-E)****Preparación de los colorantes:***Hematoxilina de Harris:*

Hematoxilina	1 g	<b>A</b>
Alcohol etílico 100°	10 ml	
Alumbre de potasio	20 g	<b>B</b>

Agua destilada	400 ml	
Óxido amarillo de mercurio	0,5 g	<b>C</b>

Disolver **A** y llevar **B** a ebullición. Luego, agregar **A** sobre **B** y finalmente **C**, lentamente. Hervir la mezcla durante 3 min. Enfriar y adicionar 4 ml de ácido acético por cada 100 ml de solución. Usar previa filtración.

*Eosina:*

Eosina amarilla	1 g
Agua destilada	100 ml

**Técnica:** Para procesar los cortes histológicos realizados y recogidos en portaobjetos, se empleó el siguiente esquema de trabajo:

Xileno	5 min
Xileno	5 min
Alcohol etílico 100°	5 min
Alcohol etílico 96°	5 min
Alcohol etílico 70°	5 min
Agua destilada	lavado
Hematoxilina	30 a 45 seg
Agua corriente	Hasta viraje de color
Agua destilada	lavado
Eosina	5 a 7 seg
Agua destilada con gotas de ácido acético	lavado
Alcohol etílico 70°	5 min
Alcohol etílico 96°	5 min
Alcohol etílico 96°	5 min
Alcohol etílico 100°	5 min
Alcohol etílico 100°	5 min
Xileno	5 min
Xileno	5 min
Montaje con ENTELLAN	

**\*Tinción de Van Gieson (vG)**

Solución de Van Gieson: 100 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico y 10 ml de fucsina ácida al 1%.

**Técnica:** Se procedió de la misma forma que la técnica de H-E hasta el paso de H<sub>2</sub>O (d).

Luego:

Hematoxilina	1 min
Agua corriente	hasta viraje de color
Lavar con H <sub>2</sub> O (d)	
Solución de van Gieson	2- 5 min
Lavar con H <sub>2</sub> O (d)	
Alcohol etílico 70°	5 min
Alcohol etílico 96°	5 min
Alcohol etílico 96°	5 min
Alcohol etílico 100°	5 min
Alcohol etílico 100°	5 min
Xileno	5 min
Xileno	5 min
Montaje con ENTELLAN	

**Técnicas histoquímicas****\*Hematoxilina-Acida Fosfotúngstica Modificada (PTAHM)****Preparación de los reactivos:**

*Eosina:*

Eosina Y	0,5 g
Alcohol etílico 80°	10 g
H <sub>2</sub> O (d)	500 ml

Solución de Trabajo: 10 ml de stock añadir 50 µl ácido acético glacial antes del uso.

*Solución de ácido fosfotúngstico y hematoxilina (PTAH):*

Hematoxilina	0,5 g
Ácido Fosfotúngstico	10 g
H <sub>2</sub> O (d)	500 ml

Disolver los productos sólidos en porciones separadas de H<sub>2</sub>O (d). La hematoxilina se disuelve más rápido con la ayuda de calor. Después de que se enfríe se puede combinar con la mezcla de ácido fosfotúngstico y H<sub>2</sub>O (d). El proceso de maduración requiere ordinariamente varias semanas, pero si se añade 0,088 g de permanganato potásico, el colorante madurará inmediatamente.

Solución de permanganato de potasio al 0.25%

Solución al 1% de ácido periódico

Solución de ácido oxálico al 5%.

**Técnica:** Desparafinar e hidratar los portaobjetos hasta alcohol etílico 80°

Colorear los portaobjetos con eosina	15 seg
Lavar en H <sub>2</sub> O (d)	
Colocar los portaobjetos en ácido periódico 1%	20 min
Lavar en H <sub>2</sub> O (d)	
Oxidar con permanganato de potasio al 0,25 %	2-5 min
Lavar en H <sub>2</sub> O (d)	
Blanquear en ácido oxálico hasta decoloración	5 min aprox.
Lavar en H <sub>2</sub> O (d)	
Colorear con solución de PTAH en estufa a 60 °C	30-90 min

**Nota:** Revisar sucesivamente los portaobjetos cada 30 minutos. (Se puede dejar en solución PTAH toda la noche a temperatura ambiente).

Deshidratar en alcohol etílico 96° y luego 100° 5 min

**Nota:** La deshidratación debe ser rápida porque se puede remover la coloración (Se comienza desde alcohol etílico 96°).

Aclarar y montar

#### **\*Método de Masson-Fontana para la determinación de melaninas**

Las glándulas pineales extraídas fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. Se utilizaron cortes de 4 µm de espesor.



*Soluciones y reactivos*

- Solución de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  al 10 %.
- Solución de Stock de  $\text{NO}_3\text{Ag}$ : agregar  $\text{NH}_4\text{OH}$  gota a gota a 25 ml de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  al 10 % hasta que quede un ligero precipitado formado previamente.
- Solución de trabajo de  $\text{NO}_3\text{Ag}$ : Solución stock de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  (25ml), agua destilada (75ml). Filtrar si es necesario.
- Solución de trabajo  $\text{Cl}_4\text{Au}$ : solución  $\text{Cl}_4\text{Au}$  al 1% (10 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (d).

**Técnica:** Desparafinar e hidratar en  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Colocar los cortes en la solución de trabajo  $\text{NO}_3\text{Ag}$  a 56 °C durante 2 h

Lavar en  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Colocar los cortes en solución de trabajo  $\text{Cl}_4\text{Au}$  por 1 minuto

Lavar en  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Colocar los cortes en una solución de Tiosulfato de Sodio al 5% por 1 minuto

Lavar en  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Contrastar con Rojo Nuclear Rápido.

Lavar en  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Deshidratar, aclarar y montar

**\*Método de Schmorl para lipofucsinas y melanina**

Las glándulas pineales extraídas fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. Se utilizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor.

*Soluciones y reactivos*

- Solución stock de cloruro férrico al 1 %.
- Solución stock de ferricianuro de potasio al 1 % recién preparada.
- Solución de trabajo: solución de cloruro férrico al 1% (37,5 ml), solución de ferricianuro de potasio al 1% (5,0 ml) y agua destilada (7,5ml).

**Técnica:** Desparafinar e hidratar en  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Colocar los cortes en la solución de trabajo por 20 min

Lavar en agua corriente

Tratar con ácido acético al 1 % por 5 minutos

Contrastar con la tinción de van Gieson.

Lavar en  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Deshidratar, aclarar y montar

**\*Método para decoloración de melaninas**

Se utilizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidos a partir de glándulas pineales fijadas en formol al 10 % e incluidos en parafina.

**Técnica:** Cortes coloreados con el método de Schmorl se tratan con permanganato de potasio acidificado al 5 % por 30 minutos

Lavar en  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Tratar las secciones con ácido oxálico al 1 % por 5- 10 minutos

Deshidratar, aclarar y montar

**\*Método para DOPA-Oxidasa**

Las glándulas pineales fueron fijadas en glutaraldehído al 25% por 6 h y luego se seccionaron en porciones más pequeñas. Las secciones fueron colocadas en una solución al 0.1 % de DL- DOPA (DL 3-4 dihidroxifenilalanina, Sigma), en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4) y conservada a 4 °C en refrigerador por toda la noche. A la mañana siguiente, las secciones fueron incubadas por 1-2 h a 37 °C en una solución nueva con la misma composición previamente descrita. Posteriormente, las secciones de tejido fueron deshidratadas en alcohol, aclaradas en tolueno e incubadas en parafina.

**\*Método del Rojo de Alizarina para Calcio (Pearse, 1960)**

Se utilizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidos a partir de glándulas pineales fijadas en formol al 10 % e incluidos en parafina.

**Técnica:** Llevar los cortes a  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Teñir en una solución acuosa de rojo de alizarina S al 1 % durante 3-5 min.

Lavar con  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Contrastar los núcleos con azul de toluidina al 0.1 % durante 1 min

Lavar con  $\text{H}_2\text{O}$  (d)

Deshidratar, aclarar y montar

**Técnicas inmunohistoquímicas****\*Técnica Inmunohistoquímica (Método Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa)****Preparación de los reactivos:****\*Buffer Fosfato Salino (PBS) 0,01M; pH 7,4***Preparación solución stock:*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O	4,03 g
(o Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O)	3,00 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,23 g
H <sub>2</sub> O (d)	100 ml

*Preparación solución de trabajo:*

Solución stock	100 ml
Agua destilada	900 ml
Cloruro de sodio	8 g

**Recuperación antigénica:****\*Buffer Citrato 0,01M; pH 6,00***Preparación solución stock:*

Ácido Cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	19,2 g
Disolver en 500 ml de agua destilada	
Controlar pH y ajustar con hidróxido de sodio 2 N.	
Completar con agua destilada hasta 1000 ml	

*Preparación solución de trabajo:*

Solución Stock	50 ml
H <sub>2</sub> O (d)	450 ml
Controlar pH	

**Técnica:** La recuperación antigénica se realizó utilizando el calor de un horno microondas a máxima potencia (800 watts). Los portaobjetos se colocaron en una cubeta que contenía el buffer citrato, la cual se introdujo en el microondas. Durante 3 min a máxima potencia, seguido de un descanso de 10 minutos dentro del microondas, un nuevo ciclo de 3 min a máxima potencia y con un descanso de 10 minutos fuera del microondas, se completó la

recuperación antigénica. Los portaobjetos luego se lavaron en PBS para poder continuar con la técnica de inmunohistoquímica.

**Técnica Inmunohistoquímica:** Los cortes histológicos se recogieron en portaobjetos previamente gelatinizados o silanizados, y luego se procedió a su desparafinado e hidratación, de forma similar a lo previamente descrito en la técnica de H-E hasta el paso del agua destilada. El esquema se continúa de la siguiente manera:

- ❖ Recuperación antigénica
- ❖ Bloquear la actividad de la peroxidasa endógena: incubar con agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) al 3 %: 15 a 20 min
- ❖ Lavar en PBS
- ❖ Incubar con el anticuerpo primario en cámara húmeda (temperatura y tiempo de incubación dependientes del anticuerpo primario utilizado)
- ❖ Lavar en buffer PBS
- ❖ Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado: 30 min en cámara húmeda
- ❖ Lavar en buffer PBS
- ❖ Incubar con el conjugado estreptavidina-peroxidasa: 30 min en cámara húmeda
- ❖ Lavar en buffer PBS
- ❖ Revelar con solución de 2,5 ml de buffer, 50  $\mu$ l de  $H_2O_2$  y 100  $\mu$ l de DAB (3,3'-diaminobencidina): realizando el control microscópico hasta la aparición de un depósito de color marrón dorado en las zonas de localización del antígeno
- ❖ Contrastar con hematoxilina
- ❖ Deshidratar y montar

Los anticuerpos primarios utilizados para marcar las CI de la glándula pineal fueron los siguientes (Fig. 5):

- ❖ Anti-Proteína S-100 (Policlonal N°. AR058-5R. Ready to use. BioGenex, San Ramón, CA, USA).

- ❖ Anti-Proteína Glio-Fibrilar Ácida (Policlonal N°. AR020-5R. Ready to use. BioGenex, San Ramón, CA, USA).
- ❖ Anti-Vimentina (Clon V9. N°. AM074-5M. Ready to use. BioGenex, San Ramón, CA, USA).

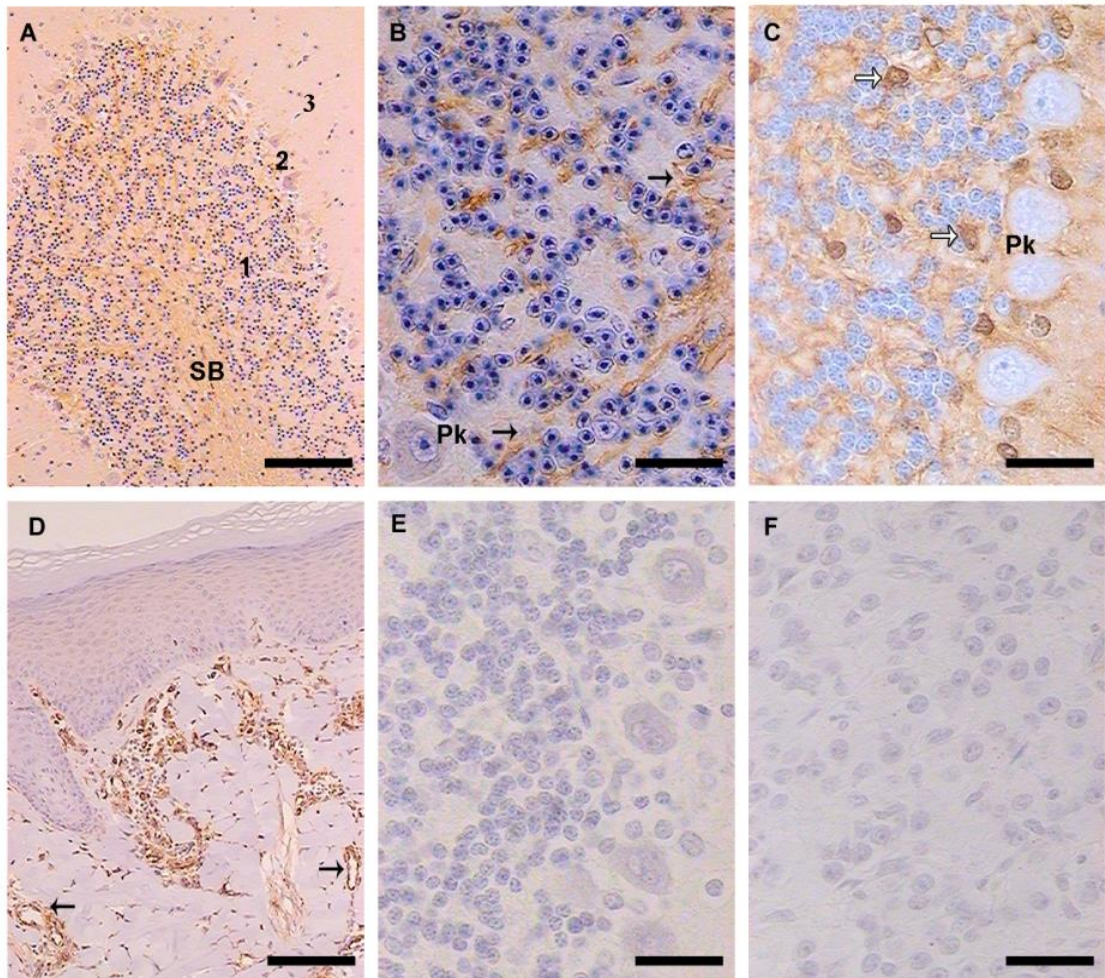


*Figura 5: Anticuerpos primarios utilizados para el estudio inmunohistoquímico de las células intersticiales en glándula pineal de vizcacha.*

Para confirmar la especificidad del procedimiento inmunohistoquímico (control negativo), se procesaron cortes histológicos adyacentes como se describió previamente, pero el anticuerpo primario fue reemplazado por buffer PBS y suero normal para control negativo (BioGenex, San Ramón, CA, USA). En ninguno de estos controles se observaron estructuras o células inmunopositivas (Fig. 3 E-F). Los controles positivos para S-100 y GFAP fueron realizados utilizando cortes histológicos de cerebelo de rata. Para vimentina se utilizaron cortes histológicos de piel de rata, tal como indica el fabricante. Estos controles, fueron procesados por la técnica inmunohistoquímica previamente descrita. En los cortes se cerebelo, se observó la inmunomarcación en las



células de naturaleza glial (Fig. 6 A-C). Respecto a vimentina, la positividad se exhibió en la dermis, donde las células mostraron una inmunomarcación intensa (Fig. 6 D).



*Figura 6: Controles de la técnica inmunohistoquímica. A) La fotomicrografía muestra una sección de cerebelo de rata inmunomarcada con GFAP. Sustancia blanca (SB) y capas de sustancia gris: 1, capa de células glomerulares 2, monocapa de células de Purkinje y 3, capa molecular. B y C) inmunohistoquímica para las proteínas GFAP y S-100, respectivamente. D) inmunomarcación para vimentina en piel de rata. E) y F) cortes de cerebelo de rata y glándula pineal de vizcacha usados como control negativo. Escala de barras: A y D, 100  $\mu$ m; B, C, E y F, 25  $\mu$ m.*

#### **\*Doble-inmunohistoquímica para las proteínas S-100 y GFAP**

Esta técnica fue utilizada para analizar la coexpresión de las proteínas S-100 y GFAP en las CI de la glándula pineal.

**Técnica:** los cortes histológicos se recogieron en portaobjetos previamente gelatinizados o silanizados y se procedió en forma análoga a la técnica de inmunohistoquímica previamente descrita para el primer anticuerpo primario (anti-GFAP). Posteriormente, para utilizar el segundo anticuerpo primario (anti-Proteína S-100), se continuó de la siguiente manera:

Lavar los cortes en buffer glicina-HCl (pH: 2-2,2; 0,1M). Tres lavados de 10 minutos a 20°C

Lavar en buffer PBS

Incubar con el segundo anticuerpo primario en cámara húmeda.

Lavar en buffer PBS

Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado: 30 min en cámara húmeda

Lavar en buffer PBS

Incubar con el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina: 30 min en cámara húmeda

Lavar en buffer PBS

Revelar con 100 µl de New Fuchsin Chromogen Kit (BioGenex, N° de Catálogo HK 183-5K) hasta la aparición de un precipitado fucsia.

Contrastar con hematoxilina

Lavar en agua corriente

Montar con medio de montaje acuoso permanente (SuperMount, BioGenex)

Los cromógenos DAB y New Fuchsin fueron seleccionados para la visualización de los antígenos porque su combinación de colores genera un buen contraste. El sitio de reacción del primer anticuerpo primario (anti-GFAP) fue revelado siguiendo el procedimiento descrito en la sección inmunohistoquímica, usando DAB como cromógeno. Mientras que la localización de la proteína S-100 fue revelada con el cromógeno New Fuchsin.

### **Análisis morfométrico**

Se utilizó un microscopio binocular Olympus BX 40 conectado a una computadora con procesador de imagen y sistema de grabación. Las imágenes se capturaron mediante una videocámara color Sony SSC-DC50A y se procesaron con el software Image Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). El software permitió el siguiente



procesamiento de las imágenes: adquisición, ajuste análogo automático, substracción de fondo, calibración de distancia y diferentes mediciones.

- ❖ Adquisición de imágenes: Los cortes histológicos procesados con la técnica de inmunohistoquímica para las diferentes proteínas fueron recorridos en banda griega, adquiriéndose y guardándose imágenes de cada uno de los campos microscópicos examinados.
- ❖ Calibración de distancia: Se realiza para conocer el tamaño de los objetos enfocados en el microscopio y observados a través del monitor de la computadora. Esta calibración se realizó para cada una de los objetivos (2X, 4X, 10X, 40X, 100X) del microscopio. Para este procedimiento se empleó un portaobjetos con una escala micrométrica para microscopía de 2 mm (Reichert, Austria).
- ❖ Manejo de imágenes: Todas las imágenes obtenidas se almacenaron en el disco duro de la computadora y en unidades de almacenamiento portátiles (pendrives, CD, DVD), y posteriormente se analizaron los diferentes parámetros. Las mismas se observaron sobre el monitor de la computadora y antes de comenzar las mediciones se definió el área estándar o de referencia (AR). Para imágenes capturadas con el objetivo de 40X, el AR fue de 18.141,82  $\mu\text{m}^2$ .

### **Parámetros morfométricos analizados**

El análisis morfométrico de las CI fue realizado a partir de tres cortes histológicos regularmente espaciados (50  $\mu\text{m}$ ) y utilizando cuatro glándulas pineales por cada grupo estudiado. En cada sección se analizaron 20 campos microscópicos, 10 provenientes de la región proximal y 10 de la distal, seleccionados en forma aleatoria. Finalmente, se obtuvieron datos de 120 campos microscópicos por cada grupo analizado. Los parámetros morfométricos utilizados fueron los siguientes:

- ✓ **Porcentaje de área inmunopositiva para S-100 (%AI-S-100)**, el cual fue calculado mediante la fórmula  $\%AI-S-100 = \Sigma AI-S-100 / \Sigma AR \times 100$ , donde  $\Sigma AI-S-100$  representa la sumatoria de las áreas ocupadas por las células inmunomarcadas con anti-S-100;  $\Sigma AR$  es la sumatoria del área de referencia en todos los campos microscópicos.

✓ **Porcentaje de área inmunopositiva para GFAP (%AI-GFAP)**, el cual fue calculado mediante la fórmula  $\%AI-GFAP = \Sigma AI-GFAP / \Sigma AR \times 100$ , donde  $\Sigma AI-GFAP$  representa la sumatoria de las áreas ocupadas por las células inmunomarcadas con anti-GFAP;  $\Sigma AR$  es la sumatoria de áreas de referencia en todos los campos microscópicos.

*Vimentina fue expresada en CI y estructuras vasculares, por este motivo el análisis morfométrico no fue realizado para esta proteína.*

✓ **Porcentaje de células inmunorreactivas contra la proteína S-100 con un núcleo visible (%CI-S-100)**, fue determinado en un promedio de 120 campos microscópicos por región en cada grupo de estudio. Por campo, el porcentaje de células inmunorreactivas fue obtenido de acuerdo a la siguiente fórmula  $A / (A+B) \times 100$ . Cada campo presentó entre 90 y 110 células. El número de células S-100 inmunorreactivas (**A**) y el número de núcleos en células inmunonegativas (**B**) fue contado. Un objetivo de 40X fue utilizado para las observaciones.

✓ **Porcentaje de células pigmentadas (%CP)** fue determinado en un promedio de 120 campos microscópicos por glándula pineal en cada grupo de estudio. Por campo, el porcentaje de CP fue obtenido de acuerdo a la siguiente fórmula  $A / (A+B) \times 100$ . Cada campo exhibió entre 90 y 110 células. Se contó el número de CP (**A**) y el número de células restantes del parénquima (**B**, pinealocitos y CI) utilizando un objetivo de 40X.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM) para todos los parámetros analizados. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Mientras que las comparaciones entre dos grupos fueron realizadas mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Diferencias con un valor de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativas. El software InfoStat versión 2011 (Di Rienzo y col., 2011) fue utilizado para el análisis estadístico de los parámetros morfométricos.

**Técnica de microscopía electrónica****\*Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Las pineales fueron prefijadas *in situ* mediante el agregado de la solución fijadora de Karnovsky (1965) y seccionadas en bloques pequeños (2 mm<sup>3</sup>). Luego de estar inmersos durante 30 min en esa misma solución, estos bloques se seccionaron en trozos de menor tamaño (1 mm<sup>3</sup>) y se continuó con el protocolo de rutina para el procesamiento de muestras para MET: primera fijación por inmersión en Karnovsky, segunda fijación en tetróxido de osmio, deshidratación en acetonas de graduación creciente, infiltración con resina de baja viscosidad, entacado, polimerización, cortes finos y ultrafinos en ultramicrotomo, contraste y observación al MET.

**Soluciones buffer utilizadas***1) Buffer fosfato de sodio 0,13 M, pH 7,2;*

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,51 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O	3,55 g
H <sub>2</sub> O (d)	100 ml
Ajustar el pH a 7,2	

*2) Buffer cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,3-7,4;*

Na(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sub>3</sub> .3H <sub>2</sub> O	21,40 g
H <sub>2</sub> O (d)	1000 ml
Ajustar el pH entre 7,3-7,4	

**\*Mezcla fijadora**

Se utilizó una mezcla fijadora y diferentes tiempos de fijación con el fin de encontrar las condiciones óptimas de trabajo:

*Glutaraldehído-Paraformaldehído (Solución de Karnovsky; 1<sup>er</sup> Fijador):*

Paraformaldehído	1 g
H <sub>2</sub> O (d)	10 ml

**Preparación:** Calentar el paraformaldehído en agua destilada a 65 °C (no llevar a ebullición) agitando bajo campana hasta disolver totalmente. Aclarar agregando gota a

gota NaOH 1N y luego dejar enfriar. Finalmente añadir el glutaraldehído al 25 % y controlar el pH, debe estar en 7,2.

Glutaraldehído 25 %	5 ml
Buffer fosfato 0,13 M (pH = 7,2)	10 ml
Ajustar el pH final entre 7,2-7,4	

El tiempo de fijación óptimo para las pineales fue entre 3 a 4 h y el exceso de fijador fue eliminado con el buffer fosfato 0,13M, pH 7,2. Se lavaron durante 30 minutos.

*Tetróxido de osmio 2% (Solución acuosa, 2<sup>do</sup> fijador):*

Solución de OsO <sub>4</sub>	1 g	<b>A</b>
H <sub>2</sub> O (d)	50 ml	

*Solución de ferrocianuro de potasio 3%*

K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ·3H <sub>2</sub> O	3.43 g	<b>B</b>
H <sub>2</sub> O (d)	100 ml	

Solución Buffer cacodilato de sodio	0,1 M	<b>C</b>
-------------------------------------	-------	----------

**Preparación:** Mezclar 1 volumen de cada una de las soluciones (**A**, **B** y **C**).

Postfijación en OsO<sub>4</sub> 1% en buffer cacodilato, con el agregado de ferrocianuro de potasio al 1% en solución final, como agente auxiliar del contraste de membranas. (Karnovsky, 1971), durante 2 h bajo campana. Una vez transcurrido este tiempo, los bloques tisulares fueron lavados con buffer cacodilato de sodio durante 30 minutos.

#### **\*Técnica de deshidratación**

Se realizó en concentraciones crecientes de acetona en buffer cacodilato de sodio hasta llegar a acetona pura.

Acetona 50 %	15 min
Acetona 75 %	15 min
Acetona 90 %	15 min

Acetona 100 %	15 min
Acetona 100 %	15 min

#### **\*Infiltración en resina de baja viscosidad**

Los bloques tisulares deshidratados en acetona se infiltraron en resina de baja viscosidad (Spurr, 1969). Se utilizó una mezcla de resina – acetona 50% durante 3 h y luego se infiltraron con resina pura durante 12 h.

#### **\*Entacado y polimerizado**

Los bloques se colocaron en moldes y se realizó la polimerización en estufa a 60 °C durante 48 h.

##### ***Resina plástica de Spurr (Ted Pella, Inc):***

Vinilcyclohexene dioxide (VCD)-ERL	10 g
Diglycidyl ether of Polypropylenglycol (DER)	6 g
Nonenyl succinic anhydride (NSA)	26 g
Dimethylaminoethanol (DAME)-S1	0,4 g

La resina se preparó con el método gravimétrico (pesando los componentes en la balanza). Se mezclaron perfectamente los tres primeros componentes de la resina y posteriormente se adicionó el catalizador (DAME)-S1. La mezcla puede guardarse varios meses en freezer a -20 °C, cuidando de que tome temperatura ambiente antes de usar para que no se hidrate y vuelva a bajar la viscosidad.

#### **\*Cortes semifinos: azul de toluidina**

Los tacos así obtenidos se cortaron en un ultramicrotomo Leica Ultracut R (Fig. 7). En primer lugar, se realizaron cortes semifinos (1 µm de espesor) los cuales fueron coloreados con azul de toluidina (Richardson y col., 1960) y posteriormente se observaron en un microscopio de luz. Estos cortes de resina sirven para orientarnos sobre el estado del material y para seleccionar adecuadamente el área de estudio del taco. Además, por ser tan finos, permiten la obtención de imágenes con células siempre en foco y con mayor grado de detalle.



*Figura 7: Ultramicrotomo Leica Ultracut R.*

**Procedimiento de la coloración:**

- ✓ Las secciones semifinas se juntaron con un anso del bote.
- ✓ Se recibieron en una gota de agua sobre un portaobjeto.
- ✓ Por debajo del portaobjeto se marcó su localización con una fibra.
- ✓ Se dejaron secar sobre una plancha de estiramiento hasta que las secciones se adhirieron al vidrio.
- ✓ Se agregó una gota de azul de toluidina, también en caliente, hasta la formación de un borde iridiscente (unos segundos), cuidando de no aspirar directamente sus vapores.
- ✓ Se enjuagaron con agua destilada.
- ✓ Se observaron en un microscopio Olympus BX 40 en forma directa o mediante el agregado de un líquido de montaje y un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.
- ✓ Las imágenes se capturaron mediante una videocámara y se procesaron con el software Image Pro Plus 5.0
- ✓ Los preparados se resguardaron de la luz.



*Solución de Azul de Toluidina (cortes de resina epoxi):*

Azul de Toluidina	5 g
Borato de sodio	10 g
H <sub>2</sub> O (d)	100 ml

**\*Cortes ultrafinos y contraste**

Los cortes ultrafinos se obtuvieron en un ultramicrotomo Leica Ultracut R. Aquellos cortes de color de interferencia gris opaco (60 nm), se recogieron en grillas de cobre de 300# y fueron contrastados con acetato de uranilo durante 1 minuto y citrato de plomo durante 5 minutos (Millonig, 1961; Reynolds, 1963). La observación de los mismos fue realizada en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 900 EM (Fig. 8).



*Figura 8: Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss 900 EM.*

**Soluciones de contraste utilizadas***Solución de Acetato de Uranilo:*

Acetato de uranilo	1 g
H <sub>2</sub> O (d)	50 ml

Disolver con agitación.

Luego de una noche, filtrar y mantener tapado en oscuridad (foto lábil).

*Solución de Citrato de Plomo:*

Citrato de plomo	0.18 g
NaOH 1,0 N	0,1 – 0,2 g
H <sub>2</sub> O (d) recién hervida durante 10 min	25 ml

Disolver con agitación.

Luego de una noche, centrifugar.

Se puede colocar una capa protectora de vaselina.

**Determinaciones bioquímicas para testosterona, estradiol y progesterona**

Las muestras de sangre se incubaron a 37 ° C durante 30 min en un baño de agua y se centrifugaron a 5.000 G durante 10 min y se eliminó el suero. Para la cuantificación de los niveles de testosterona se realizó el test de testosterona total, el cual fue previamente utilizado por Chaves y col. (2012). Es inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo de fase sólida que se ejecutó en un analizador de inmunoensayos Siemens \* Medical IMMULITE \* 1000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics). La cuantificación de los niveles séricos de E2 y PG se realizó mediante radioinmunoensayo (RIA). Se utilizaron los siguientes kits comerciales: RIA Estradiol (A21854; Immunotech s.r.o., Prague, Czech Republic) y RIA Progesterone (IM1188; Immunotech s.r.o., Prague, Czech Republic) de Beckman Coulter®, respectivamente. Estas pruebas fueron radioinmunoensayos competitivos para uso *in vitro*.

Las concentraciones séricas de testosterona fueron realizadas en machos adultos e inmaduros sexuales. En los adultos, durante los siguientes períodos: reproductivo (febrero-abril), regresión gonadal (julio) y recuperación gonadal (septiembre). En los ejemplares inmaduros durante el principio del otoño. En el caso de las hembras, las determinaciones de E2 y PG fueron realizadas en aquellas no preñadas y en las preñadas durante los diferentes estadios gestacionales.





# RESULTS

Shawn Thornton "Green Flame Hypnosis" 2017



## PARTE A: GENERALIDADES DE LA GLANDULA PINEAL

La glándula pineal de vizcacha, un órgano único, presentó un color ligeramente rosado, consistencia firme y aspecto glandular. Su forma fue elongada, ligeramente aplanada y en algunas ocasiones pudo apreciarse su tallo.

En un animal macho adulto, sus dimensiones promedio fueron: 3-4 mm de largo, 1-1,5 mm de ancho. Cuando fue posible extraer el tallo pineal, este pudo llegar a 1 mm de longitud. El peso promedio fue alrededor de 3 mg. En la hembra, tanto sus dimensiones, peso, forma y color fueron similares a las encontradas en el macho.

La pineal de vizcacha se ubicó entre las comisuras habenular y posterior, próxima a la cavidad del tercer ventrículo del cual se separó por una porción de tejido comisural. De este modo, debido a su forma y ubicación, la pineal de vizcacha pudo ser clasificada como “tipo AB” según Vollrath,

### Microscopía óptica

La glándula pineal de la vizcacha es un órgano de aspecto parenquimatoso y estroma conectivo reducido, el cual es representado por fibras colágenas. Presentó una forma característica ovoide, alargada, con un tallo que la conectó con la base del cerebro. La porción glandular más cercana al tallo fue redondeada y amplia, volviéndose más delgada y puntiaguda hacia su extremo distal resultando en una típica forma de piña. Estaba envuelta por una cápsula de tejido conectivo en donde se observó la presencia de fibras colágenas, fibroblastos, elementos piales y vasos sanguíneos. Desde la cápsula, se originaron septos o trabéculas que se introdujeron hacia el interior del parénquima pineal sin llegar a lobularlo (Fig. 9A). La glándula presentó una abundante vascularización. Estaba irrigada por pequeñas ramas arteriolas que penetraron en la cápsula por distintas regiones, algunas de los cuales ingresaron por el tallo pineal, y formaron una red capilar que se extendió por todo el parénquima. El drenaje vascular fue realizado por vénulas, que luego desembocaron en venas mayores.

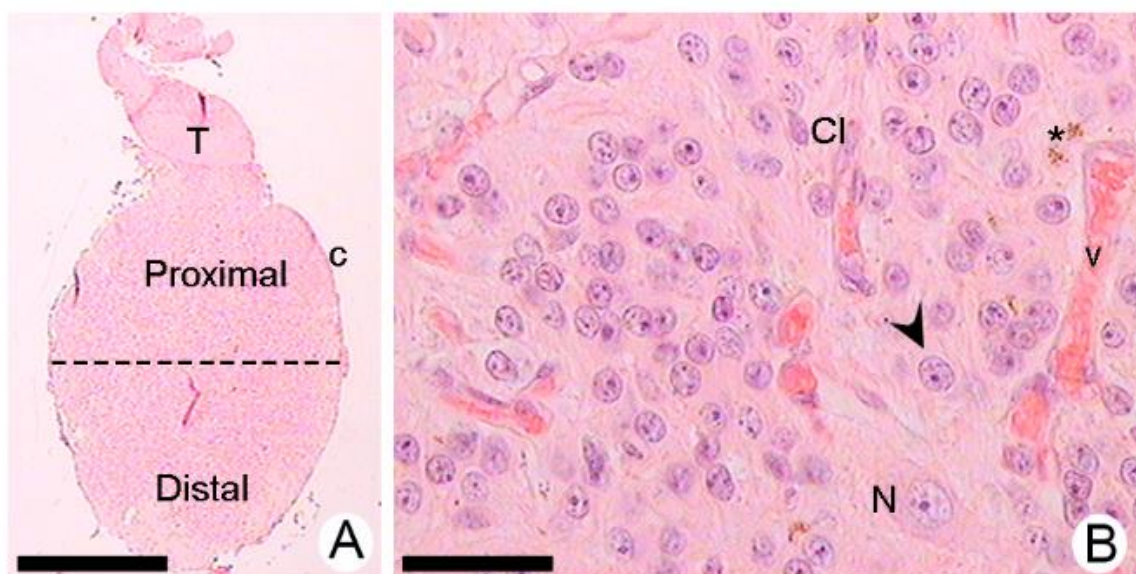


Figura 9: Glándula pineal de una vizcacha macho adulto durante el invierno. A) Imagen de una glándula pineal donde puede apreciarse su típica forma de piña, la presencia de un tallo (T), 2 regiones bien definidas (**Proximal y Distal.**), y una cápsula de tejido conectivo (c) que la envuelve. B) Micrografía que muestra los diferentes tipos celulares dentro del parénquima glandular. El pinealocito (**punta de flecha**) constituye la población predominante, mientras que la célula intersticial (CI), la minoría. Nótese la presencia de gránulos de pigmentos de color marrón claro (**asterisco**) en la proximidad a un vaso sanguíneo (v). Neurona (N). Coloración: Hematoxilina-Eosina. Escala de barras: A 250  $\mu$ m; B 25  $\mu$ m.

Se distinguieron 3 tipos celulares principales en la glándula mediante técnicas de coloración de rutina. La población celular predominante, estaba constituida por los *pinealocitos*, distinguibles por ser células grandes, de citoplasma ligeramente basófilo, que exhibieron un núcleo grande y redondeado, nucléolo evidente y cromatina laxa. Las *células intersticiales*, que constituyeron la población minoritaria, se distinguieron por su menor tamaño, núcleos alargados o triangulares y presencia de cromatina más condensada. Estos tipos celulares se distribuyeron homogéneamente dentro de la glándula, aunque las CI suelen encontrarse regionalizadas en el parénquima de la glándula. Estas células se concentraron principalmente en la región proximal, mientras que su ubicación en la región distal fue muy variable. El tercer tipo celular que se observó en la glándula pineal, estaba constituido por las *células pigmentadas*. Dichas células se encontraron con frecuencia en las glándulas pineales de vizcachas hembras, mientras que, en los machos, se observaron ocasionalmente. Se detectaron principalmente en las proximidades de los vasos sanguíneos, aunque se encontraron distribuidas en cualquier región glandular. Presentaron una forma ovoide o redondeada y exhibieron con la

coloración de H-E, un color marrón claro u oscuro. En cortes histológicos sin colorear, los gránulos también exhibieron diferentes tonalidades de marrón (Fig. 9B).

El estudio de las secciones semifinas coloreadas con azul de toluidina permitió un análisis más exhaustivo de las poblaciones celulares dentro de la glándula. La mayoría de las células del parénquima glandular presentaron un núcleo grande, redondo u oval con un nucléolo prominente y se las relacionó con la población I o pinealocitos tipo I. Algunos de estos pinealocitos presentaron poca densidad y se mostraban claros, mientras que otros de mayor densidad, se visualizaron oscuros al microscopio de luz. Por otra parte, algunas células exhibieron núcleos irregulares, de tamaños variables, con indentaciones y se los incluyó dentro la población II o pinealocitos tipo II. Las CI fueron escasas y se presentaron con un núcleo alargado, triangular y bien denso. Además, se observaron algunas CP y gránulos de pigmentos sueltos (Fig. 10).

La presencia de concreciones calcáreas o calcificaciones pineales en el parénquima glandular fue ocasional. Estas calcificaciones, generalmente se encontraron en animales grandes, robustos y con un cráneo duro. El aspecto fibroso del órgano se asoció a la presencia de estas calcificaciones, confirmado por el método de rojo de alizarina para calcio. La forma casi siempre fue irregular y su tamaño variable (Fig. 11A). En caso de ser pequeñas, no alteraban a las células vecinas, mientras que, si ocupaban gran parte del parénquima glandular, se observaron alteraciones en la organización y características histológicas de las células adyacentes (Fig. 11B-C).



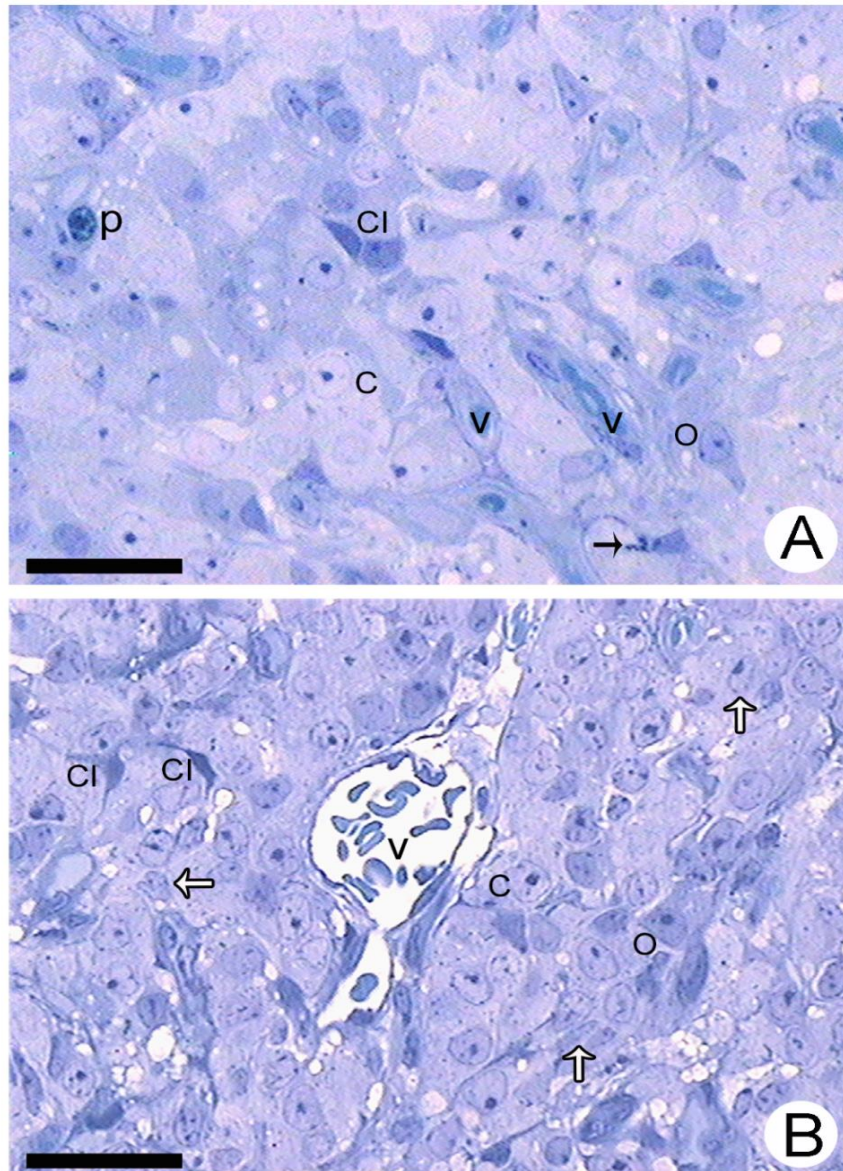


Figura 10: Secciones semifinas de la glándula pineal de vizcacha macho durante el verano. A) La imagen muestra abundantes pinealocitos y numerosos vasos sanguíneos (v). Los pinealocitos exhiben diferentes densidades y algunos se presentaron claros (C) y otros oscuros (O) al microscopio de luz. Las células intersticiales (CI) presentan un núcleo alargado, ligeramente triangular y de mayor densidad. Se localizan entre los pinealocitos y próximas a los espacios perivasculares. Célula pigmentada (p) y algunos gránulos de pigmentos (**flecha negra**). B) En la micrografía se observa un gran vaso sanguíneo central (v) el cual está rodeado por numerosos pinealocitos tipo I, entre los cuales destacan claros (C) y oscuros (O). Nótese la presencia de núcleos irregulares con indentaciones correspondientes a los pinealocitos tipo II (**flechas blancas**). Se exhiben algunas células intersticiales (CI) con núcleos tipo-estrellados y densos. Escala de barras: A y B 25  $\mu$ m.

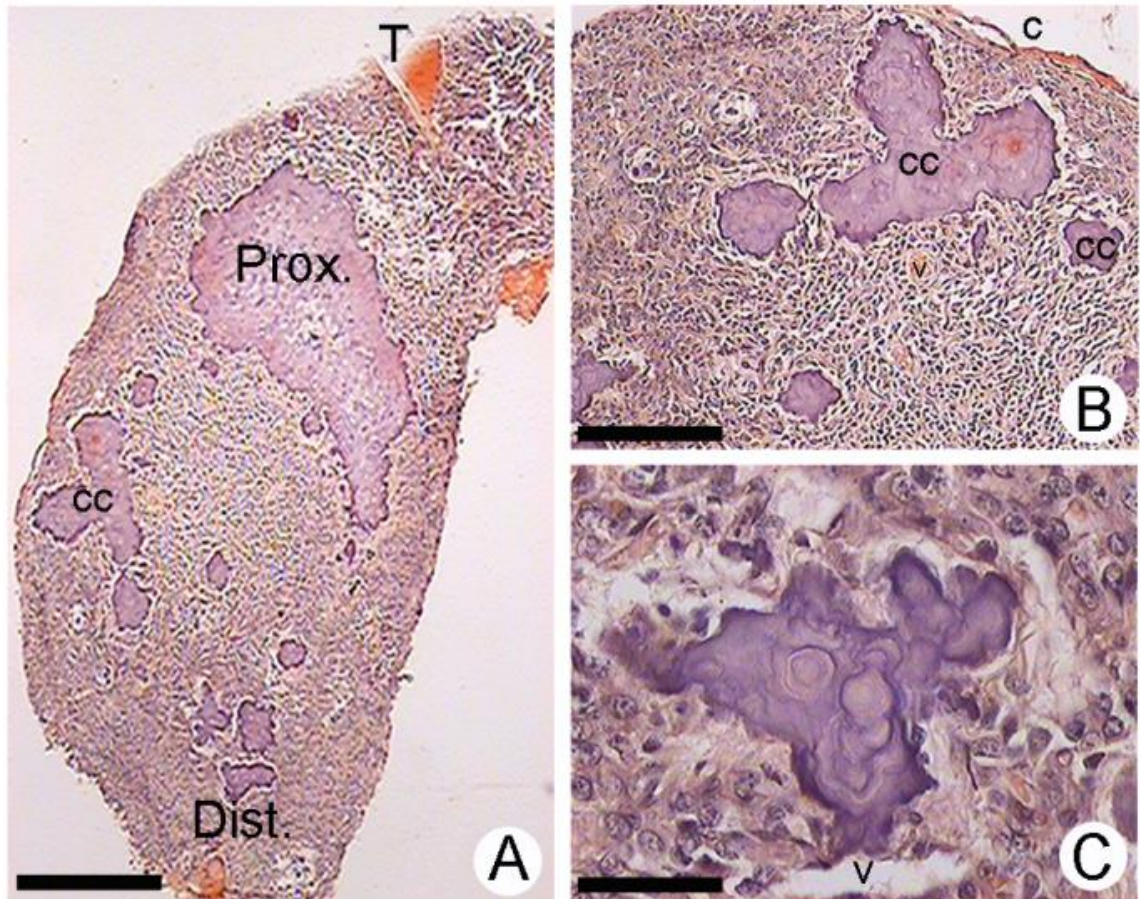


Figura 11: Concreciones calcáreas en pineal de vizcacha macho adulto. A) Imagen de una glándula pineal donde pueden apreciarse abundantes concreciones calcáreas (CC) de diferentes tamaños distribuidas tanto en la región proximal (**Prox.**) como en la distal (**Dist.**). B) Calcificación pineal de gran tamaño en la proximidad de la cápsula (**c**) que altera la organización celular vecina y calcificaciones de menor tamaño que no alteran su entorno. C) Calcificación de gran tamaño, en cercanía a un vaso sanguíneo (**v**), donde puede apreciarse una importante desorganización celular, con alteraciones muy marcadas en la organización celular y características histológicas. Tallo (**T**). Coloración: Rojo de Alizarina. Escala de barras: A 500  $\mu$ m; B 100  $\mu$ m; C 25  $\mu$ m.



### **Microscopía electrónica de transmisión**

Los diferentes tipos celulares identificados mediante microscopia de luz fueron estudiados con mayor detalle mediante MET. A nivel ultraestructural, la población predominante dentro del parénquima glandular estuvo constituida por los pinealocitos del tipo I (P1; Fig. 12). Diferencias en electrodensidad tanto en núcleo como en citoplasma fueron muy notorias entre los pinealocitos claros y oscuros. En ambos tipos celulares, el núcleo fue grande, redondeado u oval. La cromatina se presentó finamente dispersa en la matriz nuclear, con una ligera condensación en las proximidades de la envoltura nuclear y fue característica la presencia de un nucléolo. El citoplasma presentó procesos citoplasmáticos emergentes en su soma y fue frecuente la presencia de numerosas mitocondrias, cisternas dilatadas del retículo endoplásmico y un complejo de Golgi bien desarrollado (Fig. 13). Por otra parte, la población de pinealocitos tipo II (P2) se distribuyó en forma aleatoria y se diferenciaron de los P1 por la morfología de sus núcleos. Los mismos presentaron contorno irregular, electrodensos, con indentaciones y heterocromatina dispersa. Su citoplasma fue más reducido, aunque de manera similar a los P1 exhibieron varios procesos celulares. Se observaron numerosas mitocondrias, cisternas dilatadas del retículo endoplásmico, lisosomas de densidad electrónica variable, complejo de Golgi bien desarrollado y algunas partículas densas (Fig. 14).

El análisis ultraestructural de las CI y CP será descripto en las secciones correspondientes a cada uno de estos tipos celulares.

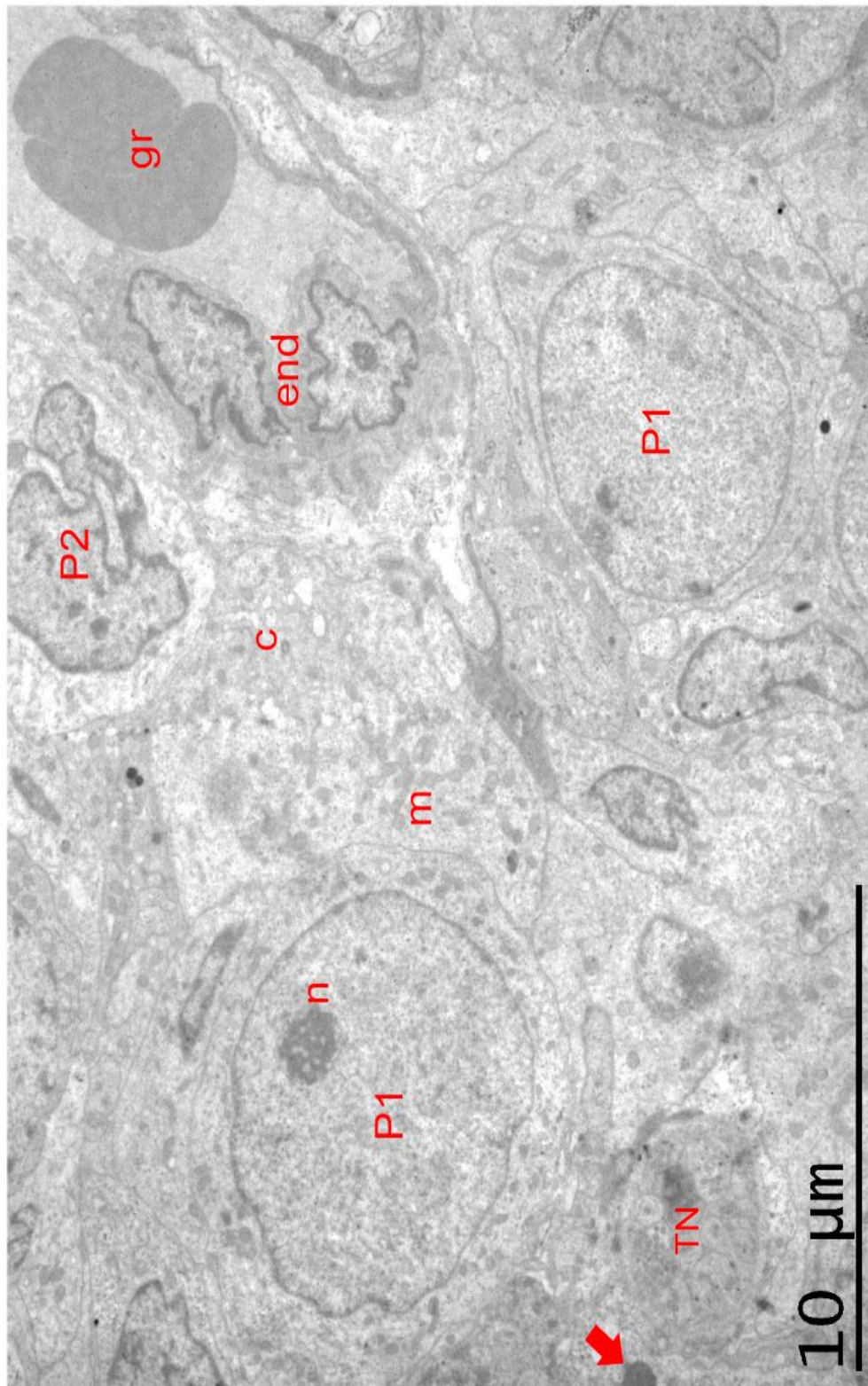


Figura 12: Ultraestructura del parénquima pineal de una vizcacha macho durante el invierno. La micrografía a bajo aumento, nos muestra la organización general de la glándula. Los pinealocitos o células de tipo I (**P1**) constituyen la principal población celular y su densidad electrónica puede ser variable. Poseen grandes núcleos redondos u ovales bien definidos, la cromatina se presenta laxa con una ligera condensación en las proximidades de la envoltura nuclear y es característica la presencia de un nucléolo (**n**). En su citoplasma se encuentran numerosas mitocondrias (**m**) y cisternas dilatadas (**c**). Los pinealocitos o células tipo II (**P2**) son más pequeños y tienen un núcleo más electrodens, contorno irregular, indentaciones y cromatina dispersa. Los vasos sanguíneos y los terminales nerviosos (**TN**) en la proximidad a estas células es característica. Glóbulo Rojo (**gr**), células endoteliales (**end**), inclusiones lipídicas (**flecha roja**). Magnificación 4000X. Escala de barra: 10  $\mu$ m.

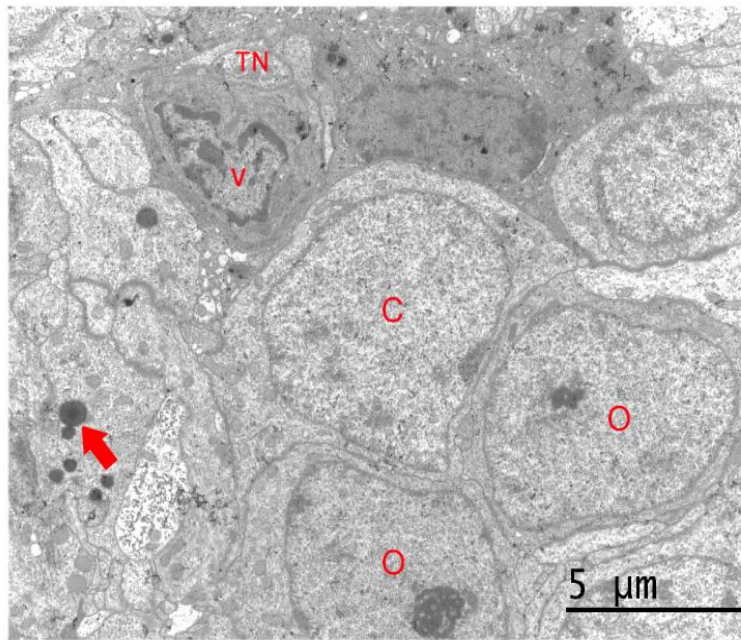
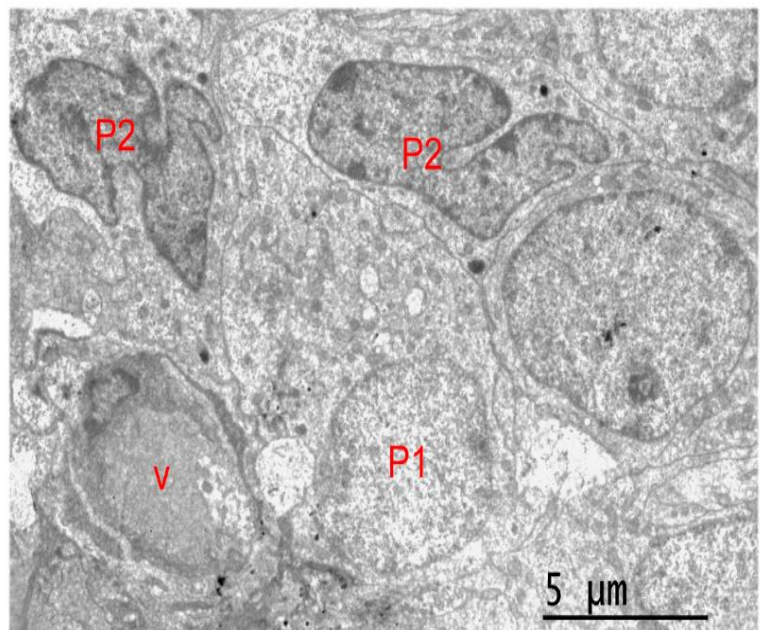


Figura 13: Pinealocitos tipo I con diferentes densidades electrónicas. Los de menor densidad se observaron claros (C) y los de mayor densidad oscuros (O). Se aprecia la íntima relación entre ellos y la presencia de un vaso sanguíneo (v) en la proximidad. Terminal nervioso (TN); inclusiones lipídicas (flecha roja). Magnificación 7000X. Escala de barra: 5 μm.

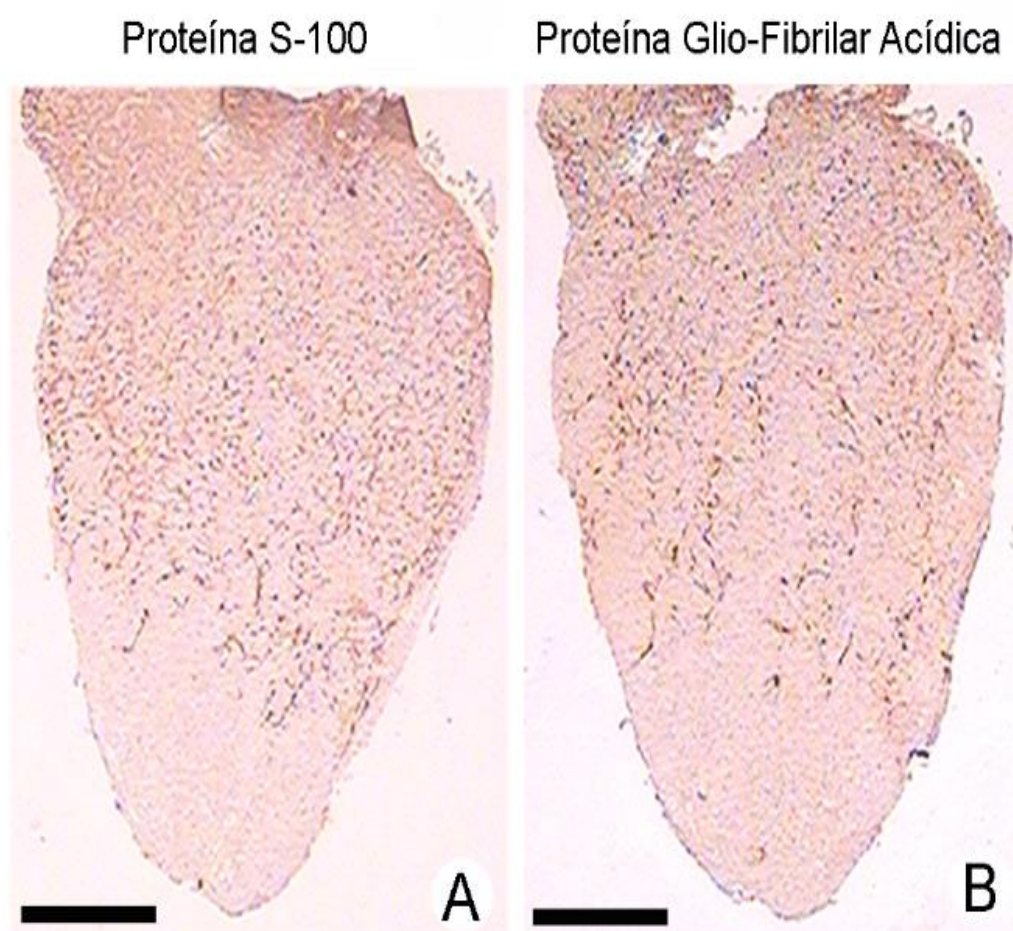
Figura 14: Diferentes tipos de pinealocitos. La micrografía muestra pinealocitos tipo I (P1), en estrecha relación con pinealocitos de tipo II (P2). Nótese el incremento de electro-densidad en el núcleo el contorno irregular y las indentaciones que presentan los P2. La cromatina es dispersa y gruesa, mientras que el citoplasma es escaso en organelas. Se ubican en cercanía a los vasos sanguíneos (v). Magnificación 7000X. Escala de barra: 5 μm.





**PARTE B: CELULAS INTERSTICIALES DE LA GLANDULA PINEAL****Estudio inmunohistoquímico estacional de las células intersticiales en vizcachas machos adultos**

El estudio inmunohistoquímico para las proteínas S-100 y GFAP reveló que la CI en las vizcachas machos se localizaban principalmente en la región proximal, y que en la región distal su presencia fue escasa, llegando a estar ausente en algunos campos microscópicos (Fig. 15). No se detectó la expresión de estas proteínas en pinealocitos, CP o células endoteliales de los vasos.



*Figura 15: Inmunomarcación en glándula pineal de vizcacha macho adulto para las proteínas S-100 (A) y GFAP (B) respectivamente durante los meses invernales. Escala de barras: A y B 250  $\mu$ m.*

El estudio inmunohistoquímico estacional para la proteína S-100 mostró un patrón de inmunomarcación tanto nuclear como citoplasmático. Las CI exhibieron una forma ligeramente estrellada, un cuerpo celular irregular con abundantes procesos

citoplasmáticos, los cuales rodean a los pinealocitos individualmente o en pequeños grupos, y algunos de ellos alcanzaron los vasos sanguíneos (Fig. 16). La inmunomarcación para GFAP se detectó solo en el citoplasma de las CI, alrededor del núcleo y en los procesos citoplasmáticos, los cuales se detectaron más finos y delicados, en contraste con aquellos marcados con proteína S-100 (Fig. 17).

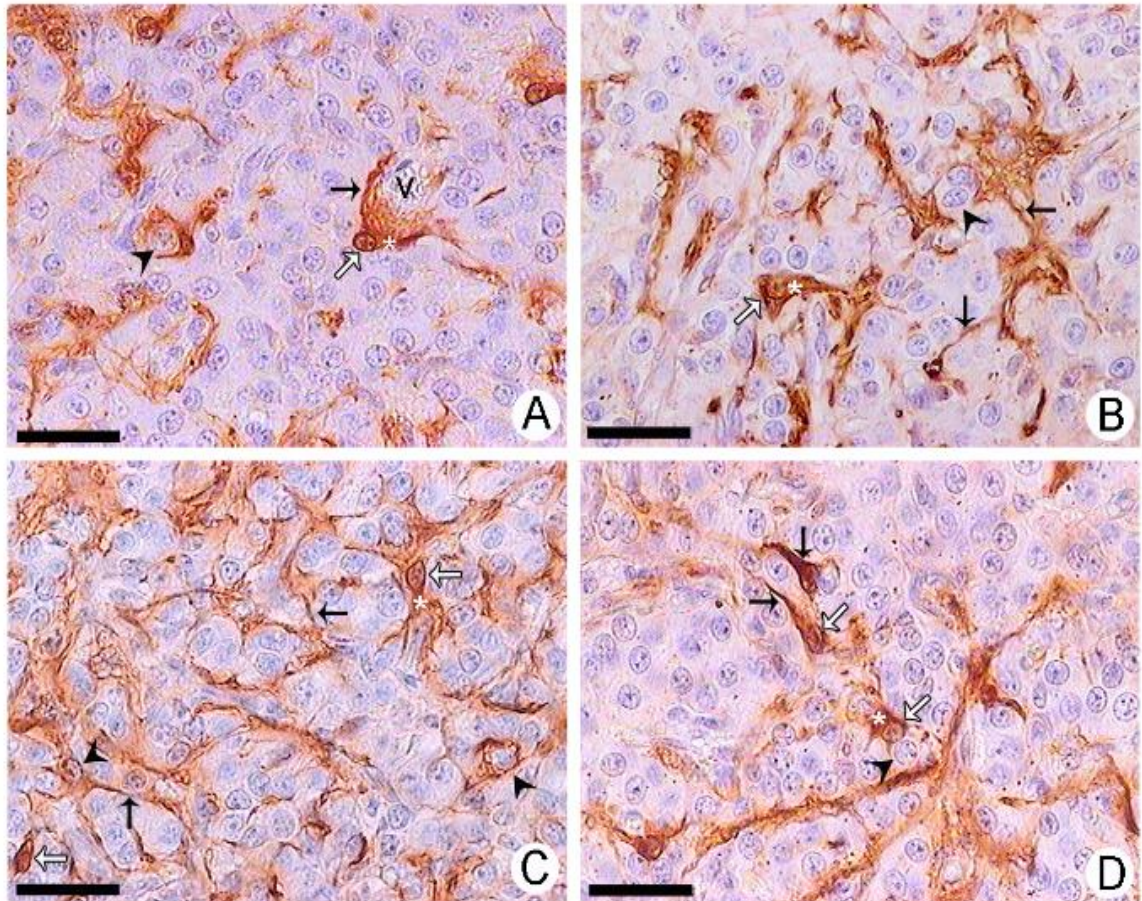


Figura 16: Inmunomarcación estacional para la proteína S-100 en ejemplares machos adultos. La imagen revela que proteína S-100 se expresa tanto en el núcleo (**flechas blancas**), en el citoplasma perinuclear (**asterisco**) y en las proyecciones citoplasmáticas (**flechas negras**) de las CI en todas las estaciones analizadas (A verano; B otoño; C invierno; y D primavera). Puede apreciarse una estrecha relación entre las proyecciones citoplasmáticas de las CI, las cuales pueden rodear a los pinealocitos (**cabezas de flecha**) o grupos de pinealocitos, como también a los vasos sanguíneos (**v**). Un incremento significativo de inmunomarcación para esta proteína, se observa en invierno. Escala de barras: A, B, C, D 25  $\mu$ m.



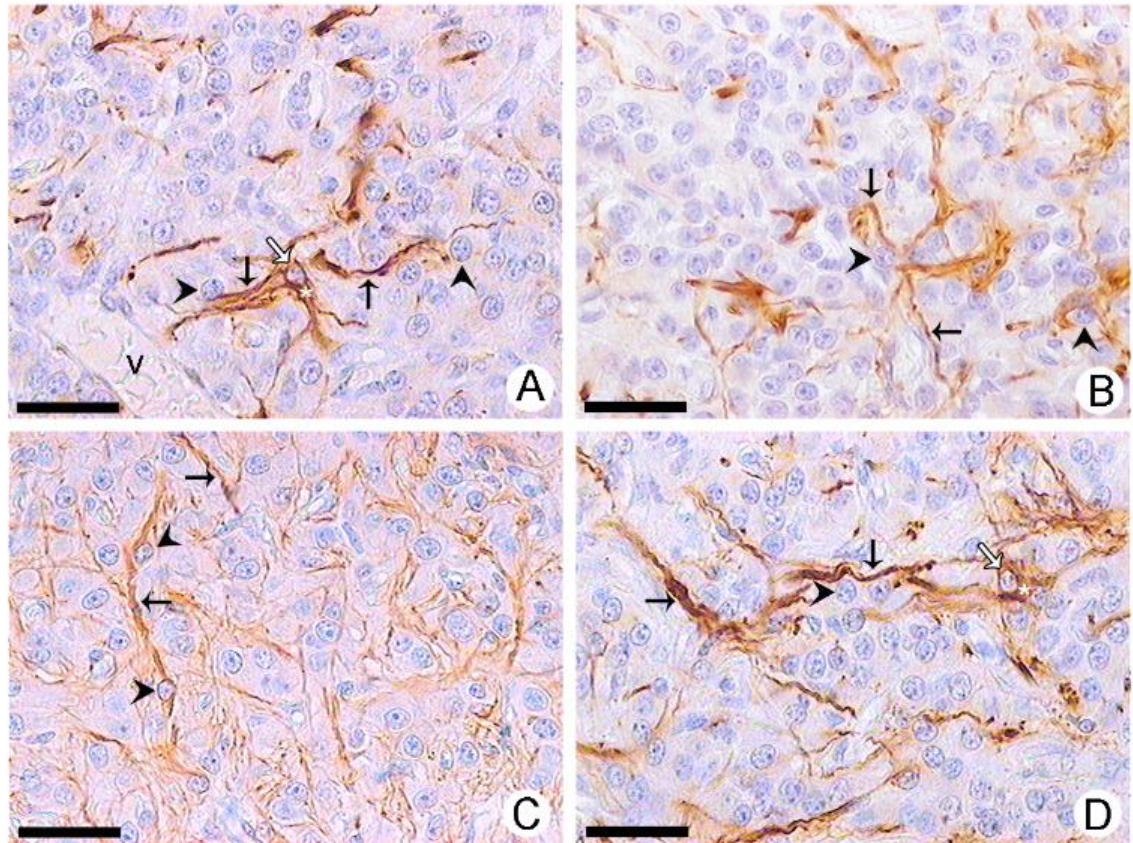


Figura 17: Inmunomarcación estacional para la proteína GFAP en ejemplares machos adultos. El estudio inmunohistoquímico estacional para GFAP, demuestra que esta proteína se expresa en el citoplasma perinuclear (**asterisco**) y en las proyecciones citoplasmáticas de las CI (**flechas negras**), mientras que el núcleo (**n**), se presenta inmunonegativo (**flechas blancas**) en todas las estaciones analizadas (A verano; B otoño; C invierno; y D primavera). En GFAP, al igual que S-100, se observa una mayor inmunomarcación para esta proteína durante el invierno. Pinealocitos (**cabezas de flecha**); vasos sanguíneos (**v**). Escala de barras: A, B, C, D 25 µm.

La técnica de doble inmunohistoquímica (doble-IHQ) reveló que algunas CI expresaron colocalización para ambas proteínas (S-100 y GFAP), mientras que otras expresaron exclusivamente solo una de ellas (Fig. 18). El análisis cualitativo de vimentina mostró un patrón de expresión constante en ambas regiones pineales. Esto se debió a que la proteína no solo fue positiva en los procesos citoplasmáticos de algunas CI, sino que también se observó en las células endoteliales y los espacios perivasculares (Fig. 19).

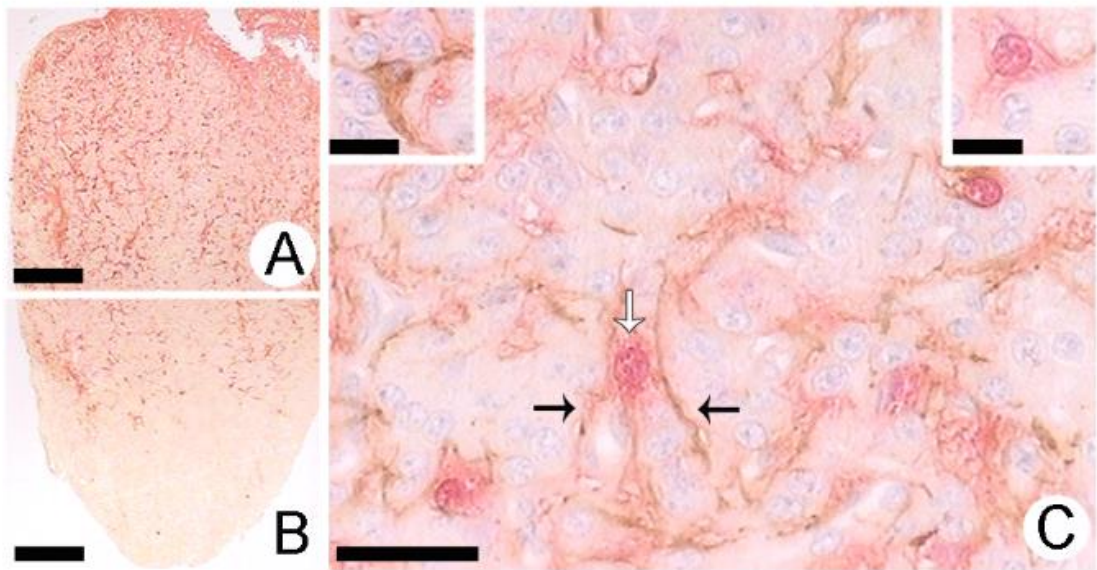


Figura 18: Doble inmunomarcación para las proteínas S-100 y GFAP en vizcachas machos adultos durante el invierno. A y B) Las imágenes corresponden a las regiones proximal y distal, respectivamente. Nótese la abundante inmunomarcación en la región proximal y como disminuye hacia la región distal; C) La micrografía muestra núcleos coloreados en fucsia para la proteína S-100 (**flecha blanca**), mientras que las prolongaciones citoplasmáticas lo hacen de color marrón para GFAP (**flechas negras**). Algunas CI expresaron colocalización para ambas proteínas, mientras que otras expresaron exclusivamente solo una de ellas. El inset superior izquierdo muestra solo inmunopositividad para GFAP, mientras que el derecho para S-100. Escala de barras: A y B 125 µm; C 25 µm. Escala de barras de los Insertos: 12.5 µm.

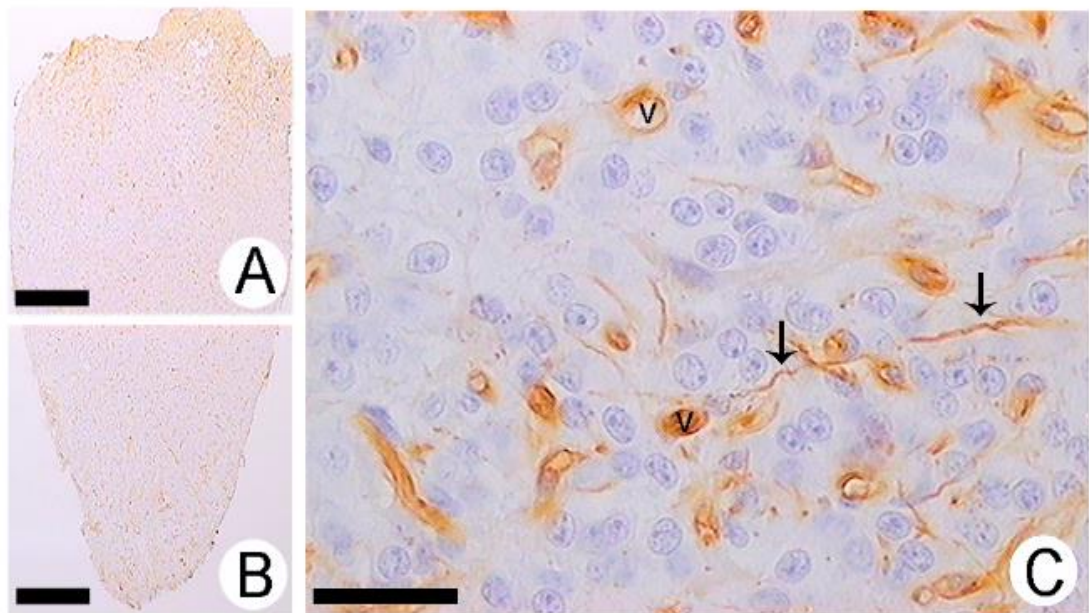


Figura 19: Inmunomarcación para vimentina en glándula pineal de vizcacha adulta en verano. A y B) Vimentina está presente tanto en la región proximal (A) como en la distal (B); C) Las prolongaciones citoplasmáticas se colorean de marrón para vimentina y pocas CI muestran inmunotinción (**flechas negras**). El inmunomarcado para esta proteína puede apreciarse en numerosos vasos sanguíneos (v). Escala de barras: A y B 125 µm; C 25 µm.



### **Estudio morfométrico estacional y recuento de células intersticiales con núcleo S-100 positivo**

El análisis morfométrico reveló que el %AI-S-100 en la región proximal fue más alto en los animales capturados en invierno en comparación con los capturados en verano. El %AI-GFAP en la región proximal fue mayor en los animales capturados en invierno en relación con los capturados en primavera y verano. En la región distal, el % AI-S-100 fue menor en los animales capturados en verano y otoño con respecto a los capturados en invierno. Por el contrario, el %AI-GFAP fue menor en los animales capturados en primavera en comparación con los capturados en otoño e invierno (Tabla 2).

En relación al %CI-S-100, no se observaron diferencias significativas en la región proximal en los animales adultos estudiados (verano:  $2,59 \pm 0,22$ ; otoño:  $3,09 \pm 0,30$ ; invierno  $3,31 \pm 0,20$  y primavera:  $2,84 \pm 0,24$ ). En la región distal, se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) entre los valores de verano e invierno (verano:  $1,07 \pm 0,13$ ; otoño:  $1,23 \pm 0,25$ ; invierno  $1,67 \pm 0,06$  y primavera:  $1,37 \pm 0,23$ ).

**Tabla 2: Estudio morfométrico estacional de la proteína S-100 y GFAP**

PARAMETROS		VERANO	OTOÑO	INVIERNO	PRIMAVERA
%AI S-100	PROXIMAL	$3,44 \pm 0,40$	$4,49 \pm 0,38$	$5,49 \pm 0,12^a$	$4,41 \pm 0,36$
	DISTAL	$1,45 \pm 0,33$	$1,63 \pm 0,32$	$2,75 \pm 0,44^b$	$2,01 \pm 0,10$
%AI GFAP	PROXIMAL	$2,80 \pm 0,14$	$4,01 \pm 0,40$	$4,94 \pm 0,22^c$	$4,19 \pm 0,33^d$
	DISTAL	$1,33 \pm 0,14$	$1,39 \pm 0,24$	$2,00 \pm 0,54$	$0,75 \pm 0,06^e$

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  ESM (n=4).

Estudio Estacional: %AI S-100: <sup>a</sup>  $p < 0,01$  invierno vs. verano; <sup>b</sup>  $p < 0,01$  invierno vs. verano y otoño. %AI GFAP: <sup>c</sup>  $p < 0,01$  invierno vs. verano; <sup>d</sup>  $p < 0,01$  primavera vs. verano; <sup>e</sup>  $p < 0,01$  primavera vs. otoño e invierno. Las diferencias significativas en el estudio morfométrico se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Además, la comparación entre regiones (proximal vs. distal) para cada estación se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney. En cada estación, los %AI-S-100, %AI-



GFAP y el %CI-S-100 fueron significativamente diferentes ( $p<0,01$ ) entre ambas regiones pineales.

### **Niveles de testosterona sérica en vizcachas machos adultos**

Los valores séricos obtenidos en ejemplares adultos durante los 3 períodos estudiados fueron los siguientes:

- ❖ Período reproductivo:  $4,24 \pm 4,47$  ng/ml.
- ❖ Período de regresión gonadal:  $1,27 \pm 0,1$  ng/ml.
- ❖ Período de recuperación gonadal:  $5,92 \pm 0,59$  ng/ml.

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  ESM ( $n=4$ ). Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

En el período reproductivo los valores séricos de testosterona fueron significativamente superiores a los reportados durante el período de regresión gonadal ( $p<0,01$ ). Durante la regresión gonadal, los valores séricos de testosterona exhibieron los valores más bajos, mientras que durante el período de recuperación gonadal fueron los más altos, con diferencias significativas ( $p<0,001$ ) entre ellos. No se observaron diferencias significativas entre el período de recuperación y el reproductivo.

### **Estudio relacionado con la edad**

La organización y morfología de la glándula pineal en vizcachas machos inmaduras sexualmente fueron similares a las de los machos adultos. Las CI exhibieron inmunomarcación de todas las proteínas analizadas. La inmunotinción para las proteínas S-100 y GFAP demostró que estas células presentaban la forma estrellada típica, numerosos procesos citoplasmáticos cortos que rodeaban a los pinealocitos y alcanzaban los vasos sanguíneos. Pocas CI exhibieron colocalización para la proteína S-100 y GFAP, mientras que otras presentaron solo inmunomarcación para una de ellas. Cualitativamente, se observaron algunas CI inmunopositivas para vimentina, junto a células endoteliales y numerosos vasos sanguíneos (Fig. 20).

En machos inmaduros, para ambas regiones pineales, los parámetros morfométricos (%AI-S-100 y %AI-GFAP) fueron menores que en las vizcachas adultas. En la región proximal, el %AI-S-100 ( $2,96 \pm 0,06$ ) fue significativamente menor ( $p<0,01$ ) en relación

con los valores adultos encontrados en otoño, invierno y primavera. Del mismo modo, el %AI-GFAP en la región proximal ( $2,39 \pm 0,14$ ) fue significativamente menor ( $p<0,01$ ) en comparación con los valores adultos obtenidos en otoño, invierno y primavera. En la región distal, el %AI-S-100 ( $0,92 \pm 0,07$ ) disminuyó significativamente ( $p<0,01$ ) con respecto a los valores de invierno y primavera. El %AI-GFAP ( $0,59 \pm 0,08$ ) presentó diferencias significativas ( $p<0,01$ ) de acuerdo a los valores adultos encontrados en verano, otoño e invierno.

El %CI-S-100 en vizcachas inmaduras sexualmente fue significativamente menor ( $p<0,01$ ) en la región proximal en comparación con todos los animales adultos ( $1,50 \pm 0,09$ ). Por el contrario en la región distal, el %CI S-100 fue significativamente menor ( $p<0,01$ ) con respecto al valor adulto de invierno ( $0,81 \pm 0,04$ ).

El %AI-S-100, el %AI-GFAP y el %CI-S-100 en vizcachas inmaduras sexualmente, fueron significativamente diferentes ( $p<0,01$ ) entre las regiones proximal y distal.

La concentración sérica de testosterona en animales inmaduros sexuales fue de  $1,56 \pm 0,18$  ng/ml, ligeramente superior a la reportada en los machos adultos en el período de regresión gonadal aunque sin diferencia significativa. Por el contrario, diferencias significativas en los niveles de testosterona sérica fueron observadas entre estos animales y los adultos durante el período reproductivo y de recuperación gonadal ( $p<0.001$ ).

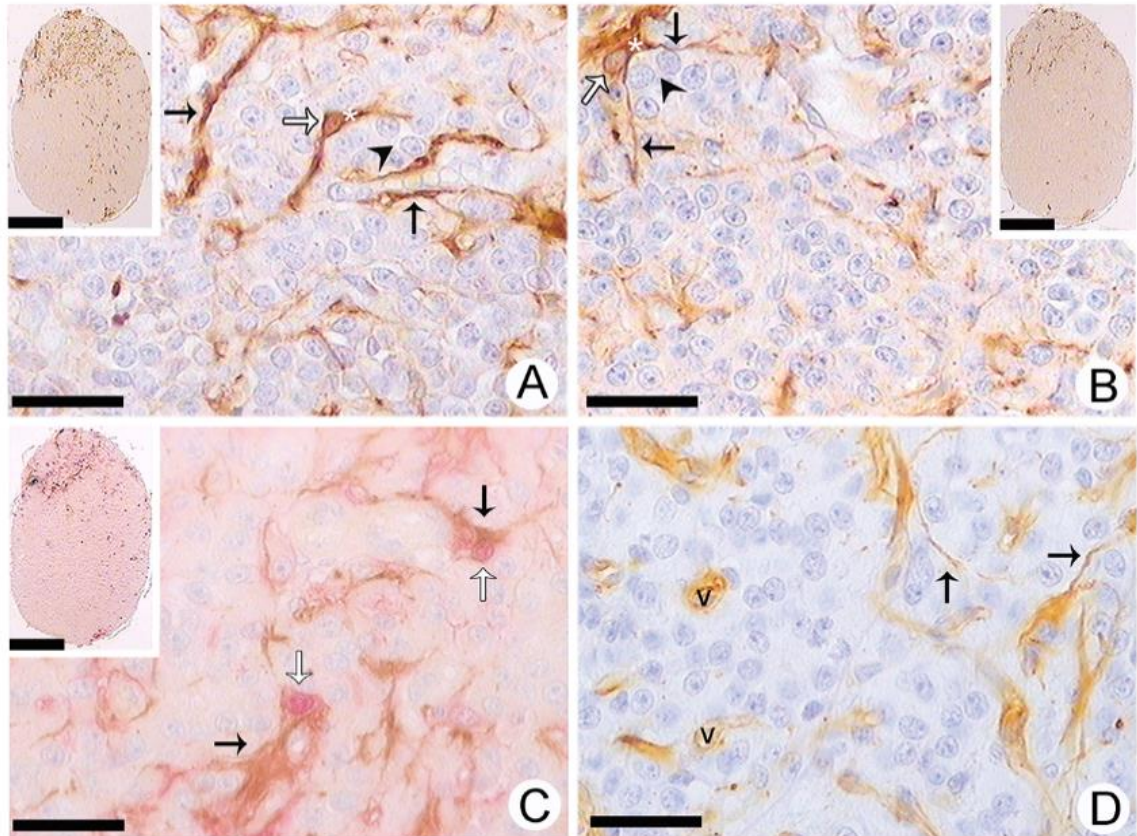


Figura 20: Inmunohistoquímica para las diferentes proteínas analizadas en CI de vizcachas machos inmaduros sexualmente. A) La proteína S-100 se expresa tanto en el núcleo (**flecha blanca**), en el citoplasma perinuclear (**asterisco**) y en las proyecciones citoplasmáticas (**flechas negras**); B) GFAP se expresa en el citoplasma perinuclear (**asterisco**) y en las proyecciones de las CI (**flechas negras**), mientras que el núcleo (**n**), se presenta inmunonegativo (**flechas blanca**); Tanto para A) como para B), se muestra una estrecha interacción entre los procesos citoplasmáticos y los pinealocitos (**punta de flecha**) y se observa una disminución significativa de la inmunopositividad para ambas proteínas; C) En algunas CI se puede apreciar colocalización para la proteína S-100 (**flechas blancas**) y GFAP (**flechas negras**). Otras expresaron solo una de estas proteínas; D) La imagen nos muestra procesos citoplasmáticos inmunomarcados para vimentina (**flechas negras**). Muchos vasos sanguíneos (**v**) también exhiben esta proteína. Escala de barras: A, B C y D 25  $\mu\text{m}$ . Escala de barra de Inset: 250  $\mu\text{m}$ .

**Estudio inmunohistoquímico de las células intersticiales en vizcachas hembras**

En las vizcachas hembras, la inmunotinción para las proteínas S-100 y GFAP reveló una abundante expresión de las mismas en las CI de la región proximal, mientras que en la región distal la expresión de estas proteínas varió significativamente en relación con la etapa de gestación. No se detectaron las expresiones de estas proteínas en pinealocitos, CP o células endoteliales de los vasos. Al igual que en los machos, la proteína S-100 se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma de las CI. Exhibieron una forma estrellada con un cuerpo celular irregular y abundantes procesos citoplasmáticos. Estos procesos fueron grandes, gruesos e irregulares y varios de ellos rodeaban a los pinealocitos individualmente o en pequeños grupos, mientras que otros alcanzan los vasos sanguíneos. Por otro lado, la inmunomarcación para GFAP se expresó solo en el citoplasma, espacio perinuclear y en los procesos citoplasmáticos. Similar a lo encontrado en machos, estos procesos fueron más pequeños, delgados y delicados respecto de aquellos inmunopositivos para la proteína S-100.

En vizcachas no preñadas, la expresión de las proteínas S-100 y GFAP fue abundante en la región proximal, mientras que en la región distal fue muy escasa. En la preñez inicial, la expresión de estas proteínas se encontró principalmente en la región proximal, pero la región distal mostró un aumento significativo en la expresión de ambas proteínas en relación a las hembras no grávidas. Las vizcachas que se encontraban en preñez media, exhibieron tanto en la región proximal como en la distal, el patrón de inmunopositividad más elevado para las proteínas analizadas. En la preñez final, la inmunomarcación para las proteínas S-100 y GFAP se concentró principalmente en la región proximal, como en resto de los estadios de preñez. Sin embargo, en la región distal, la expresión de estas proteínas fue menor respecto a la encontrada en la preñez media pero mayor a la observada en la preñez inicial (Fig. 21 a 24).

Durante el análisis del %CI-S-100, se observaron diferencias significativas en la región proximal entre hembras no grávidas y de preñez inicial, al comparar ambos grupos con aquellas de preñez media (no preñadas:  $3,10 \pm 0,13$ ; preñez inicial:  $3,25 \pm 0,15$ ; preñez media:  $3,92 \pm 0,09$  y preñez final:  $3,43 \pm 0,14$ ). En la región distal, se encontró una diferencia significativa entre las vizcachas no preñadas y las de preñez media (no preñadas,  $0,71 \pm 0,16$ ; preñez inicial:  $1,70 \pm 0,23$ ; preñez media,  $2,67 \pm 0,25$  y preñez final:  $1,84 \pm 0,24$ ).

Los parámetros morfométricos analizados (% AI-S-100, % AI-GFAP y %CI-S-100) variaron de acuerdo a la etapa de preñez en la que se encontraba el animal. En la preñez media, tanto el % AI-S-100, % IA-GFAP y el N° IC-S-100 expresaron los valores más altos en relación a las otras etapas de la preñez, mientras que las hembras no grávidas, exhibieron los valores más bajos para todos los parámetros analizados (Tabla 3).

La técnica de doble-IHQ reveló que algunas CI expresaron colocalización para ambas proteínas. La proteína S-100 se observó principalmente en el núcleo, mientras que la GFAP se exhibió en los procesos citoplasmáticos. Otras CI expresaron exclusivamente solo una de ellas. Se observó que vimentina marcaba los procesos citoplasmáticos de algunas CI, al igual que se exhibió en células endoteliales y espacios perivasculares (Fig. 25).



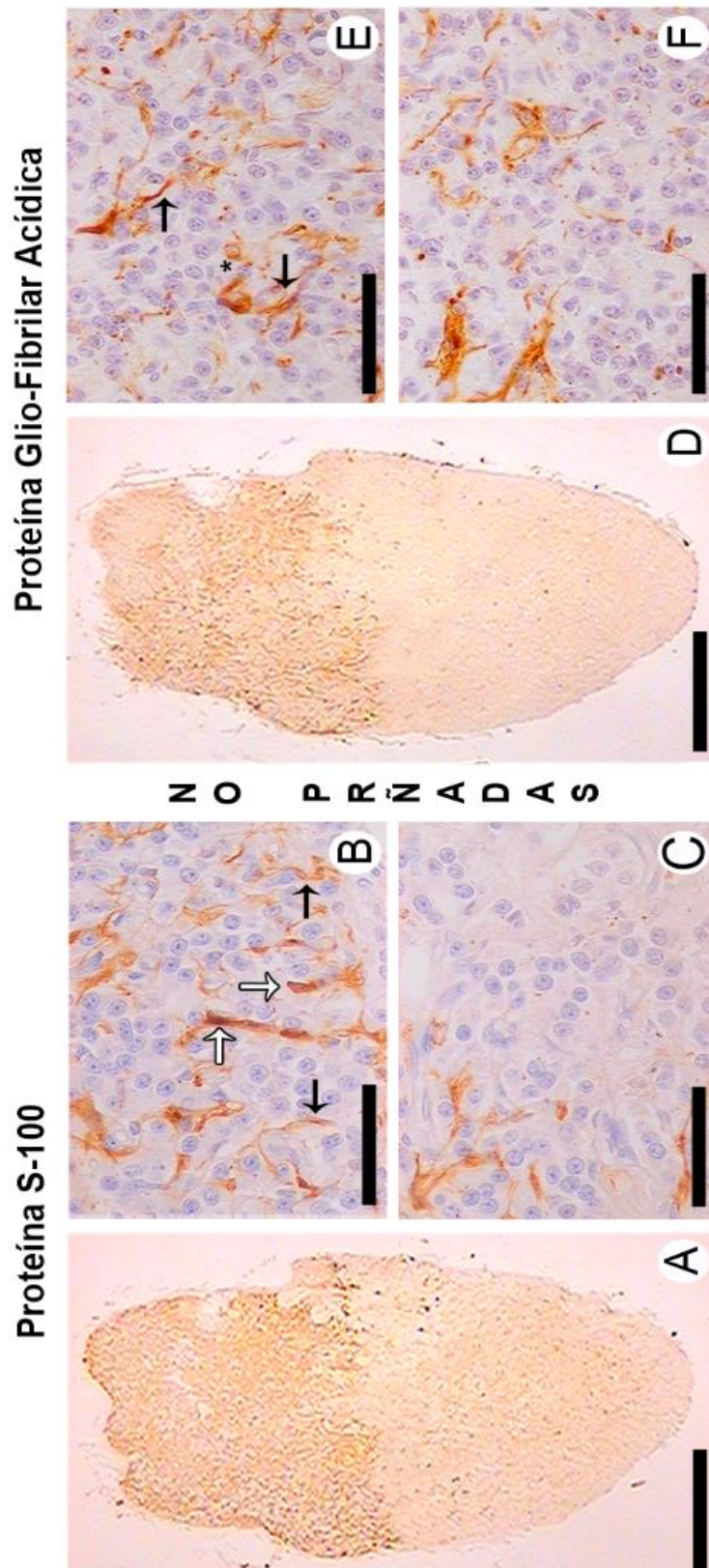


Figura 21: Secciones inmunopositivas para las proteínas S-100 (A-C) y GFAP (D-F) en vizcachas no preñadas. En el caso de la proteína S-100, la inmunotinción se observa en el núcleo (**flechas blancas**) y en proyecciones citoplasmáticas (**flechas negras**). Para GFAP solo se observa inmunomarcación en las proyecciones citoplasmáticas (**flechas negras**) y en los espacios peri-nucleares (**asterisco**). En vizcachas no preñadas, las proteínas analizadas se encuentran en la región proximal, mientras que en la región distal son escasas o están ausentes. Puede apreciarse una estrecha relación entre las proyecciones citoplasmáticas de las CI y los pinealocitos, las cuales pueden rodearlos individualmente o en grupos, como también pueden llegar a los vasos sanguíneos. Imágenes: A y D (**no preñadas**); B y E (**región proximal**); C y F (**región distal**). Escala de barras: A y D 500  $\mu$ m; B, C y E y F 25  $\mu$ m.

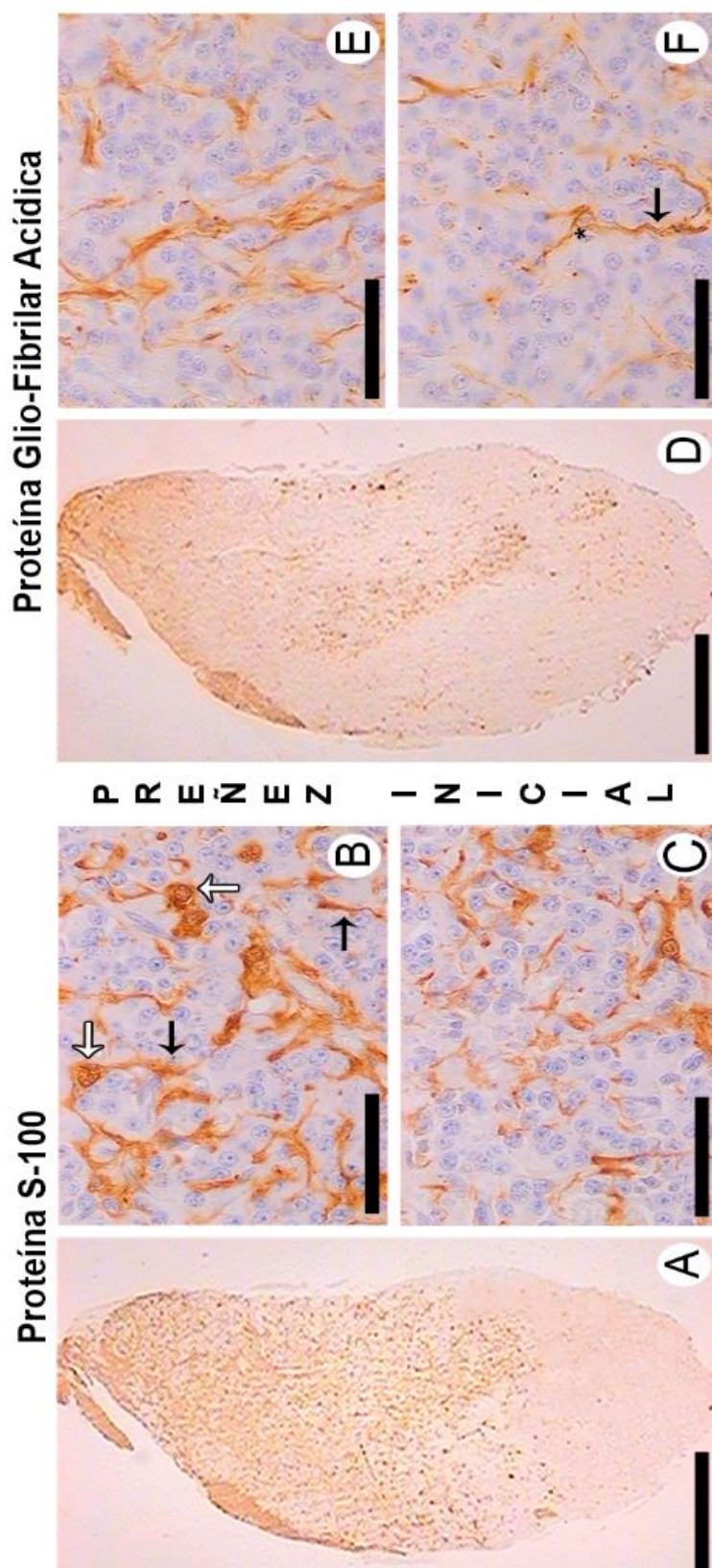


Figura 22: Secciones inmunopositivas para las proteínas S-100 (A-C) y GFAP (D-F) en vizcachas de preñez inicial. La proteína S-100 se observa en el núcleo (*flechas blancas*) y en proyecciones citoplasmáticas (*flechas negras*). GFAP solo se observa inmunomarcación en las proyecciones citoplasmáticas (*flechas negras*) y en los espacios peri-nucleares (*asterisco*). Durante la preñez inicial las proteínas se exhiben mayormente en la región proximal, pero la región distal mostró un aumento de inmunotinción respecto a las no preñadas. Imágenes: A y D (*preñez inicial*); B y E (*región proximal*); C y F (*región distal*). Escala de barras: A y D 500  $\mu$ m; B, C E y F 25  $\mu$ m.



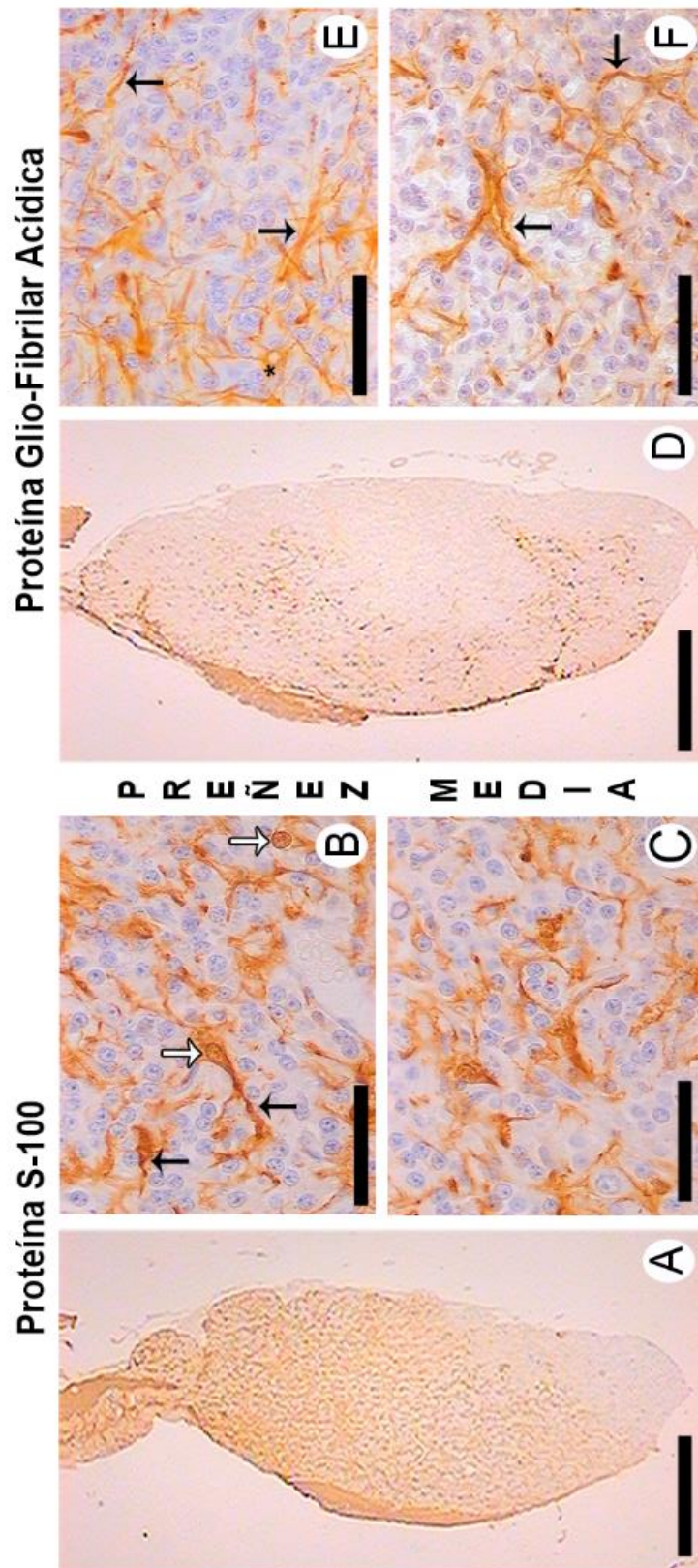


Figura 23: Secciones inmunopositivas para las proteínas S-100 (A-C) y GFAP (D-F) en vizcachas de preñez media. La proteína S-100 se muestra ampliamente distribuida tanto en la región proximal como en la distal en hembras de preñez media. mientras que las de preñez final los procesos citoplasmáticos disminuyen en la región distal. GFAP varió su expresión en ambas regiones pineales siguiendo el mismo patrón que S-100, pero las áreas cubiertas fueron más pequeñas. Imágenes: A y D (preñez media); B y E (región proximal); C y F (región distal). Escala de barras: A y D 500  $\mu$ m; B, C, E y F 25  $\mu$ m.

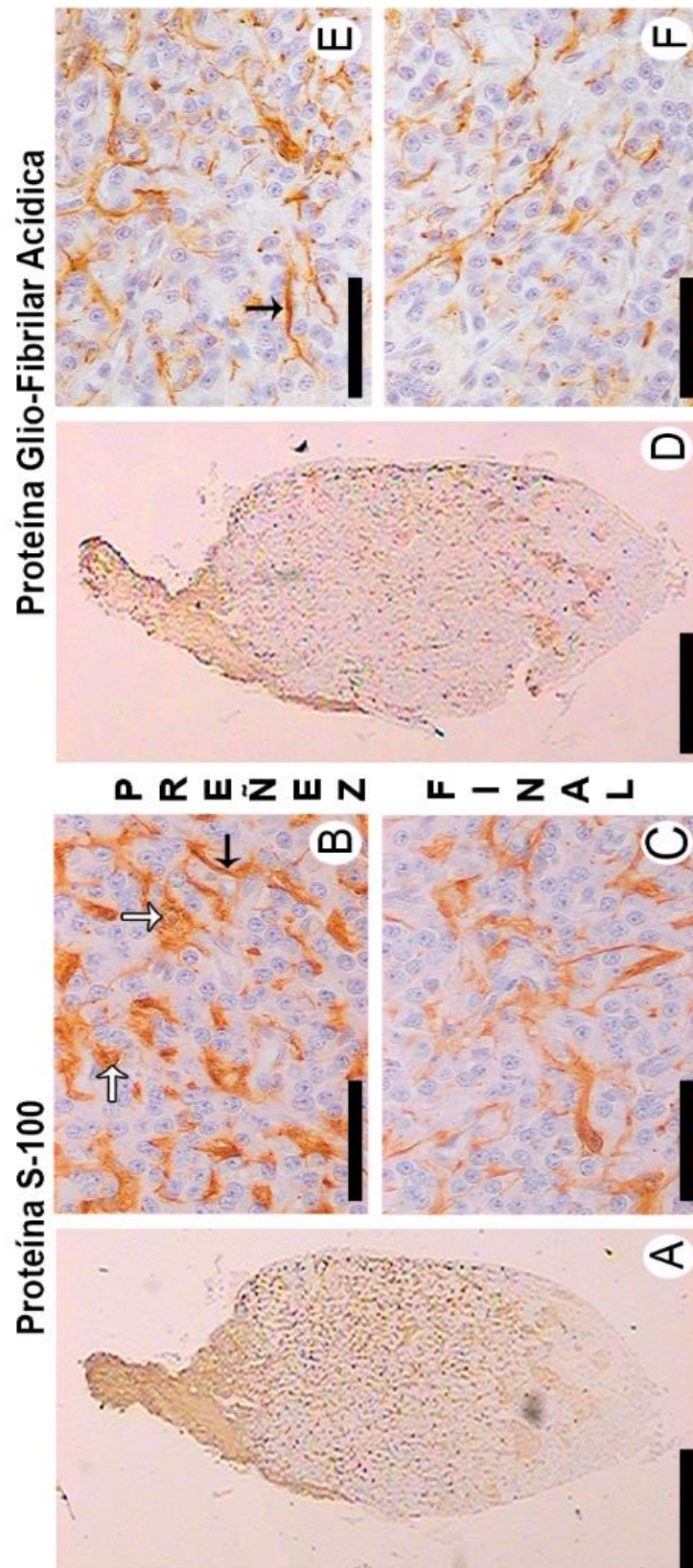


Figura 24: Secciones inmunopositivas para las proteínas S-100 (A-C) y GFAP (D-F) en vizcachas de preñez final. La proteína S-100 se muestra ampliamente distribuida en la región proximal pero los procesos citoplasmáticos disminuyen en la región distal respecto a la preñez media. GFAP varió su expresión en ambas regiones pineales siguiendo el mismo patrón que S-100, pero las áreas cubiertas fueron más pequeñas. Imágenes: A y D (preñez final); B y E (región proximal); C y F (región distal). Escala de barras: A y D 500  $\mu$ m; B, C, E y F 25  $\mu$ m.



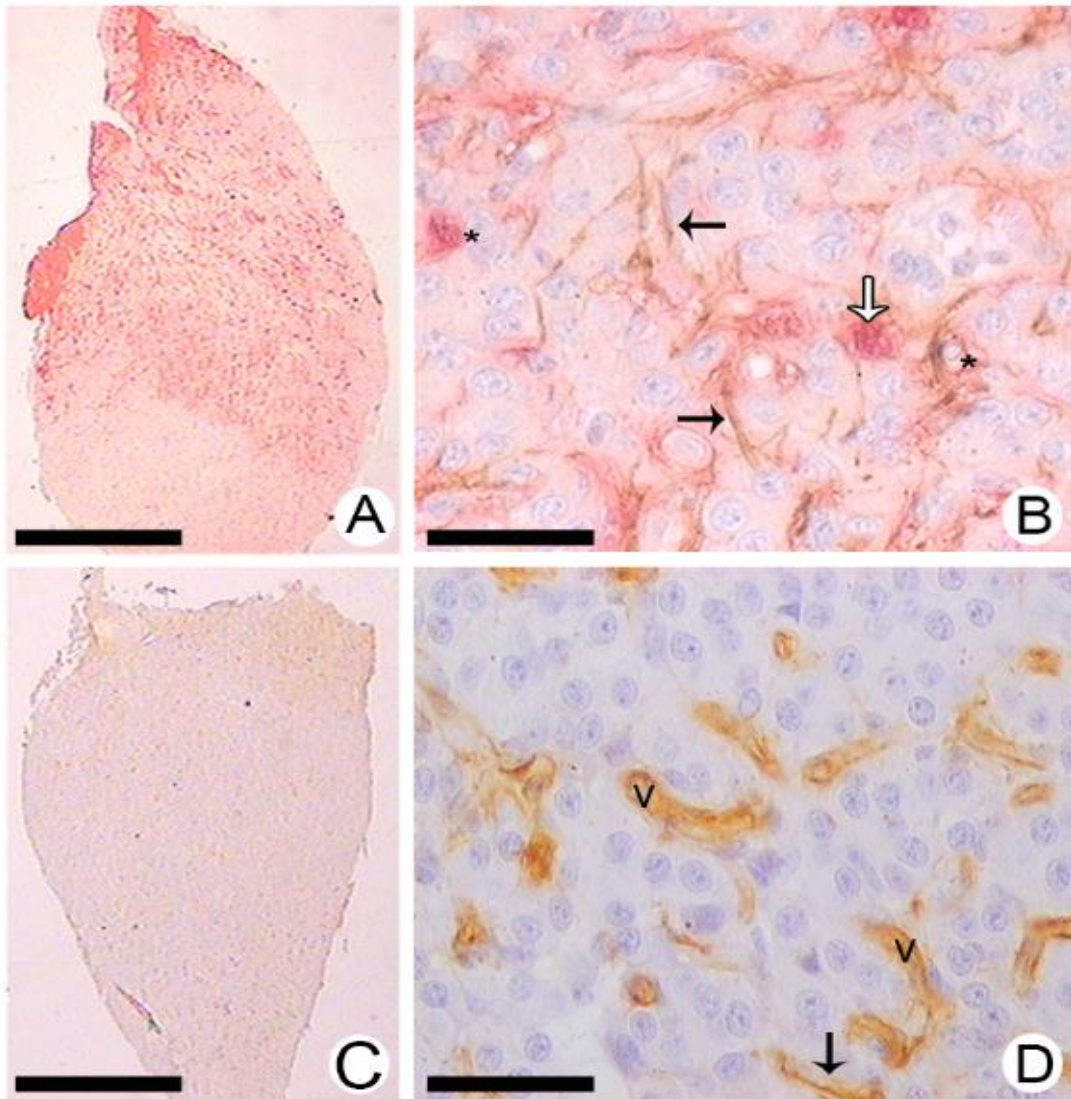


Figura 25: Doble inmunomarcación para las proteínas S-100 y GFAP en preñez inicial. Inmunopositividad para vimentina en preñez final. A) La micrografía muestra abundante positividad en la región proximal al tallo y discreta en la distal; B) La imagen revela algunas CI exhibiendo colocalización para ambas proteínas. La proteína S-100 se observa principalmente en el núcleo (**flecha blanca**), mientras que GFAP se en los procesos citoplasmáticos (**flechas negras**). Otras CI expresaron exclusivamente solo una de las proteínas analizadas (**asteriscos**); C) Vimentina se expresa en ambas regiones pineales; D) La inmunomarcación para vimentina se observa en numerosos vasos sanguíneos (**v**) y pocas CI presentan inmunotinción en sus procesos citoplasmáticos (**flecha negra**). Escala de barras: A y C, 500  $\mu\text{m}$ ; B y D, 25  $\mu\text{m}$ .



### **Determinaciones bioquímicas de estradiol y progesterona en los diferentes estadios de preñez**

Los niveles de concentración sérica, tanto para E2 como para PG, exhibieron diferencias significativas entre las vizcachas no grávidas y grávidas. En las vizcachas no grávidas se reportaron los valores más bajos. Durante la preñez inicial, los valores séricos de ambas hormonas se incrementaron respecto a los de hembras no grávidas. El aumento de E2 no fue significativo en comparación al reportado en hembras no preñadas. Sin embargo, los niveles de PG fueron significativamente más altos en relación a las vizcachas no preñadas. En la preñez media, E2 y PG exhibieron los valores más altos, con diferencias significativas entre vizcachas no preñadas, de preñez inicial y final. En la preñez final, los niveles de E2 disminuyeron a valores séricos muy próximos a los reportados durante la preñez inicial. De igual manera, la concentración sérica de PG fue menor en este estadio de preñez y se encontraron diferencias significativas entre las vizcachas no grávidas y aquellas en preñez inicial (Tabla 3).

**Tabla 3: Estudio morfométrico y bioquímico de las proteínas S-100 y GFAP en vizcachas no preñadas y preñadas**

ESTADIOS DE PREÑEZ	ESTUDIO MORFOMETRICO				ESTUDIO BIOQUIMICO	
	% AI PROTEINA S-100		% AI GFAP		ESTRADIOL <i>pg/ml</i>	PROGESTERONA <i>ng/ml</i>
	REGION PROXIMAL	REGION DISTAL	REGION PROXIMAL	REGION DISTAL		
NO PREÑADAS	11,29 ± 0,72	1,81 ± 0,38	7,27 ± 0,39	0,96 ± 0,20	17,25 ± 2,87	0,69 ± 0,12
PREÑEZ INICIAL	12,96 ± 0,45	5,93 ± 0,69	7,97 ± 0,88	3,35 ± 0,70	26,25 ± 2,39	4,59 ± 0,90 <sup>i</sup>
PREÑEZ MEDIA	19,6 ± 0,54 <sup>a</sup>	10,69 ± 1,34 <sup>c</sup>	11,09 ± 0,54 <sup>e</sup>	6,49 ± 0,71 <sup>f</sup>	77,50 ± 1,44 <sup>h</sup>	55,05 ± 1,81 <sup>j</sup>
PREÑEZ FINAL	16,24 ± 1,30 <sup>b</sup>	8,19 ± 1,47 <sup>d</sup>	8,37 ± 0,69	5 ± 0,76 <sup>g</sup>	23,75 ± 1,75	19,03 ± 1,94 <sup>k</sup>

Los valores se expresaron como media  $\pm$  ESM (n = 4).

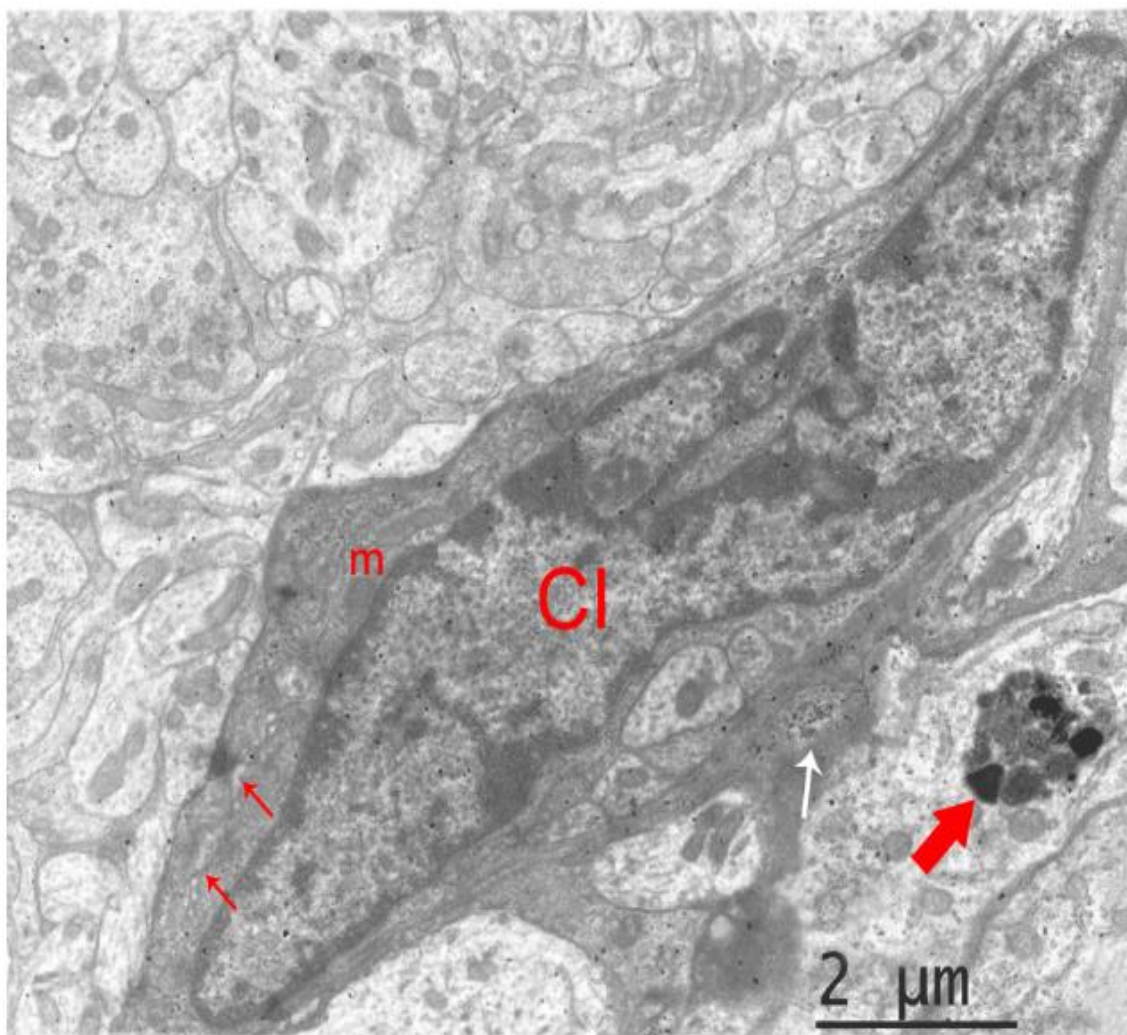
Estudio morfométrico: %AI Proteína S-100 (región proximal): <sup>a</sup> p<0,001: preñez media vs preñez inicial y no preñadas; <sup>b</sup> p<0,001: preñez final vs no preñadas. %AI Proteína S-100 (región distal): <sup>c</sup> p<0,001: preñez media vs preñez inicial y no preñadas; <sup>d</sup> p<0,001: preñez final vs no preñadas. %AI GFAP (región proximal): <sup>e</sup> p<0,01: preñez media vs preñez final, inicial y no preñadas. %AI GFAP (región distal): <sup>f</sup> p<0,001: preñez media vs no preñadas; <sup>g</sup> p<0,001: preñez final vs no preñadas. Las diferencias significativas en el estudio morfométrico se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Además, la comparación entre regiones (proximal vs. distal) para cada etapa de la preñez se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney. La proteína S-100 mostró diferencias significativas (p<0,01 para cada etapa de la preñez). GFAP también mostró diferencias significativas (p<0,01: preñez media y no preñadas; p<0,05: preñez inicial y final).

Estudio bioquímico: Estradiol: <sup>h</sup> p<0,05: preñez media vs preñez final, preñez inicial y no preñadas. Progesterona: <sup>i</sup> p<0,05: preñez inicial vs no preñadas; <sup>j</sup> p<0,001: preñez media vs preñez final, inicial y no preñadas; <sup>k</sup> p<0,001: preñez final vs preñez inicial y no preñadas.

Las diferencias significativas en el estudio bioquímico se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

### **Análisis ultraestructural de las células intersticiales**

A nivel ultraestructural las CI fueron escasas y se ubicaron preferentemente próximas a los espacios perivasculares. Su núcleo fue alargado o triangular, irregular, electrodenso, con cromatina dispersa y gránulos de heterocromatina ubicados sobre la envoltura nuclear. Se destacó su alta densidad electrónica que, junto a su forma y tamaño, permitieron diferenciarlas de los pinealocitos. El citoplasma fue electrodenso y sus componentes característicos incluyeron mitocondrias, cisternas de retículo endoplásmico liso, gránulos de glucógeno, microfilamentos y fagolisosomas (Fig.26). Por otro lado, estas células emiten proyecciones citoplasmáticas que contactan con vasos sanguíneos o pinealocitos.



*Figura 26: Ultraestructura de las células intersticiales. La micrografía muestra a gran aumento una célula intersticial (CI), la cual se diferencia fácilmente de los pinealocitos por su forma, tamaño y densidad electrónica. El núcleo es alargado e irregular, con cromatina dispersa y gránulos de heterocromatina ubicados sobre la envoltura nuclear. El citoplasma es electrodenso y sus componentes característicos incluyen mitocondrias (m), cisternas de retículo endoplasmático (flechas rojas finas), gránulos de glucógeno (flecha blanca). Sistema fagolisosomal (flecha roja gruesa). Magnificación 12000X. Escala de barra: 2  $\mu$ m.*

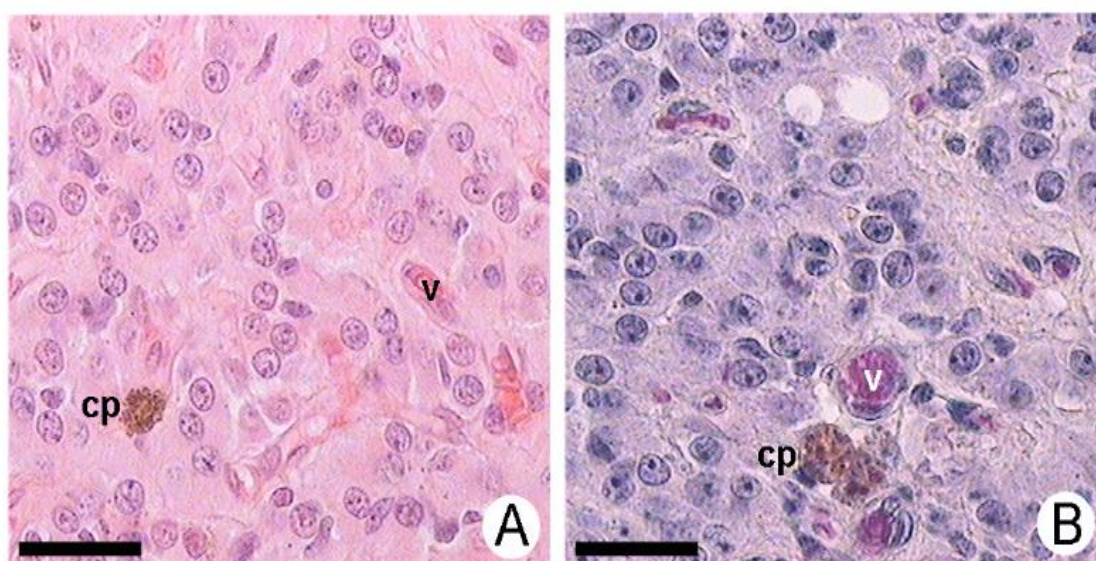


## PARTE C: CELULAS PIGMENTADAS DE LA GLANDULA PINEAL

Este estudio fue realizado en hembras ya que, en ellas, la presencia de pigmentos pineales fue una característica notoria y frecuente. Por el contrario, en vizcachas machos estas células fueron poco frecuentes o no se observaron.

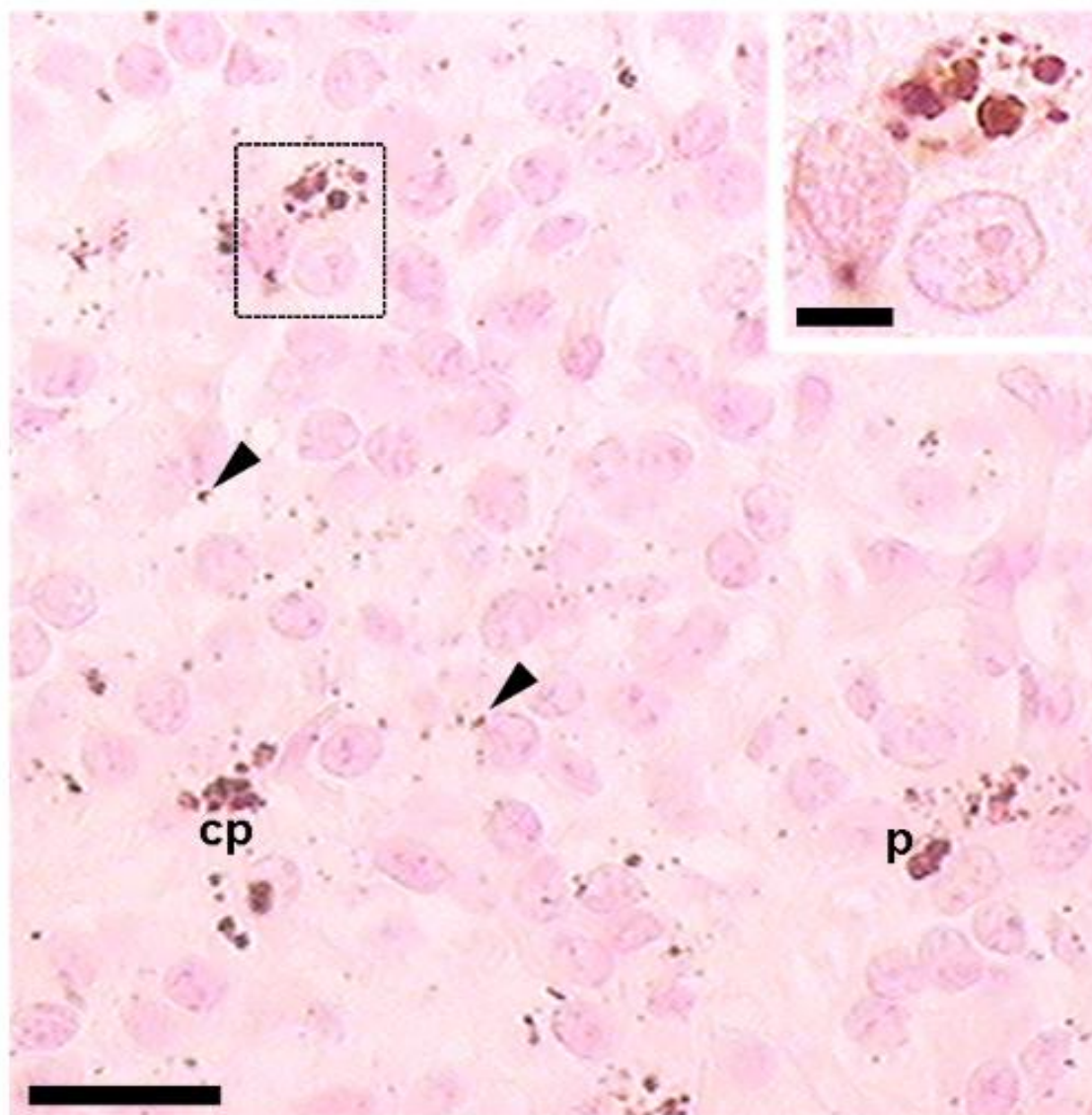
### Microscopía óptica

El estudio de microscopía óptica reveló la presencia de pigmentos en la glándula pineal de hembras todos los grupos estudiados. En las secciones coloreadas con H-E y PTAHM, las CP se observaron con forma ovoide o redondeada, y su color varió del marrón claro al oscuro. Presentaron una distribución aleatoria en toda la glándula, pero con frecuencia se encontraron en cercanía a los vasos sanguíneos. Estas células exhibieron en su citoplasma, en grado variable, gránulos de pigmentos. Asimismo, fue frecuente encontrar pequeños gránulos de pigmentos dispersos en el espacio intersticial, entre los pinealocitos y las CI, e inclusive algunos de ellos, fueron reportados en interior de las mismas (Fig. 27).



*Figura 27: Imágenes de glándulas pineales durante la preñez inicial. A) La micrografía muestra una célula pigmentada (cp) de color marrón claro. Se observan algunos vasos sanguíneos en la proximidad (v). Coloración H-E. B) Células pigmentadas (cp) en estrecha asociación con vasos sanguíneos (v). Coloración PTAHM Escala de barras: A y B 25  $\mu$ m.*

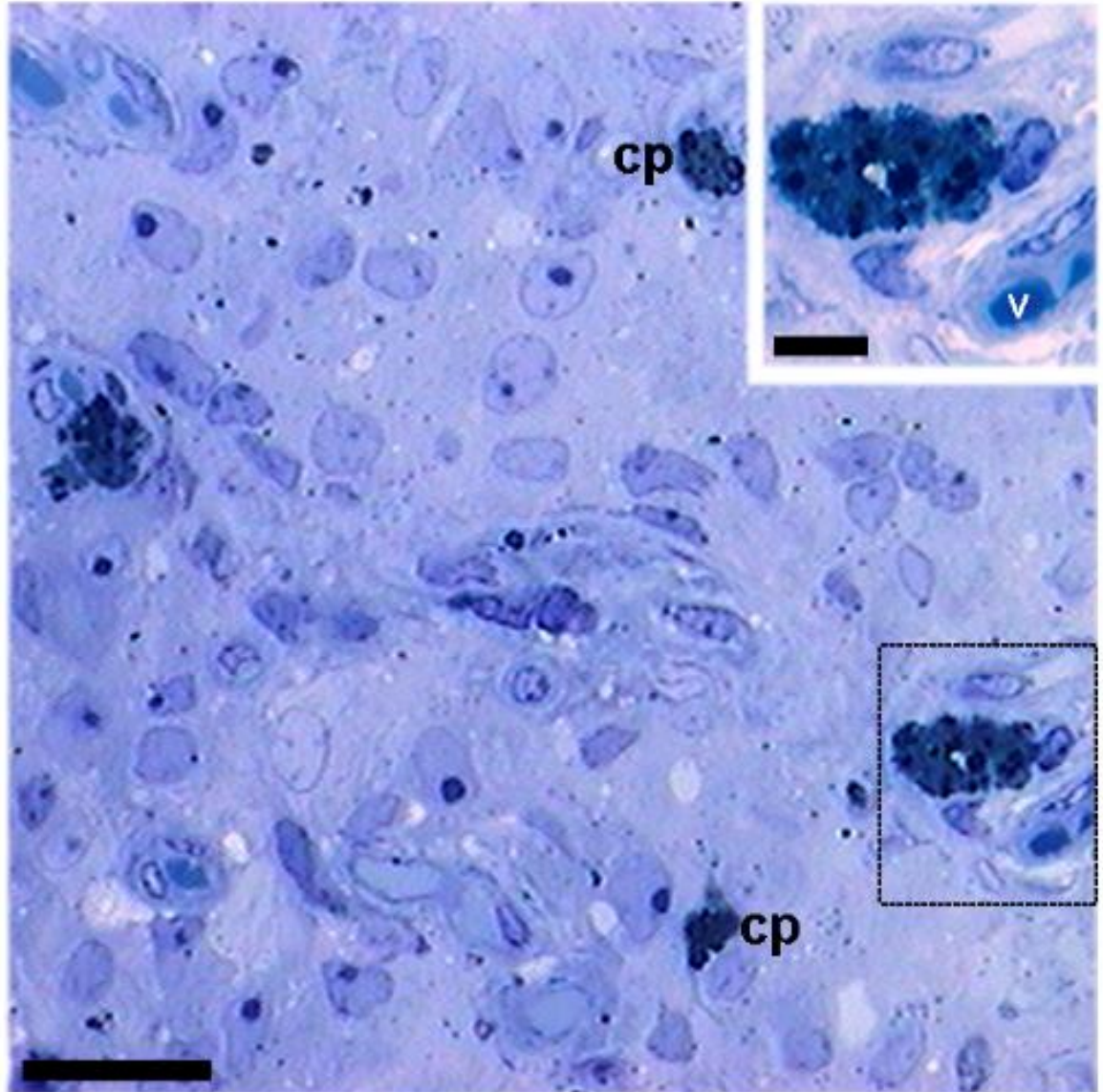
El método de plata de Masson-Fontana para melaninas resultó positivo y los pigmentos manifestaron una fuerte reacción argentafín. En el espacio extracelular, los gránulos de pigmento fueron abundantes y se dispersaron por todo el parénquima pineal (Fig. 28). Los gránulos de pigmento en las secciones de control, se blanquearon mediante el tratamiento con permanganato de potasio-ácido oxálico y peróxido de hidrógeno, que identificaron histoquímicamente al pigmento como melanina.



*Figura 28: Imagen de la una glándula pineal en preñez media. Se muestra una fuerte reacción argentafín en las células pigmentadas (cp). Abundantes gránulos de pigmentos están dispersos a lo largo del parénquima (puntas de flechas). El recuadro superior derecho muestra la reacción de plata con mayor detalle. Método de plata de Masson-Fontana, contrastado con rojo nuclear rápido. Escala de barra: 25  $\mu$ m. Escala de barra del inset: 5  $\mu$ m.*



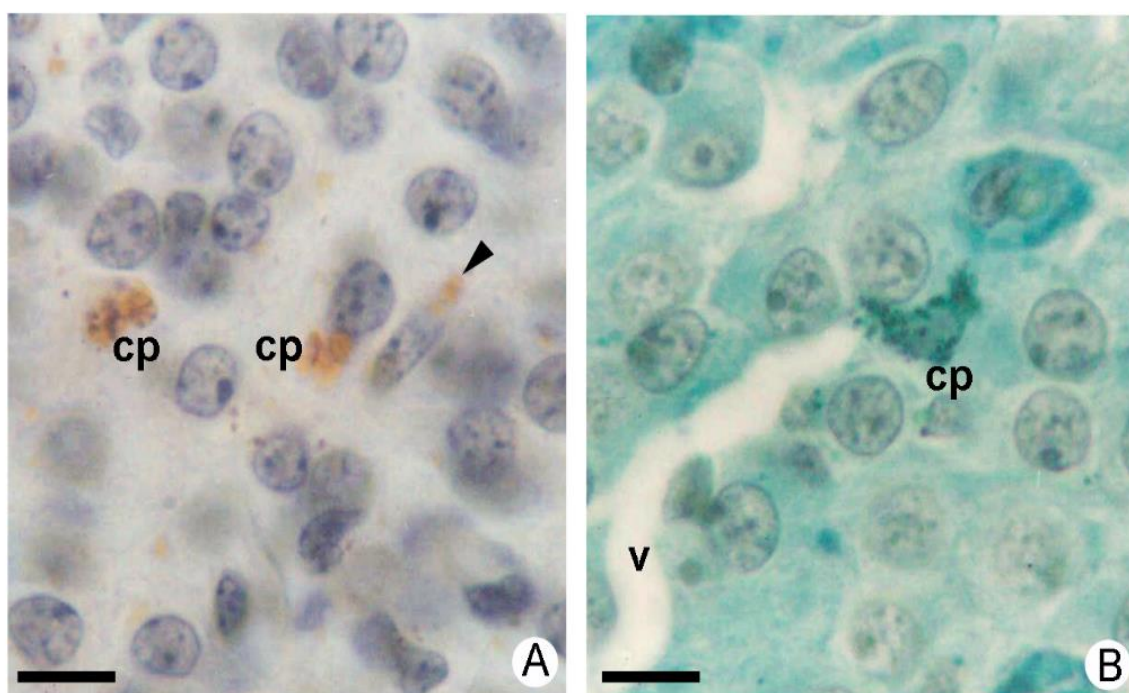
Las secciones semifinas teñidas con azul de toluidina exhibieron CP en estrecha relación a los vasos sanguíneos. Los gránulos de pigmentos se observaron el espacio intersticial, entre pinealocitos y CI (Fig. 29).



*Figura 29: Imagen de una glándula pineal durante la preñez media. Micrografía de una sección semifina de la glándula con numerosas células pigmentadas (cp) distribuidas en el parénquima. El recuadro superior derecho muestra a mayor aumento una CP en la proximidad de un vaso sanguíneo (v). Azul de toluidina Escala de barra: 25  $\mu$ m. Escala de barra del inset: 5  $\mu$ m.*

### **Histoquímica para DOPA-oxidasa y reacción de Schmorl**

La histoquímica para DOPA-oxidasa y la reacción de Schmorl fueron positivas en CP de vizcachas hembras. En la histoquímica para DOPA-oxidasa los pigmentos fueron marrones (Fig. 30A) mientras que, en la reacción de Schmorl, los pigmentos se apreciaron de color verdoso (Fig. 30B).



*Figura 30: Imagen de la glándula pineal en preñez final. A) Se observa una reacción histoquímica positiva para DOPA-oxidasa en las células pigmentadas (cp) y gránulos de pigmentos (punta de flecha) que se exhiben de color marrón claro. Tinción nuclear: hematoxilina; B) La micrografía muestra una célula pigmentada (cp) de color verde en la proximidad de un vaso sanguíneo (v). Reacción de Schmorl, tinción de contraste: Van Gieson. Escala de barras: A y B 10  $\mu$ m.*

### **Estudio de las células pigmentadas durante la preñez**

Se encontraron variaciones significativas en la cantidad de pigmentos pineales en relación con los niveles séricos de hormonas sexuales entre vizcachas no preñadas y preñadas. Durante la preñez, se observó una mayor cantidad de pigmentos distribuidos en el parénquima, respecto de las hembras no preñadas (Fig. 31). Las vizcachas no grávidas presentaron el menor %CP en comparación a las hembras grávidas. En la preñez media se encontró el mayor %CP, seguidas por aquellas en preñez final y por último las de preñez inicial. (Tabla 4).



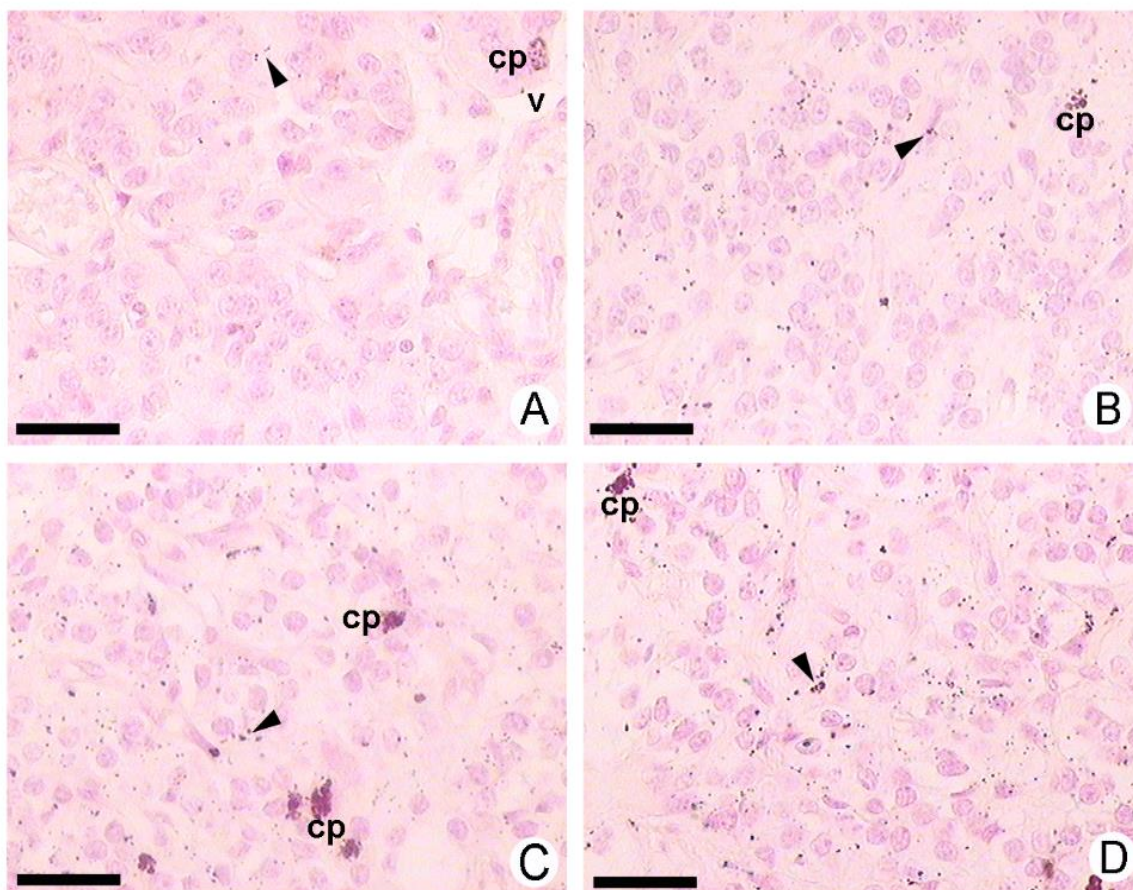


Figura 31: Micrografías de glándulas pineales en cada estadio gestacional. A) no preñada, B) preñez inicial, C) preñez media y D) preñez final. En las imágenes se pueden observar diferentes células pigmentadas (**cp**) en el parénquima glandular. Nótese el incremento en el número de células pigmentadas durante la preñez media y de gránulos de pigmentos (**punta de flecha**) en el espacio intersticial durante la preñez final. Vaso sanguíneo (**v**). Método de plata de Masson-Fontana, contrastado con rojo nuclear rápido. Escala de barras: A, B, C y D 25  $\mu$ m.

**Tabla 4: Variaciones en el número de células pigmentadas y niveles séricos de hormonas entre vizcachas no grávidas y grávidas**

PARAMETROS	NO PREÑADAS	PREÑEZ INICIAL	PREÑEZ MEDIA	PREÑEZ FINAL
<b>% CELULAS PIGMENTADAS</b>	<b>0,76 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>1,73 <math>\pm</math> 0,18 <sup>a</sup></b>	<b>3,52 <math>\pm</math> 0,35 <sup>b</sup></b>	<b>2,58 <math>\pm</math> 0,12 <sup>c</sup></b>
<b>ESTRADIOL pg/ml</b>	<b>18 <math>\pm</math> 3,19</b>	<b>27,5 <math>\pm</math> 2,5</b>	<b>75 <math>\pm</math> 2,89 <sup>d</sup></b>	<b>24,25 <math>\pm</math> 2,17</b>
<b>PROGESTERONA ng/ml</b>	<b>0,72 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>4,64 <math>\pm</math> 0,95 <sup>e</sup></b>	<b>53,75 <math>\pm</math> 2,39 <sup>f</sup></b>	<b>18,61 <math>\pm</math> 2,25 <sup>g</sup></b>

Los valores se expresaron como media  $\pm$  ESM (n = 4).

Porcentaje de Células pigmentadas: <sup>a</sup>  $p < 0,05$  preñez inicial vs no preñadas; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  preñez media vs preñez inicial y no preñadas; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  preñez final vs preñez inicial y no preñadas.

Estradiol: <sup>d</sup>  $p < 0,05$  preñez media vs preñez final, inicial y no preñadas.

Progesterona: <sup>e</sup>  $p < 0,05$  preñez inicial vs no preñadas; <sup>f</sup>  $p < 0,05$  preñez media vs preñez final, inicial y no preñadas; <sup>g</sup>  $p < 0,05$ ; preñez final vs preñez inicial y no preñadas.

Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

### **Estudio ultraestructural de las células pigmentadas**

Mediante el análisis ultraestructural, las CP exhibieron un núcleo de forma ovoide o redondeada, electrodensos y con heterocromatina dispersa en su matriz. El citoplasma presentó abundantes mitocondrias y un complejo de Golgi bien desarrollado. La presencia de gránulos de tamaño variable con un contenido electrodensos fue característica en el citoplasma de estas células (Fig. 32). Estos gránulos electrodensos presentaron características correspondientes a pre-melanosomas y melanosomas. Se identificaron varias etapas de la melanogénesis (Fig. 33A). Estas estructuras fueron observadas ocasionalmente también en pinealocitos y CI, a menudo dentro de cuerpos densos similares a lisosomas (Fig. 33B).



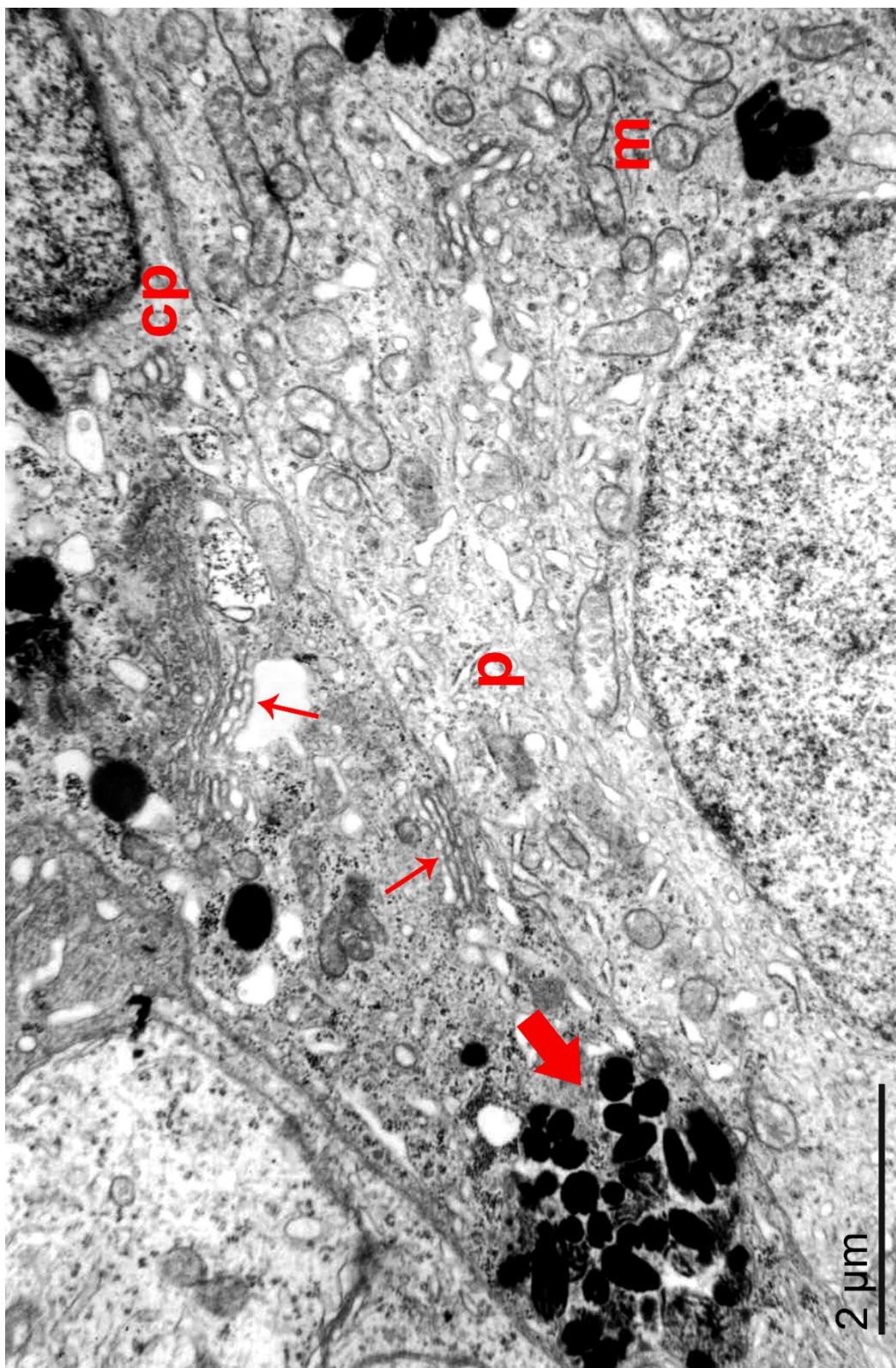


Figura 32: Micrografía electrónica de una glándula pineal durante la preñez media. Se exhiben gran cantidad de pre-melanosomas y melanosomas (**flecha roja gruesa**) en el citoplasma de una célula pigmentada (**cp**). Se observa un complejo de Golgi bien desarrollado (**flechas rojas finas**). El pinealocito (**p**) presenta una gran cantidad de mitocondrias (**m**). Magnificación 20000X. Escala de barra: 2  $\mu$ m.

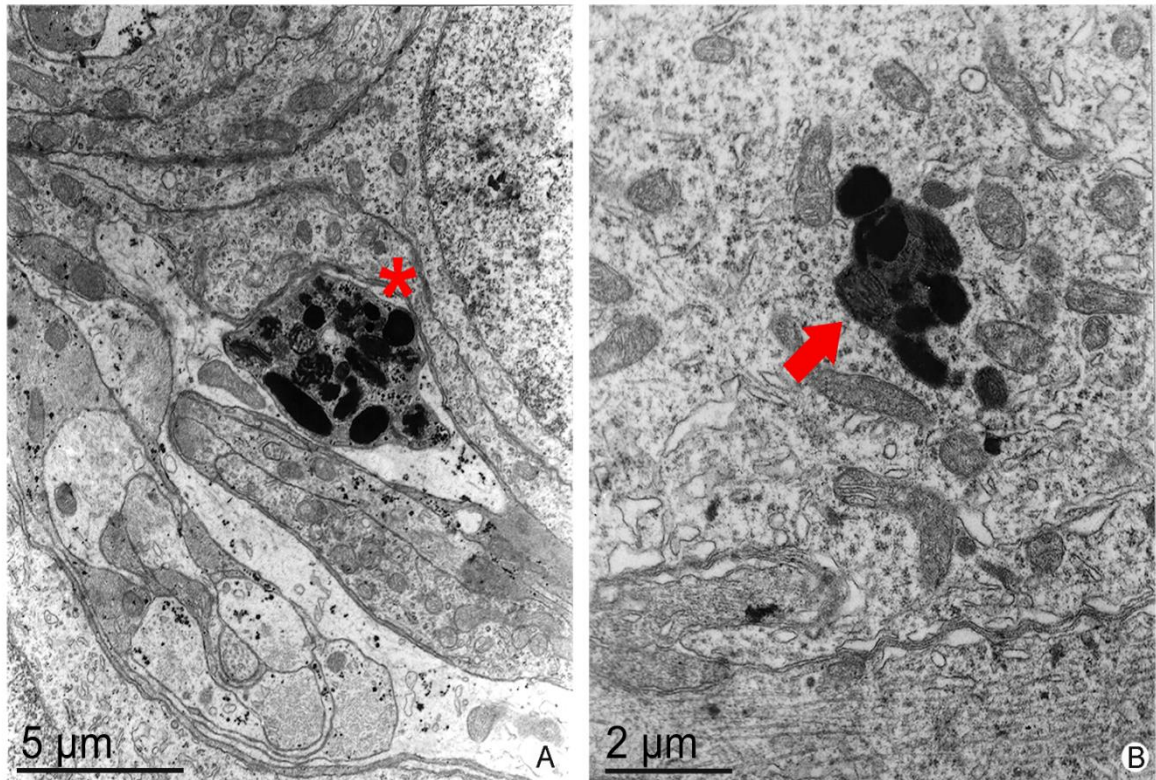
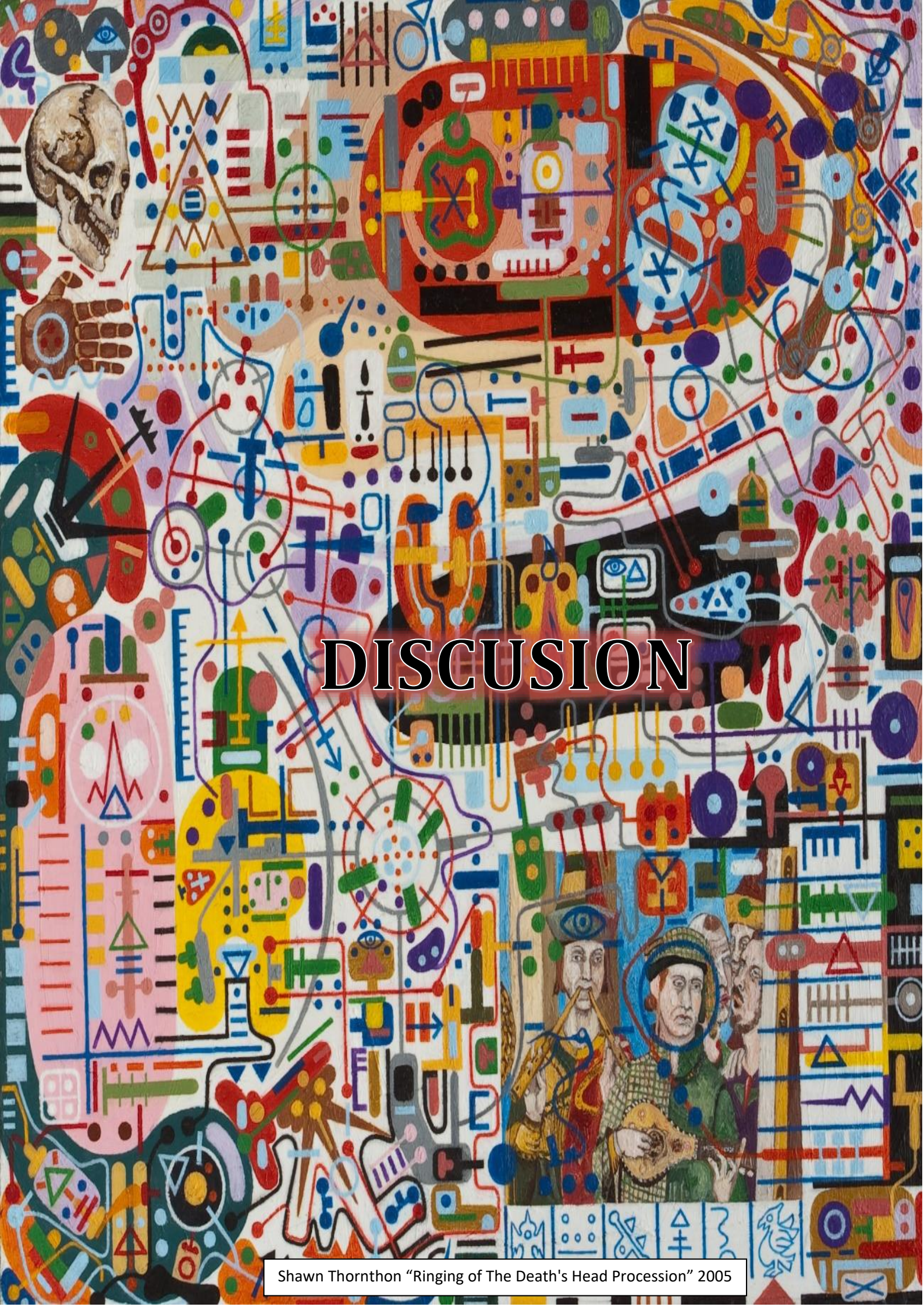


Figura 33: Micrografía electrónica de la glándula pineal durante la preñez media. A) En la micrografía se observa una acumulación de gránulos de pigmento en diferentes etapas de la melanogénesis (**asterisco**). Magnificación 7000X; B) En la imagen se exhiben gránulos de pigmento dentro de un cuerpo denso similar a lisosoma (**flecha roja**) Magnificación 12000X. Escala de barras: A 5  $\mu\text{m}$  y B 2  $\mu\text{m}$ .





# DISCUSSION



La localización anatómica de la glándula pineal en la encrucijada del sistema nervioso central, su carácter impar en un entorno de estructuras dobles y su aspecto morfológico han atraído la atención de numerosos científicos a lo largo de la historia, y se han postulado distintas teorías fisiológicas relacionadas con su función. Entre ellas se destaca la teoría mecanicista propuesta por René Descartes (1596-1650), quien postuló que esta estructura anatómica albergaba en su seno la sede del alma y era responsable de la correcta comunicación entre la máquina humana y su entorno. Sin embargo, tras este período de esplendor en el siglo XVII, la glándula pineal pasó por un momento de absoluto olvido científico, en el que se la estimó como un mero vestigio rudimentario. Finalmente, a partir de la segunda mitad del siglo XIX comenzó la ruptura definitiva con esa etapa pre-científica del conocimiento de la glándula pineal y se inició el período de análisis científico sobre la naturaleza de la misma, que culminaría con la evidente confirmación de su naturaleza endocrina tras el aislamiento de la melatonina en 1958 por el equipo de Aaron B. Lerner (López-Muñoz y col., 2010).

En esta Tesis Doctoral se estudió la glándula pineal de vizcacha con el fin de identificar y analizar la segunda población celular; las CI. Utilizando diferentes técnicas de coloración, técnicas inmunohistoquímicas y microscopia electrónica, se analizaron estas células de forma estacional, en animales inmaduros sexuales y durante la preñez. Además, durante el estudio de esta población celular en vizcachas hembras, la presencia de CP fue notoria y constante, mientras que en machos fueron observadas ocasionalmente. Mediante técnicas citoquímicas e histoquímicas se procedió al estudio de esta tercera población celular. Para complementar el análisis, se realizaron determinaciones bioquímicas de los niveles de esteroides gonadales durante la preñez al igual que estudios ultraestructurales.

En la mayoría de los mamíferos la glándula pineal presentó una morfología ligeramente piramidal y se encontró cubierta por una cápsula de elementos piales (Vollrath, 1981). En vizcacha, la pineal observada a bajo aumento exhibió forma ovoide, alargada, redondeada en su extremo proximal al tallo y aguzada en el distal. Se halló cubierta por una cápsula de tejido conectivo que emitió tabiques incompletos hacia el interior. La presencia de concreciones calcáreas o calcificaciones pineales en el parénquima glandular fue un hallazgo frecuente en diferentes especies (Bargmann 1981; Boya y Calvo, 1984; Fawcett 1995; Vigh 1998; Junqueira y Carneiro, 2003). En vizcacha, la presencia de depósitos calcáreos ha sido reportada tanto en machos (Domínguez, 1990)

como en hembras (Gil, 2005). En nuestros estudios, las concreciones calcáreas fueron ocasionales en ambos sexos. En dichos casos, las pineales se presentaron fibrosadas, sugiriendo que la edad de los animales pudo ser un factor influyente en su formación.

Domínguez y col. (1987) reportaron en sus estudios ultraestructurales de la glándula pineal de vizcachas machos dos poblaciones celulares principales: Los pinealocitos y las CI. Los pinealocitos fueron clasificados como tipo I o tipo II en relación a sus características morfológicas. A su vez, la población tipo I fue dividida en claros y oscuros según su densidad electrónica. Posteriormente, Cernuda-Cernuda y col. (2003) realizaron nuevos estudios ultraestructurales en pineales de vizcachas machos. Estos investigadores reportaron 2 poblaciones de pinealocitos, los de tipo I y los de tipo II, y células con características gliales (tipo III). En las últimas, describieron la presencia de microfilamentos, propia de astrocitos, partículas de glucógeno y cuerpos densos. Los estudios ultraestructurales realizados por Gil y col. (2005) en vizcachas hembras demostraron la presencia de pinealocitos claros y oscuros, con variaciones en su expresión en relación al estadio de preñez. Los pinealocitos claros fueron observados frecuentemente en hembras no grávidas mientras que en las grávidas los oscuros fueron más abundantes en el parénquima glandular. En nuestro estudio hemos clasificado a las poblaciones celulares más abundantes en pinealocitos y CI, estas últimas con características gliales, en la glándula pineal de vizcachas machos y hembras. Por otro lado, incorporamos el estudio de las CP como otra población presente dentro de la pineal de vizcacha en hembras. Otros autores, trabajando en diferentes especies, también describieron las CP en la glándula (Bhatnagar y Hilton, 1994; Calvo y col., 1988; 1992; Regodón y col., 1998; Redondo y col., 2003).

Las CI de la glándula pineal han sido estudiadas en diferentes especies de mamíferos, principalmente en roedores. Los estudios más representativos fueron los siguientes: en rata (Møller y col., 1978; Schachner y col., 1984; López-Muñoz y col., 1992; Borregón y col., 1993; Suzuki y Kachi, 1995), ratón (Schachner y col., 1984; Huang y col., 1984; Li y Welsh, 1991), vaca (Zang y col., 1985), gerbil (Girod y Durand, 1985; Li y Welsh, 1991), perro (Boya y Calvo, 1993), gato (Boya y Calvo, 1993; Boya y col., 1995), oveja (Franco y col., 1997; Redondo y col., 2001; Regodón y col., 2001), caballo (Cozzi, 1986), burro (Safwat 2012) e incluso en humanos (Lowenthal y col., 1982; Papasozomenos, 1983; Min y col., 1987; Kasper y col., 1990). En la mayoría de las

especies estudiadas estas células presentaron forma estrellada con numerosos procesos citoplasmáticos, núcleo de aspecto irregular, triangular y con cromatina condensada (Møller y col., 1978; Schachner y col., 1984; Calvo y col., 1988a; López-Muñoz y col., 1992; Calvo y Boya, 1993; Franco y col., 1997; Junqueira y Carneiro, 2003; Safwat, 2012). Las CI representan una población de células heterogéneas desde el punto de vista morfológico, funcional e inmunohistoquímico. Como hemos indicado anteriormente los principales marcadores celulares utilizados para el estudio de las CI son: proteína S-100, GFAP y vimentina, considerados como marcadores de células gliales, de astrocitos y células gliales inmaduras, respectivamente.

En rata, Møller y col. (1978) utilizando antisueros contra las proteínas S-100 y GFAP, comprobaron la presencia de células positivas para estos marcadores en la zona próxima al tallo pineal. Estos investigadores las consideraron verdaderas células macrogiales. En 1985, Girod y Durand verificaron la expresión de la proteína S-100 en pineal de macaco. Calvo y col. (1988a) utilizaron los tres marcadores proteicos para identificar CI en pineal de rata. Las células positivas a estos tres antígenos mostraron una morfología muy similar; estrellada y con largas prolongaciones citoplasmáticas. Las proteínas S-100 y GFAP exhibieron un patrón de inmunomarcación similar entre ellas, localizándose en la parte proximal al tallo. Sin embargo, las células vimentina positivas se localizaron en toda la glándula. Además, la inmunotinción para esta proteína se presentó en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Estos resultados fueron concordantes con los expuestos por Schachner y col. (1984) en rata, quienes habían estudiado la expresión de GFAP, vimentina y el antígeno C1; un marcador de astrocitos inmaduros. Estos autores reportaron células positivas a GFAP, vimentina y C1 en la región proximal al tallo, y solo positivas a vimentina y C1 en la parte más distal. La expresión de vimentina y el antígeno C1 se interpretó como un signo de inmadurez celular, mientras que la de GFAP como típica de una población glial madura. Destacaron que en pineal coexisten células GFAP y vimentina positivas, lo cual no ocurre en otros órganos del SNC, en los que vimentina y C1 son marcadores astrocitarios tempranos que luego son reemplazados por GFAP en células maduras. Esto puede deberse a que la glándula, como es un transductor neuroendocrino que responde a estímulos ambientales, puede preservar un estado de plasticidad correspondiente al estado funcional de algunos astrocitos inmaduros. López Muñoz y col. (1992b), estudiaron la coexpresión de GFAP y vimentina en ratas adultas, mientras que Borregón y col. (1993) analizaron la expresión



de la proteína S-100, GFAP y vimentina. Posteriormente, Suzuki y Kachi (1995) demostraron en rata que la proteína S-100 se expresó en todo el parénquima glandular, mientras que GFAP solo en la región proximal al tallo. Franco y col. (1997) estudiaron las CI de la pineal de oveja, mediante técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de microscopia electrónica. Estas células presentaron positividad para PTAH y para GFAP, indicando naturaleza glial. Sin embargo, no todas las células PTAH-positivas lo fueron para GFAP. Los autores sugirieron que cierta población de células gliales positivas para PTAH estaban constituidas por astrocitos inmaduros que no expresaron GFAP, similar a lo observado previamente en ratas (Schachner y col., 1984; López-Muñoz y col., 1992a), perros y gatos (Boya y Calvo, 1993). Por esta razón se consideró a GFAP como un marcador válido para detectar el grado de maduración astrocitario. Redondo y col. (2001, 2003) confirmaron que GFAP y vimentina eran marcadores de CI en diferentes estadios de maduración. Se relacionó la ubicación de la glándula pineal con la expresión de GFAP en las CI. En aquellas pineales ubicadas profundamente y rodeada de estructuras nerviosas, las células GFAP-positivas se exhibieron por todo el parénquima. Datos similares se observaron en hámster (Sheridan y Reiter, 1970), gato y perro (Boya y Calvo, 1993). En cambio, la pineal de rata de ubicación superficial presentó células GFAP-positivas localizadas solo en el tallo y en la región proximal (Luo y col., 1984; Calvo y col., 1988a, Mikkelsen y Møller, 1990; López-Muñoz y col., 1992b; Suzuki y Kachi, 1995). En burros, Safwat (2012) realizó un estudio morfológico e inmunohistoquímico de la glándula pineal, utilizando como marcadores la proteína S-100, GFAP y sinaptofisina, un marcador de pinealocitos. Este autor estableció que las CI inmunorreactivas a ambas proteínas (S-100 y GFAP) exhibieron una distribución y características morfológicas similares, pero la inmunotinción para S-100 fue más densa respecto a la de GFAP. Las CI se observaron distribuidas en toda la glándula con excepción de las zonas con concreciones calcáreas, preferencialmente en las proximidades a los vasos sanguíneos y en la región subcapsular.

La heterogeneidad inmunohistoquímica que presentan las CI en las distintas especies estudiadas soporta la discrepancia existente en la literatura respecto al origen embriológico y la función exacta de estas células. **En la glándula pineal de vizcacha las CI expresan principalmente las proteínas S-100 y GFAP, y en menor medida vimentina. Por esta razón proponemos que, en nuestro modelo de estudio, el origen de las CI es neuroectodérmico. Es importante destacar que las CI pueden expresar**

**separadamente las proteínas S-100, GFAP y vimentina, sugiriendo la existencia de subpoblaciones celulares con diferentes funciones dentro del parénquima glandular (Busolini y col., 2017b, 2018).**

El fotoperíodo es la señal ambiental más predecible y encargada de generar numerosas respuestas fisiológicas en el organismo, a través de la melatonina pineal (Goldman, 2001). Esta hormona exhibe un incremento de sus niveles durante la fase de oscuridad, mientras que la exposición a la luz reduce su síntesis (Klein y col., 1997; Ganguly y col., 2002). Existe una relación inversa entre la duración del fotoperíodo y los episodios de secreción de la melatonina. Así, la melatonina codifica el mensaje acerca de la duración del fotoperíodo (Reiter, 1991), permitiendo la regulación estacional de diversas actividades fisiológicas y etológicas, tales como el metabolismo y la reproducción (Arendt, 1995; Guerrero y col., 2007). La dependencia del fotoperíodo ambiental a lo largo del año permite a los animales no solamente estar en condiciones sexuales apropiadas en un determinado momento, sino también anticiparse fisiológicamente a las estaciones climáticas próximas, realizando los ajustes endocrinos necesarios para lograr el éxito reproductivo y no poner en riesgo la supervivencia de la especie (Gerlach y Aurich, 2000). De este modo, numerosos mamíferos limitan su actividad reproductiva a una determinada época del año, lo cual permite que el nacimiento y la lactancia de sus crías, transcurra en un período del año con más probabilidades de crecimiento y desarrollo. Por otro lado, en algunas especies, las señales ambientales tales como la temperatura o la disponibilidad de agua y alimentos, son también sincronizadores naturales de los ciclos anuales (Bronson, 1989; Gottreich y col., 2000).

Los animales que viven en regiones con marcadas variaciones ambientales estacionales exhiben ritmos de carácter también estacional en su metabolismo, aspecto del tegumento, comportamiento alimentario y reproductivo (Guerrero y col., 2007). Los cambios estacionales en la función reproductiva han sido investigados y observados en numerosas especies de mamíferos, como el gerbil (El Qandil y col., 2005), el hámster (Miernicki y col., 1990), el zorro plateado (Forsberg y col., 1990), entre otros. Durante el invierno, los factores estresantes como las bajas temperaturas ambientales y la escasa disponibilidad de alimentos, conducen a un conjunto de modificaciones estacionales (Heideman y Broson, 1990). Una de estas adaptaciones incluye la interrupción de la reproducción, que permite a los animales sobrevivir con escasez de recursos energéticos (Goldman, 2001). Sin embargo, la anticipación a dichos estresores, confiere a los

individuos una ventaja para la supervivencia (Sinclair y Lochmiller, 2000). Así, los hámsters sirios y siberianos son reproductores de días largos, y detienen su reproducción durante los meses de invierno (Bartness y col., 1993; Maywood y col., 1996; Goldman, 2000). Contrariamente, la actividad reproductiva de las ovejas es estimulada en los días cortos (Karsch y col., 1988).

En vizcacha, numerosas investigaciones han confirmado la relación entre el fotoperíodo ambiental y la melatonina pineal en la función reproductiva del macho (Fuentes y col., 1991, 1993; Muñoz y col., 1997, 1999, 2001; Aguilera-Merlo y col., 2005, 2009; Chaves y col., 2011; Cruceño y col., 2013; Filippa y col., 2015; Rosales y col., 2016). El fotoperíodo corto provoca cambios bioquímicos y morfológicos en diferentes órganos del eje reproductivo. Cambios bioquímicos y ultraestructurales en los pinealocitos y niveles séricos máximos de melatonina han sido reportados durante el invierno (Domínguez y col., 1987; Domínguez, 1990; Cernuda-Cernuda y col., 2003), con inhibición de las actividades gonadales e hipofisarias.

En nuestro estudio referente a las CI, hemos encontrado diferencias significativas en el %AI para las proteínas S-100 y GFAP. Estas diferencias podrían indicar que las CI experimentan variaciones estacionales en sus propiedades bioquímicas, en relación con los cambios estacionales en la actividad de los pinealocitos. Se ha informado que la proteína S-100 actúa como regulador de la dinámica del citoesqueleto, transductor de señales intracelulares y regulador paracrino a nivel extracelular (Donato, 2003; Donato y col., 2009; Acosta y col., 2010). En vizcachas machos adultos, hemos observado variaciones estacionales en expresión de la proteína S-100. **Nuestros resultados demuestran un aumento en la expresión de la proteína S-100 durante el fotoperíodo corto, cuando se reportó la máxima actividad y síntesis de melatonina. Así, se puede sugerir una actividad sincronizada entre de ambos tipos celulares; CI y pinealocitos. Además de las variaciones estacionales en el número, ramificación y extensión de los procesos citoplasmáticos, el aumento en el %CI-S-100 durante el invierno y su disminución durante el verano, indican una posible relación entre la proliferación celular y la actividad glandular (Busolini y col., 2017b).** Sin embargo, se necesitan más estudios que incluyan PCNA para mostrar la actividad proliferativa de las CI en la glándula pineal. Por otro lado, la expresión de GFAP también varió estacionalmente, con un incremento invernal. Esta proteína constituye uno de los filamentos intermedios y es esencial para el mantenimiento de la forma celular (Eng, 1985; Inagaki y col., 1994). **En**

base a estos reportes, podemos sugerir que en vizcacha macho adulto las variaciones estacionales observadas para GFAP son concordantes a sus funciones intracelulares en la CI, asegurando una óptima actividad celular que acompaña la actividad de los pinealocitos (Busolini y col., 2017b). Es importante destacar la estrecha relación existente entre las proteínas S-100 y GFAP. La técnica de doble-IHQ reveló que algunas CI expresaron colocalización para ambas proteínas. La proteína S-100 se observó principalmente en el núcleo donde puede ejercer diversos roles regulatorios como fosforilación de quinasas, modulación de actividades enzimáticas, promoción de factores de transcripción, proliferación, entre otros. En cambio, la GFAP se expresó en los procesos citoplasmáticos donde tendría un rol estructural manteniendo la citoarquitectura celular, la movilidad y proveer de nutrientes a los pinealocitos. Algunas CI expresaron exclusivamente solo una de estas proteínas. **Los resultados de la doble-IHQ podrían indicar la existencia de CI en diferentes estadios funcionales, probablemente relacionadas con las necesidades del microambiente celular. Las variaciones observadas en la expresión de los distintos marcadores estudiados en las CI sugieren que estas células participan en el proceso de regulación paracrina dentro de la glándula (Busolini y col., 2017b, 2018).** Las CI mediante sus numerosas proyecciones citoplasmáticas generan una intrínseca red de comunicación intercelular intraglandular. **Esto nos permite sugerir que las CI mediante esta red de comunicación y las funciones intracelulares de las proteínas estudiadas, coordinan la actividad de los pinealocitos participando activamente en la regulación de histofisiología glandular (Busolini y col., 2017b, 2018).**

Numerosos investigadores han reportado regionalización en la expresión de estas proteínas en el parénquima pineal, demostrando una relación directa con las etapas de madurez de las CI (Calvo y col., 1988a; Mikkelsen y Møller, 1990; López-Muñoz y col., 1992a; Borregón y col., 1993; Boya y Calvo, 1993; Suzuki y Kachi, 1995; Franco y col., 1997; Redondo y col., 2001, 2003; Safwat, 2012). En vizcachas machos hemos observado que las CI se localizaron preferentemente en la región proximal. Los valores en el %AI para S-100 y GFAP y %CI-S-100 fueron más altos respecto a los reportados en la región distal. En el verano, cuando la actividad glandular disminuye, las CI se localizaron en menor medida en la región proximal y su presencia en la región distal fue ocasional. **En base a esto demostramos que las CI se localizan principalmente en la región proximal al tallo y cuando la actividad glandular aumenta o disminuye, su**



**localización en la región distal aumenta o disminuye, respectivamente (Busolini y col., 2017b).**

La expresión de vimentina en ambas regiones; proximal y distal, de la glándula pineal de vizcacha fue observada en algunas CI, células endoteliales y espacios perivasculares. **La presencia de células vimentina-positivas de especímenes adultos sugiere la existencia de una población de células gliales inmaduras que podría servir como población de reserva para reponer CI envejecidas, o como elementos regeneradores tras alguna lesión de las mismas (Busolini y col., 2017b, 2018).**

En diferentes especies se reportó que el número de CI aumenta en los animales adultos. Borregón y col. (1993) estudiaron mediante inmunohistoquímica las CI durante el desarrollo postnatal de la glándula pineal en rata. Estos autores encontraron una disminución en las células positivas para vimentina y un aumento de las células positivas para S-100 y GFAP con la edad de los animales. La inmunorreactividad para vimentina está presente desde el primer día después del nacimiento, aunque la expresión máxima se alcanza durante la primera semana postnatal (2-5 días). Las proteínas S-100 y GFAP aparecen más tarde que vimentina (15-20 días) y están exclusivamente presentes en el tercio proximal al tallo pineal. Hasta 15 días después del nacimiento, solo se detectó vimentina en el desarrollo de las células gliales pineales. A partir de la tercera semana, las proteínas S-100 y GFAP se expresaron primero cerca del tallo pineal y luego se extendieron por todo el tercio proximal. En la porción proximal de la glándula del hámster y el jerbo se describió inmunorreactividad para GFAP a los días 6 y 10 después del nacimiento, respectivamente (Li y Welsh, 1991). En perros y gatos, Boya y Calvo (1993) realizaron un estudio inmunohistoquímico del desarrollo postnatal de los astrocitos analizando la expresión de vimentina y GFAP. La vimentina es típica de astrocitos inmaduros y se observó desde el nacimiento, mientras que GFAP se expresó tardíamente en las células. Cabe destacar que estos animales presentaron una pineal de localización profunda y los astrocitos se distribuyeron por todo el parénquima glandular, a diferencia de la rata donde su ubicación se limitó a la región proximal al tallo. Así, surgieron que las CI de pineales de ubicación profunda exhiben una mayor diferenciación astrogliar. En los gatos de más edad, reportaron la presencia de nidos celulares negativos a vimentina y positivos a GFAP.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios comparativos entre vizcachas inmaduras sexualmente y animales adultos en diferentes órganos (Acosta y Mohamed, 2009; Chaves y col., 2012; Filippa y col., 2015; Cruceño y col., 2016). Los estudios relacionados con la edad reportados en esta Tesis Doctoral demostraron que las vizcachas inmaduras exhibieron los valores más bajos en los parámetros morfométricos analizados (% AI S-100, %CI-S-100 y GFAP). No se observaron diferencias cualitativas en la expresión de vimentina en comparación a los animales adultos. **Nuestros resultados sugieren que existe una relación directa entre la expresión de las proteínas S-100 y GFAP con la edad del animal. Además, el menor valor en el %CI-S-100 probablemente responda a una menor cantidad de CI en las pineales de estos animales (Busolini y col., 2017b).**

La melatonina participa en la regulación fisiológica del sistema endocrino, siendo responsable de sus adaptaciones circadianas y estacionales en relación con el fotoperíodo (Reiter, 1991). Por lo tanto, los valores de las hormonas circulantes modifican la síntesis de la melatonina pineal (Reiter, 1986). Ello le confiere a la glándula un carácter dual: *a*) como transductor neuroendocrino transformando una señal nerviosa, constituida por la liberación de NA, en otra endocrina mediante la síntesis de melatonina, y *b*) como transductor endocrino-endocrino, detectando cambios en la secreción de diversas hormonas que a su vez modifican la producción de melatonina (Hernández Díaz y col., 2001a). Especial atención merecen los esteroides gonadales debido a la fuerte influencia que tiene la melatonina sobre la fisiología de la reproducción, actuando sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal de un modo generalmente inhibitorio. Asimismo, las hormonas sexuales regulan las concentraciones circulantes de melatonina, influyendo directamente sobre la pineal o modificando diversos aspectos funcionales de la vía neural que la inerva. Los cambios en los valores séricos de melatonina durante el ciclo estral de la rata constituyen un buen ejemplo de dichos efectos. Diversos reportes indican que las hormonas ováricas E2 y PG actúan como potentes agentes reguladores del metabolismo pineal (Alonso y col., 1993; Hernández Díaz y col., 2001b). Los estudios en la glándula pineal durante la preñez se han llevado a cabo en diferentes especies, y en la mayoría de ellos se reportó un incremento de la actividad glandular (Lew, 1987; Bishnupuri y Haldar, 2000a, b). Se han descrito cambios ultraestructurales en la glándula pineal de rata (Satodate y col., 1980; Karasek y col., 1982), topo (Pevet y Smith, 1975), cobayo (Vollrath y Schmidt, 1969) y cerdo (Wyrzykowski y col., 1987). Asimismo, la actividad

de la glándula pineal se ha relacionado con la preñez mediante estudios bioquímicos realizados en rata (Tigchelaar y Nalbandov, 1975) y humanos (Pang y col., 1987). En ratas se ha sugerido que la glándula pineal puede estar involucrada en la síntesis y liberación de gonadotrofinas. Además, la glándula podría modificar los niveles de hormonas gonadales durante la última etapa de la gestación (Nir y col., 1979; Nir y Hirsschmann, 1980). Sin embargo, la relación entre la glándula y la preñez aún no se ha aclarado totalmente.

En vizcachas hembras, el patrón inmunohistoquímico y las variaciones morfológicas de las CI mostraron diferencias significativas entre no grávidas y grávidas. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de las proteínas (%AI-S-100, %CI-S100 y % AI-GFAP) en los diferentes estadios de preñez. No se observaron diferencias cualitativas en la expresión de vimentina. La presencia de algunas células vimentina-positivas en animales adultos sugiere que en las hembras también existe una población de células gliales inmaduras de reserva como lo observado en machos. Además, los resultados de doble-IHQ indicarían la existencia de CI en diferentes etapas funcionales, probablemente relacionadas con las necesidades del microambiente celular. Al igual que en los machos, hemos observado que los procesos citoplasmáticos de las CI en las pineales de hembras generan una amplia red de comunicación intraglandular. Sin embargo, se encontraron diferencias importantes en este estudio entre ambos sexos. En las vizcachas no grávidas, esta red se localizó principalmente en la región proximal. Durante la preñez inicial, la red comenzó a extenderse hacia la región distal. En la preñez media, cuando los niveles de E2 y PG fueron los más altos, la red se extendió por todo el parénquima cubriendo gran parte de la región distal. En la preñez final, dicha red comenzó a disminuir en esta región, en respuesta al descenso de los niveles hormonales. Además, los cambios observados en relación con el número, ramificación y extensión de los procesos citoplasmáticos de las CI sumado al incremento en el %CI-S-100 durante la preñez media, sugieren proliferación de las CI en relación con una mayor actividad glandular y los elevados niveles de hormonas gonadales. **Estos hallazgos son importantes porque demuestran que la glándula pineal en la vizcacha hembra es muy sensible a los cambios en los niveles de hormonas ováricas y responde de forma consistente a ellas. Por el contrario, la glándula pineal de vizcacha macho no responde de la misma manera a los andrógenos, sino que es más sensible a los cambios estacionales ambientales (Busolini y col., 2018).** De manera similar,

Bishnupuri y Haldar (2000a) reportaron en la ardilla de palma india (*Funambulus pennanti*) una relación directa entre la actividad de la glándula pineal y los esteroides ováricos durante el período gestacional. Estos autores también sugirieron que bajo condiciones de luz constante los fotoperíodos cortos y largos no afectaron significativamente la actividad glandular durante la preñez (Bishnupuri y Haldar, 2000b).

La morfología de la glándula pineal de los mamíferos presenta una gran variabilidad (Bhatnagar, 1992; Karasek y Reiter, 1992; Regodón y col., 1998; Koshy y Vettivel, 2005). Las estructuras infrecuentes como las cintas sinápticas y las esférulas, los cilios, los derivados ciliares, la arenilla cerebral y los gránulos de melanina constituyen una característica regular en esta glándula, aunque sin una función claramente establecida. Se ha demostrado la presencia de pigmentos en diferentes estructuras nerviosas, como en retina, *sustancia nigra* y *locus coeruleus* (Foley y Baxter, 1958; Zecca y col., 2001, 2003). En estructuras nerviosas propiamente dichas, este pigmento recibe el nombre de neuromelanina (Graham, 1979). Fedorow y col. (2005) sugirieron su participación en diferentes mecanismos oxidativos. Sin embargo, el papel que desempeña en estas estructuras nerviosas no se ha demostrado claramente. La melanina es un pigmento negro parduzco producido por los melanocitos de la piel que se derivan de la cresta neural y constituyen la segunda célula más abundante en la epidermis (Slomisky y col., 2004; Nordlund, 2007). Su función más conocida es proteger la piel contra los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (Brenner y Hearing, 2008; Herrling y col., 2008; D'Orazio y col., 2013). Este pigmento desempeña funciones críticas que se aprecian más fácilmente en los mamíferos con pelo, entre ellas el aislamiento térmico, mimetismo y camuflaje, cambios estacionales del pelaje, comunicación social y sexual; que involucran estímulos visuales y dispersión de odorizantes y percepción sensorial en los bigotes (Slomisky y col., 2004).

La presencia de pigmentos en glándula pineal ha sido descrita en algunos mamíferos como en bovinos (Meyer-Arendt y Santamarina, 1956; Santamarina, 1958), chinchilla (Matsushima y Reiter, 1975), caballo (Cozzi, 1986), murciélago (Bhatnagar, 1988; Bhatnagar y Hilton, 1994), perro (Calvo y col., 1988), gato (Calvo y col., 1992), oveja (Regodón y col., 1998; Redondo y col., 2003) y humanos (Møller, 1974; Min y col., 1987; Koshy y Vettivel, 2005). Sin embargo, los informes son escasos y la importancia biológica de estos pigmentos en pineal no ha sido esclarecida. No obstante, los procesos embrionarios podrían explicar su procedencia, debido a que la glándula pineal y la retina



se forman a partir del diencéfalo en desarrollo. Algunos autores han indicado la presencia de antígenos retinianos en los pinealocitos (Korf y col., 1990, 1992; Huang y col., 1992; Schomerus y col., 1994). En vizcacha se describió la morfología de los melanosomas retinianos (Calderón y col., 2002). En nuestro estudio en pineal dichas estructuras exhibieron notable similitud con la reportada en retina. **Por lo tanto, sugerimos que la presencia de melanina en la glándula pineal podría ser una consecuencia del desarrollo embrionario de estos órganos y dependiente diferencialmente de esteroides gonadales (Busolini y col., 2017a).** Por otro lado, en nuestro estudio observamos un bajo contenido de pigmentos en los pinealocitos y en las CI. Sin embargo, en el espacio intersticial los gránulos de pigmento fueron abundantes y se dispersaron por todo el parénquima, especialmente durante la preñez media y final. La morfología, las propiedades histoquímicas y la ultraestructura de las CP puede indicar que la melanogénesis tiene lugar en estas células, y luego la melanina es transferida a los pinealocitos y CI. Este proceso de transferencia de melanina se ha sugerido en pineal de gato (Calvo y col., 1992) y en murciélago (Bhatnagar y Hilton, 1994). Además, en vizcachas hembras se observaron gránulos de melanina dentro de cuerpos densos simiales a los lisosomas. La cantidad de melanina pineal varía con el sexo según la especie. No se informaron diferencias significativas entre machos y hembras en perros (Calvo y col., 1988), gatos (Calvo y col., 1992), ovejas (Regodón y col., 1998; Redondo y col., 2003), murciélagos (Bhatnagar y Hilton, 1994) y vacas (Santamarina, 1958). En vizcacha, los pigmentos pineales fueron evidentes y %CP varió significativamente de acuerdo al sexo, en los machos adultos e inmaduros se observaron excepcionalmente.

La vizcacha macho adulto es un reproductor estacional dependiente del fotoperíodo (Aguilera-Merlo y col., 2005; Acosta y Mohamed, 2010; Chaves y col., 2012; Filippa y col., 2015). Por el contrario, en hembras la relevancia del fotoperíodo en la función pineal no ha sido esclarecida. Se ha reportado que las hormonas ováricas E2 y PG son capaces de inducir la biosíntesis de melanina (Hall, 1969; Maeda y col., 1996). En la vizcacha hembra, la extensa duración de la preñez permite a los esteroides gonadales fluctuar en el tiempo y producir cambios histofisiológicos durante las diferentes etapas de la gestación. **Las variaciones demostradas en relación al contenido de melanina pineal durante la gestación sugieren la influencia de las hormonas gonadales circulantes sobre el contenido de pigmentos. Así, se confirma que la glándula pineal de la vizcacha**

**hembra es más susceptible a las señales endocrinas durante la preñez y menos al fotoperíodo ambiental (Busolini y col., 2017a).**

*Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral nos permiten demostrar y aceptar las hipótesis planteadas. Por otro lado, podemos concluir que ambos tipos celulares; CI y CP, desempeñan otras funciones además de sostén y nutrición. De esta manera, dichas células son necesarias para garantizar un adecuado microambiente celular en la glándula pineal de la vizcacha, asegurando así su óptima función neuroendocrina.*





# CONCLUSIONES

Shawn Thornton "Lobotomy of The Ghost Mechanics" 2006



- ✚ En la glándula pineal de vizcacha las CI expresan principalmente las proteínas S-100 y GFAP, y en menor medida vimentina. Por esta razón proponemos que el origen de estas células es neuroectodérmico.
- ✚ Las CI pueden expresar separadamente las proteínas S-100, GFAP y vimentina, sugiriendo que existen subpoblaciones celulares con diferentes funciones dentro del parénquima glandular.
- ✚ El incremento en la expresión de la proteína S-100 se observó durante el fotoperíodo corto, en paralelo a la gran actividad de los pinealocitos, indica una actividad sincronizada entre ambos tipos celulares.
- ✚ En vizcacha macho adulto las variaciones estacionales observadas para GFAP son concordantes a sus funciones intracelulares en la CI, asegurando una óptima actividad celular que acompaña la actividad de los pinealocitos.
- ✚ Los resultados de doble-IHQ demuestran la existencia de CI en diferentes estadios funcionales, probablemente relacionadas con las necesidades del microambiente celular.
- ✚ La presencia de células vimentina-positivas en la glándula pineal de especímenes adultos sugiere la existencia de una población de células gliales inmaduras, constituyendo una población de reserva para reponer CI envejecidas, o como elementos regeneradores tras alguna lesión de las mismas.
- ✚ Las variaciones observadas en la expresión de los distintos marcadores en las CI, su regionalización y la red de comunicación intercelular que originan sus proyecciones citoplasmáticas sugieren que estas células participan en el proceso de regulación paracrina dentro de la glándula.
- ✚ Nuestros resultados sugieren que existe una relación directa entre la expresión de las proteínas S-100 y GFAP con la edad del animal. Además, el menor valor en el %CI-S-100 probablemente responda a una menor cantidad de CI en las pineales de estos animales.



- ✚ Los cambios observados en la expresión de las proteínas S-100 y GFAP, junto con las modificaciones en el %CI-S-100, demuestran una relación directa entre la actividad pineal y los niveles de hormonas ováricas durante la preñez.
- ✚ La presencia de melanina en la glándula pineal podría ser una consecuencia del desarrollo embrionario y dependiente diferencialmente de esteroides gonadales.
- ✚ La glándula pineal de la vizcacha hembra es muy sensible a los cambios en los niveles de hormonas ováricas y responde de forma consistente a ellas. Por el contrario, la glándula pineal de vizcacha macho no responde de la misma manera a los andrógenos, sino que es más sensible a los cambios estacionales ambientales.





# BIBLIOGRAFIA

Shawn Thornton "Healers in The Alchemical Forest" 2008



1. Achucarro N, Sacristan JM: Investigaciones histológicas e histopatológicas sobre la glándula pineal humana. Trab Lab Inv Biol 1912 X: 185-208.
2. Achucarro N: La estructura secretora de la glándula pineal humana. Bol Soc Esp Biol 1913 83-88.
3. Acosta M, Filippa V, Mohamed F. Folliculostellate cells in pituitary pars distalis of male viscacha: immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study. Eur J Histochem 2010 Jan 20;54(1): e1.
4. Acosta M, Mohamed F. Effect of the photoperiod and administration of melatonin on folliculostellate cells of the pituitary pars distalis of adult male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). Acta Histochem 2011 Oct;113(6):640-6.
5. Acosta M, Mohamed F. Immunohistochemical and morphometric study of pituitary pars distalis folliculostellate cells of nonpregnant and pregnant viscachas. Biotech Histochem 2013 May; 88(3-4):161-9.
6. Acosta M, Mohamed F. Pituitary pars intermedia of male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): a morphometric study of seasonal and age-related changes in immunohistochemistry. Cells Tissues Organs 2009 190(4):219-29.
7. Adler BA, Crowley WR. Evidence for gamma-aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in the female rat. Endocrinology 1986 Jan;118(1):91-7.
8. Aguilera-Merlo C, Fogal T, Sartor T, Domínguez S, Sosa M, Scardapane L, Piezzi R. Ultrastructural and biochemical seasonal changes in epididymal corpus and cauda of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). J Morphol 2009 Jul; 270(7):805-814.
9. Aguilera-Merlo C, Muñoz E, Domínguez S, Foscolo M, Scardapane L, De Rosas JC. Seasonal variations in the heterologous binding of viscacha spermatozoa. A scanning electron microscope study. Biocell 2005b 29: 243-251.
10. Aguilera-Merlo C, Muñoz E, Dominguez S, Scardapane L, Piezzi R. Epididymis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): morphological changes during the annual reproductive cycle. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2005a Jan;282(1):83-92.
11. Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard HF, Cox DR, Marks A Dunn RJ. Gene encoding the  $\alpha$ -subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down's syndrome. Science 1988 Mar 11; 239:1311-1313.

12. Alonso R. La glándula pineal. En: Tresguerres JAF, editor. Fisiología médica. 1999:891-901. Madrid: Ed. Interamericana McGraw-Hill.
13. Anderson E. The anatomy of the bovine and ovine pineals. Light and electron microscopic studies. *J Ultrastruct Res* 1965 8 (Suppl):1-80.
14. Arendt J. Melatonin and the mamalian pineal gland. Ed. Champan & Hall. London, 1995 1-26.
15. Arendt J. Melatonin. *Clinical Endocrinology* 1988 29(2):205-229.
16. Arendt J. Role of the pineal gland and melatonin in season al reproductive function in mammals. *Oxford Rev Reprod Biol* 1986 8:266-320.
17. Ariëns-Kappers J. Short history of pineal discovery and research. En: Ariëns-Kappers J, Pevet P, editors. The pineal gland of vertebrates including man. *Prog Brain Res*. 1979 52:1-22. Ámsterdam-Nueva York. ElSevier.
18. Ariznavarreta C, Villanúa MA, Cardinali DP, Tresguerres JAF. Ritmos Biológicos. En: El espectro bipolar. Palomo T, Beninger RJ, Jiménez-Arriero MA, Huertas E. 2002 211-240. Madrid. Editorial CYM.
19. Arstila AU. Electron microscopic studies on the structure and histochemistry of the pineal gland of the rat. *Neuroendocrinol* 1967 2: 1-101.
20. Axelrod J, Wurtman RL. Photic and neural control of indoleamine metabolism in the rat pineal gland. *Adv Pharmacol* 1968 6:157-166.
21. Banks W. *Applied Veterinary Histology* (3er Ed). 1993 Mosby-Year book.
22. Barghmann W. Die Epiphysis Cerebri. In VON MOLLENDORFF ED., *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen*. 1943 309-502. Springer, Berlin.
23. Bargmann W. Histología y anatomía macroscópica humanas. In Anonymous, 1981 372-378. Barcelona. Editorial Espaxs, S.A.
24. Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL, Goldman BD. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* 1993 Nov;15(4):161-90.
25. Beltrán D. Estudio comparativo de la organización estructural y funcional de la pineal en la especie ovina. 2003. Valencia: Departamento de Ciencias Morfológicas, Universidad de Valencia.
26. Benstaali C, Mailloux A, Bogdan A, Auzéby A, Touitou Y. Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents. Their relationship with the light-dark cycle. *Life Sci* 2001 68:2645-2656.



27. Bertolucci C, Foa A. Extraocular photoreception and circadian entrainment in nonmammalian vertebrates. *Chronobiol Int* 2004 Jul; 21(4-5):501-519.
28. Beshay V.E., Carr B.R. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle 2013. In: Falcone T., Hurd W. (eds) *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*. Springer, New York, NY.
29. Bhatnagar KP, Hilton FK. Observations on the pineal gland of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*: possible correlation of melanin intensification with constant darkness. *Anat Rec* 1994 Nov; 240(3):367-376.
30. Bhatnagar KP. Ultrastructure of the pineal body of the common vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Am J Anat* 1988 Feb; 181(2):163-178.
31. Bhattacharya B, Noad RJ, Roy P. Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virol J* 2007 Jan; 15:4:7.
32. Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevette D, Moore BW, Brackenbury R, Ratner N. S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J Neurobiol* 1992 Jun; 23(4):451-66.
33. Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 1972 43:429-435.
34. Bishnupuri KS, Haldar C. Impact of photoperiodic exposures during late gestation and lactation periods on the pineal and reproductive physiology of the Indian palm squirrel, *Funambulus pennanti*. *J Reprod Fertil* 2000b 118: 295-301.
35. Bishnupuri KS, Haldar C. Profile of organ weights and plasma concentrations of melatonin, estradiol and progesterone during gestation and post-parturition periods in female Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. *Indian J Exp Biol* 2000a 38: 974-981.
36. Bogdan C. Interaction of circadian, ultradian and infradian rhythms. En: *Biological clocks. Mechanisms and applications*. Touitou Y. (ed.), 1998. 141-150 Elsevier Science, New York.
37. Bontti EE, Boo RM, Lindström LI, Elia OR. Botanical composition of cattle and viscacha diets in central Argentina. *Journal of Range Management* 1999 52:370-377.
38. Borigin J, Wang MM, Snyder S. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 1995 378:783-785.

39. Borregón A, Boya J, Calvo JL, López-Muñoz F. Immunohistochemical study of the pineal glial cells in the postnatal development of the rat pineal gland. *J Pineal Res* 1993 14:78-83.
40. Bowie EP, Herbert DC. Immunocytochemical evidence for the presence of arginine vasotocin in the rat pineal gland. *Nature (London)*. 1976 261:66.
41. Boya J, Calvo JL, Rancaño D. Structure of the pineal gland in the adult cat. *J Pineal Res* 1995 Mar;18(2):112-118.
42. Boya J, Calvo JL. Immunohistochemical study of the pineal astrocytes in the postnatal development of the cat and dog pineal gland. *J Pineal Res* 1993 Aug;15(1):13-20.
43. Boya J, Calvo JL. Structure and ultrastructure of the aging rat pineal gland. *J Pineal Res* 1984 1(1):83-89.
44. Branch LC, Villareal D, Fowler GS. Recruitment, dispersal, and group fusion in a declining population of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*; Chinchillidae). *J Mammal* 1993 74:9–20.
45. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 2008 May-Jun;84(3):539–549.
46. Brenner, M. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol* 1994 4:245 –257.
47. Bronson FH. *Mammalian Reproductive Biology*. 1989: 28-59 Chicago: University of Chicago Press.
48. Bünning E. Opening address. *Biological Clocks*. Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol 1960 25:1–9.
49. Busolini FI, Gallol LE, Rodríguez GB, Filippa VP, Mohamed FH. Interstitial Cells in the Pineal Gland of Pregnant and Nonpregnant Viscachas (*Lagostomus maximus maximus*): A Morphometric and Biochemical Study. *Cells Tissues Organs* 2018;205(4):240-250. doi: 10.1159/000492792.
50. Busolini FI, Rodríguez GB, Filippa VP, Mohamed FH. Pigmented Cells in the Pineal Gland of Female Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): A Histochemical and Ultrastructural Study. *Int J Endocrinol* 2017a; 2017:7492960. doi: 10.1155/2017/7492960.
51. Busolini FI, Rosales GJ, Filippa VP, Mohamed FH. A Seasonal and Age-Related Study of Interstitial Cells in the Pineal Gland of Male Viscacha (*Lagostomus*

- maximus maximus*). Anat Rec (Hoboken) 2017b Oct;300(10):1847-1857. doi: 10.1002/ar.23621.
52. Cajal SR. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. II. 1904. Editorial Moya, Madrid.
  53. Calderón C, Fuentes L, Muñoz E, Møller M, Pelzer L. Daily rhythms of norepinephrine,  $\beta_1$ -adrenoceptor mRNA, serotonin, arylalkylamine *N*-acetyltransferase mRNA, arylalkylamine *N*-acetyltransferase and hydroxyindol-*O*-methyltransferase activities, and melatonin in the pineal gland of viscacha. J Biol Rhythm Res 2008 39(2):93-107.
  54. Calderón C, Mohamed F, Muñoz E, Fogal T, Pelzer L, Penissi A, Piezzi R. Daily morphological variations in the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) retina. Probable local modulatory action of melatonin. Anat Rec 2002 Apr 1;266(4):198-206.
  55. Calderón C, Muñoz E y Pelzer L. Effect of Lithium on the Rhythms of Melatonin in the Pineal Gland, Serum and Retina of Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). J Biol Rhythm Res 2001 32(2):179-189.
  56. Calvo JL, Boya J, Borregón A, García-Mauriño JE. Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. Endocrinol 1988a 220(4):424-428.
  57. Calvo JL, Boya J, García-Mauriño JE, Rancaño D. Presence of melanin in the cat pineal gland. Acta Anat 1992 145:73-8.
  58. Calvo JL, Boya J, Garcia-Mauriño JE. Ultrastructure of the Pineal Gland in the Adult Dog. J Pineal Res 1988b 5(5):479-487.
  59. Calvo JL, Boya J. Embryonic development of the rat pineal gland Anat Rec. 1981b 200:491-500.
  60. Calvo JL, Boya J. Ultrastructural study of the embryonic development in the rat pineal gland. Anat Rec 1981a 199:545-553.
  61. Calvo JL, Boya J. Ultrastructure of the pineal gland in the adult rat. J Anat 1984 May; 138:405-409.
  62. Calvo JL, Boya J. Ultrastructure of the rat pineal stalk. Acta Anat 1985 123:172-177.
  63. Calvo JL, Boya L, García-Mauriño JE, Lopez-Carbonell A. Structure and ultrastructure of the pigmented cells in the adult dog pineal gland. J Anat 1988c 160: 67-73.

64. Cardinali DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 1998 Aug; 2(3):175-190.
65. Cardinali DP, Vacas MI, Gejman PV, Pisarev MA, Borontini M, Boado RJ, Juvenal GJ. The sympathetic superior cervical ganglia as 'little neuroendocrine brains'. *Acta Physiol Latinoam* 1983 33:205- 221.
66. Cardinali DP, Vacas MI, Gejman PV. The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. *J Neural Transm.* 1981 52:1-21.
67. Cardinali DP. Melatonin: A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 1981 2:327-346.
68. Cassone VM, Chesworth M, Armstrong SM. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injections of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* 1986 36:1111-1121.
69. Cermakian N, Sassone-Corsi P. Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr Opin Neurobiol* 2002 12:359-365.
70. Cernuda-Cernuda R, Piezzi RS, Domínguez S & Álvarez-Uría M. Cell populations in the pineal gland of the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). Seasonal variations. *Histol Histopatol* 2003 18:827-836.
71. Chang YS, Cheung YM, Pang SF. Pulsatile release of pineal melatonin in the rabbit. En: Reiter RJ and Pang SF, editor., 1989 185-188. *Advances in Pineal Research* Londres: John Libbey.
72. Chaves EM, Aguilera-Merlo C, Cruceño A, Fogal T, Piezzi R, Scardapane L, Dominguez S. Seasonal morphological variations and age-related changes of the seminal vesicle of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): an ultrastructural and immunohistochemical study. *Anat Rec (Hoboken)* 2012 May;295(5):886-95.
73. Chaves EM, Aguilera-Merlo C, Filippa V, Mohamed F, Dominguez S, Scardapane L. Anatomical, histological and immunohistochemical study of the reproductive system accessory glands in male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anat Histol Embryol* 2011 Feb;40(1):11-20.
74. Chen H, Fernig DG, Rudland PS, Sparks A, Wilkinson MC, Barraclough R. Binding to intracellular targets of the metastasis-inducing protein, S100A4 (p9Ka). *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Sep 7;286(5):1212-7.
75. Cignolani HE, Houssay AB. *Fisiología Médica de Houssay*. 2000 7th ed., Buenos Aires: Editorial El Ateneo.



76. Clabough JW. Cytological aspects of pineal development in rats and hamsters. *Am J Anat* 1973 137:215-230.
77. Clarke. Structure of the pineal gland. *Proceedings of the Royal Society*. 1862 Vol. XI.
78. Condorelli DF, Nicoletti VG, Barresi V, Conticello SG, Caruso A, Tendi EA, Giuffrida Stella AM. Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. *J Neurosci* 1999 May 1;56(3):219–228.
79. Coon SL, McCune SK, Sugden D, Klein DC. Regulation of pineal b- adrenergic receptor mRNA: day/night rhythm b-adrenergic receptor/cyclic AMP control. *Mol Pharmacol* 1997;51:551-557.
80. Correia I, Chu D, Chou YH, Goldman RD, Matsudaira P. Integrating the Actin and Vimentin Cytoskeletons Adhesion-Dependent Formation of Fimbrin–Vimentin Complexes in Macrophages *J Cell Biol*. 1999 Aug 23; 146(4):831–842.
81. Cozzi B. Cells types in the pineal gland of the horse: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Anat Rec* 1986 Oct;216(2):165-174.
82. Cruceño AM, Aguilera-Merlo CI, Chaves EM, Mohamed FH. Epididymis of Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): A Morphological Comparative Study in Relation to Sexual Maturity. *Anat Histol Embryol* 2017 Feb;46(1):73-84.
83. Cruceño AM, de Rosas JC, Fóscolo M, Chaves EM, Scardapane L, Dominguez S, Aguilera-Merlo C. Effects of Photoperiod on Epididymal and Sperm Morphology in a Wild Rodent, the Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *ISRN Anat* 2012 Dec 2; 2013:128921.
84. D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci* 2013 Jun;14(6):12222–12248.
85. Dahl D, Rueger DC, Bignami A, Weber K, Osborn M. Vimentin, the 57000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur J Cell Biol* 1981 24:191-196.
86. Darksche-witsch L. Zur Anatomie der glandula pinealis. 1886 2:29. *Neurologisches Centralblatt*.
87. Darwin C. *On the Origin of Species*. 1859 (On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life).
88. David GF, Herbert J & Wright GD. The ultrastructure of the pineal ganglion in the ferret. *J Anat* 1973 May;115(1):79-97.

89. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzales L, Tablada M, Robledo CW. 2011 InfoStat Versión 2011, *Grupo InfoStat*, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
90. Ding JM, Cheng D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shift by glutamate and NO. *Science* 1994 266:1713-1717.
91. Domínguez Nora Susana. Aspectos morfológicos y ultraestructurales de la glándula pineal del *Lagostomus maximus Maximus*. Director: Dr. Ramón Salvador Piezzi. Tesis doctoral para optar al grado de Doctora en Bioquímica. 1990. Universidad Nacional de San Luis, Argentina.
92. Dominguez S, Piezzi RS, Scardapane L, Guzman JA. A light and electron microscopic study of the pineal gland of the viscacha (*Lagostomus maximus Maximus*). *J Pineal Res* 1987 4(2):211-219.
93. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 2009 Jun;1793(6):1008-1022.
94. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calciumbinding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999 1450:191–231.
95. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003 Apr 15;60(6):540-51.
96. Donato R. Perspectives in S100 protein biology, *Cell Calcium* 1991 12:713–726.
97. Donato R. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001 Jul;33(7):637-68.
98. Dorfman VB, Saucedo L, Di Giorgio NP, Inserra PI, Fraunhoffer N, Leopardo NP, Halperín J, Lux-Lantos V, Vitullo AD. Variation in progesterone receptors and GnRH expression in the hypothalamus of the pregnant South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia). *Biol Reprod* 2013 Nov 14;89(5):115. doi: 10.1095/biolreprod.113.107995. Print 2013.
99. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 2010 Sep;62(3):343-80.

100. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003 Sep 1;8:d1093-108.
101. Duncan D, Micheletti G. Notes on the fine structure of the pineal organ of cats. *Tex ReID Biol Med* 1966 24:576-587.
102. Duprey P, Paulin, D. What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int J Dev Biol* 1995 39:443-57.
103. Ebadi M. Regulation of synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. En: Reiter RJ, editor. *The pineal gland*. 1984; 1-37. Nueva York: Raven Press.
104. Ebels I, Noteborn HPJM: Pineal peptides: current status. En: *The pineal gland. Current state of pineal research* (Mess B, Ruzsas C, Tima L, Pevet P, eds.) 1985 11-123. Akademiai Kiado Budapest.
105. El Qandil S, Chakir J, El Moussaouiti R, Oukouchoud R, Rami N, Benjelloun WA & Lakhdar-Ghazal N. Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Brain Res Bull* 2005 64(5):371-380.
106. Elliott JA, Goldman BD. *Seasonal Reproduction: Photoperiodism and Biological Clocks*. 1981. New York, USA: Plenum Press.
107. Eng LF, Gerstl B, Vanderhaeghen JJ. A study of proteins in old multiple sclerosis plaques. *Trans Am Soc Neurochem* 1970 1:42.
108. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 2000 Oct;25(9-10):1439-51.
109. Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 1971 28:351-354.
110. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 2009 Jul;119(7):1763-71.
111. Erren TC, Reiter RJ, Piekarski C. Light, timing of biological rhythms, and chronodisruption in man. *Naturwissenschaften*. 2003 Nov;90(11):485-94.
112. Fanò G, Marsili V, Angelella P, Aisa MC, Giambanco I, Donato R. (1989). S-100a0 protein stimulates  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. *FEBS Lett* Sep 25;255(2):381-4.

113. Fawcett D. Tratado de Histología (Bloom-Fawcett, 12<sup>a</sup> Ed.). 1995. Madrid. Interamerica.
114. Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, and Double KL. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2005 75(2):109-124.
115. Filippa VP, Mohamed F Immunohistochemical study of somatotrophs in pituitary Pars Distalis of male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) in relation to the gonadal activity. *Cell Tissue Organs* 2006b 184:188-197.
116. Filippa VP, Mohamed F. ACTH cells of pituitary pars distalis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): immunohistochemical study in relation to season, sex, and growth. *Gen Comp Endocr* 2006a 146:217-225.
117. Filippa VP, Mohamed F. Immunohistochemical and morphometric study of Pituitary Pars Distalis Thyrotrophs of male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): seasonal variations and effect of melatonin and castration. *Anat Rec* 2008 291:400-409.
118. Filippa VP, Mohamed F. Morphological and morphometric changes of pituitary lactotrophs of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) in relation to reproductive cycle, age and sex. *Anat Rec* 2010. 293:150-161.
119. Filippa VP, Penissi A, Mohamed F. Seasonal variations of gonadotropins in the pars distalis male viscacha pituitary. Effect of chronic melatonin treatment. *Eur J Histochem* 2005 49:291-300.
120. Filippa VP, Rosales GJ, Cruceño AM, Mohamed F. Androgen Receptors Expression in Pituitary of Male Viscacha in relation to Growth and Reproductive Cycle. *Int J Endocrinol* 2015; 2015:168047. doi: 10.1155/2015/168047.
121. Fiske VM, Huppert LC. Melatonin action on pineal varies with photoperiod. *Science* 1968 162:279.
122. Foa C. Hypertrofié der testicules et de la crete, après léxtirpation de la glande pinéale chez le coq. *Arch Ital Biol* 1912 57:233-252.
123. Foley JM, Baxter D. On the nature of pigment granules in the cells of the locus coeruleus and substantia nigra, *J Neuropathol Exp Neurol* 1958 17(4):586-598.
124. Forcada F. El papel del fotoperiodo y la melatonina en la actividad reproductora. 2000. Monografía ovis n° 71: 1-86.



125. Forsberg M, Fougner JA, Hofmo PO, Einarsson EJ. Effect of melatonin implants on reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). J Reprod Fertil 1990 Jan;88(1):383-8.
126. Foster RG. Seeing the light... in a new way. J Neuroimmunol 2004 Feb;16(2):179-180.
127. Franco A, Regodon S, Masot AJ, Redondo E. A combined immunohistochemical and electron microscopic study of the second cell type in the developing sheep pineal gland. J Pineal Res 1997 22:130-136.
128. Fraunhoffer NA, Jensen F, Leopardo N, Inserra PIF, Abuelafia AM, Espinosa MB, Charif SE, Dorfman VB, Vitullo AD. Hormonal behavior correlates with follicular recruitment at mid-gestation in the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). Gen Comp Endocrinol 2017 Sep 1; 250:162-174. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.06.010. Epub 2017
129. Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Gonçalves CA. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. Neurochem Res 2004 Apr;29(4):735-40.
130. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. Annu Rev Biochem 1994; 63:345-82.
131. Fuentes LB, Calvo JC, Charreau EH, Guzman JA. Seasonal variations in testicular LH, FSH, and PRL receptors, in vitro testosterone production, and serum testosterone concentration in adult male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). Gen Comp Endocr 1993 90:133-141.
132. Fuentes LB, Caravaca N, Pelzer LE, Scardapane LA, Piezzi RS & Guzmán JA. Seasonal variations in the testis and epididymis of viscacha (*Lagostomus maximus Maximus*). Biol Reprod 1991; 45:493-497.
133. Fulle S, Pietrangelo T, Mariggiò MA, Lorenzon P, Racanicchi L, Mozrzymas J, Guarnieri S, Zucconi-Grassi G, Fanò G. Calcium and fos involvement in brain-derived Ca(2+)-binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells. Exp Physiol 2000 May;85(3):243-53.
134. Gallol LE, Mohamed FH. Immunomorphometric variations of sustentacular cells of the male viscacha adrenal medulla during the annual reproductive cycle. Effects of androgens and melatonin. Acta Histochem 2018 May;120(4):363-372.

135. Ganguly S, Coon SL & Klein DC. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 2002;309: 127-137.
136. Ganguly S, Coon SL, Klein DC. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 2002 Jul;309(1):127-37.
137. García Fernández JM. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neurales. *En: Manual de Neurociencia*. Delgado-García JM., Ferrús A., Mora F. Rubia F. 1998 778-799 Síntesis, Madrid.
138. Garcia-mauriño JE, Boya J, Lopez-muñoz F, Calvo JL: Immunohistochemical localization of nerve growth factor in the rat pineal gland. *Brain Res* 1992 585:255-259.
139. Gehring JM. New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J Hered* 2005 96:171–184.
140. Gerlach T, Aurich JE. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim Reprod Sci* 2000 Mar 15;58(3-4):197-213.
141. Gil E, Calderón C, Pelzer L, Domínguez S, Fogal T, Scardapane L, Piezzi RS. Morphological and biochemical study of the pineal gland of pregnant and nonpregnant female vizcachas (*Lagostomus maximus maximus*),” *Neuro Endocrinol Lett* 2005 Oct;26(5):575–580.
142. Gil E, Forneris M, Domínguez S, Penissi A, Fogal T, Piezzi RS, Scardapane L. Morphological and endocrine study of the ovarian interstitial tissue of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anat Rec (Hoboken)* 2007 Jul;290(7):788-94.
143. Girod C, Durand N. Immunocytochemical localization of S100 in interstitial cells of the monkey *Macaca irus* pineal gland. *Neurosci lett* 1985 Jun 12;57(2):181-184.
144. Goldman BD. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 2001 Aug;16(4):283-301.
145. Goldman BD. The Siberian hamster as a model for study of the mammalian photoperiodic mechanism. *Adv Exp Med Biol* 1999; 460:155-64.
146. Gonzales M, Weksler B, Tsuruta D, Goldman RD, Yoon KJ, Hopkinson SB, Flitney FW, Jones JC. 2001. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 12:85-100.

147. González G, Álvarez-Uría M. La glándula pineal de los mamíferos. 1984. Universidad de Oviedo. Oviedo, España.
148. González G, Álvarez-Uría M. Ultraestructura de la glándula pineal de los mamíferos. II. Célula Intersticial. Trab. Inst. Cajal Inv. Biol 1970 62: 29-37.
149. González-Brito A, Jones DJ, Adame RM, Reiter RJ. Characterization and measurement of [125I]-iodopindol binding in individual rat pineal glands: existence of a 24-h rhythm in b-adrenergic receptor density. Brain Res 1988; 738: 108-114.
150. Graham DG. On the origin and significance of neuromelanin. Arch Pathol Lab Med 1979 Jul;103(7):359-362.
151. Gregorek JC. The ultrastructure of the pineal gland of normal and enucleated gerbils. Anat Rec 1973;175:333.
152. Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, McLeod W, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C. Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down's syndrome and Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 1989 Oct; 86(19):7611-7615.
153. Guerrero JM, Carrillo-Vico A, Lardone PJ. La Melatonina. Investigación y Ciencia 2007 30-38.
154. Gusek W, Buss H, Wartenberg H: Weitere Untersuchungen zur Feinstruktur der Epiphysis cerebri normaler und vorbehandelter Ratten. Rrog Brain Res 1965 10:317-331.
155. Gutzeit R. Ein teraton der Zilbeldrüse. 1896 Königsberg.
156. Guzmán JA, Pelzer LE, Piezzi RS, Scardapane L, Dominguez S. Hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT), catechol-O-methyltransferase (COMT) and histamine-N-methyltransferase (HNMT) in the pineal gland of the vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). J Neural Transm 1980;47(1):23-8.
157. Guzmán JA, Piezzi RS, Pelzer de García LE, Domínguez S, Scardapane LA. Exposure to constant light increases pineal weight and RNA content in the pineal of the vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). Acta Physiol Lat Am 1983 33(2):145-8.
158. Hagemann G. Ueber den bau des Conarium. Arch. F. Anat. Physiol U. Viss. Med., 1872 pp 429-454. 1 pl. Leipzig.
159. Hajós F, Bascó E. The surface-contact glia. Adv Anat Embryol Cell Biol 1984; 84:1-79.

160. Hajós F, Halasy K. Pre-or postembedding immunocytochemistry: which to choose for the localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)? J Neurosci Methods 1998 Nov 1;85(1):99-105.
161. Hall PP. The influence of hormones on melanogénesis. Australas J of Dermatol 1969 10(3):125–139.
162. Haus E, Lakatua DJ, Sackett-Lundee L, Dumitriu L, Nicolau G, Petresan E, Pliga L, Bogdan C. Interaction of circadian, ultradian and infradian rhythms. En: Biological clocks. Mechanisms and applications. Touitou, Y. (ed.), 1998 pp: 141-150 Elsevier Science, New York.
163. Heideman PD, Bronson FH. Photoperiod, melatonin secretion, and sexual maturation in a tropical rodent. Biol Reprod 1990 Nov;43(5):745-50.
164. Henle. Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen. Nervenlhre. 1887 pp.322.
165. Herbert J. The role of pineal gland in the control by light of the reproductive cycle of the ferret. In: The pineal gland (Wolstenholme GEW, Knight J, eds.) 1971 pp: 303-327. Churchill Livingstone, Edinburgh and London.
166. Herbison AE1, Dyer RG. Effect on luteinizing hormone secretion of GABA receptor modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge. Neuroendocrinology. 1991 Mar;53(3):317-20.
167. Hernández Díaz FJ, Sánchez, JJ, Abreu González P, Alonso Solis R. La glándula pineal como transductor neuroendocrino. Endocrinol Nutr 2001; 48:303-12.
168. Hernández FJ, Abreu P, Díaz Cruz AT, Alonso R. Simultaneous HPLC analysis of tryptophan hydroxylase activity and serotonin metabolism in rat pineal gland: determination of its kinetics properties. J Liquid Chromatogr 1994; 13: 2939-2950.
169. Herrling T, Jung K, Fuchs J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2008 May; 69(5):1429–1435.
170. Hewing M, Bergmann M. Differential permeability of pineal capillaries to lanthanum ion in the rat (*Rattus norvegicus*), gerbil (*Meriones unguiculatus*) and golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Cell Tissue Res 1985; 241(1):149-154.
171. Homan SM, Mercurio AM, LaFlamme SE. Endothelial cells assemble two distinct alpha6beta4-containing vimentin-associated structures: roles for ligand binding and the beta4 cytoplasmic tail. J Cell Sci 1998 Sep;111(Pt 18):2717-2728.



172. Honma S, Katsuno Y, Shinohara K, Abe H, Honma K. Circadian rhythm and response to light of extracellular glutamate and aspartate in rat suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol* 1996 Sep; 271(3 Pt 2):579-585.
173. Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100 $\beta$  induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 1997; 69:2294–301.
174. Huang SK, Klein DC, Korf HW. Immunocytochemical demonstration of rod-opsin, S-antigen, and neuron-specific proteins in the human pineal gland. *Cell Tissue Res* 1992 Mar; 267(3):493–498.
175. Huang SK, Nobuung R, Schachner M, Taugner R. Interstitial and parenchymal cells in the pineal gland of the golden hamster. A combined thin-section, freeze-fracture and immunofluorescence study. *Cell Tissue Res* 1984; 235:327-337.
176. Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* 1994 Jul; 4(3):239-43.
177. Isobe T, Okuyama T. The amino acid sequence of the S100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium binding proteins. *Eur J Biochem* 1978; 89:379–388.
178. Isobe T, Okuyama T. The amino acid sequence of the  $\alpha$ -subunit in bovine brain S100a protein. *Eur J Biochem* 1981; 116:79–86.
179. Ito T, Matsushima S: Electron microscopic observations on the mouse pineal, with particular emphasis on its secretory nature. *Arch Histol Jpn* 1968 Dec; 30(1):1-15.
180. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 2007 Jun 10; 313(10):2050-62.
181. Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ. PKC $\epsilon$ -mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J* 2005; 24:3834-3845.
182. Iwasaki Y, Shiojima T, Kinoshita M. S100 $\beta$  prevents the death of motor neurons in newborn rats after sciatic nerve section. *J Neurol Sci* 1997 Oct 3; 151(1):7-12.
183. Jackson JE. Reproductive parameters of the plains vizcacha (*Lagostomus maximus*) in San Luis province, Argentina. *Vida Sylv Neotrop* 1989 2:57–62.
184. Janosch P, Kieser A, Eulitz M, Lovric J, Sauer G, Reichert M, Gounari F, Büscher D, Baccarini M, Mischak H, Kolch W. The Raf-1 kinase associates with vimentin kinases and regulates the structure of vimentin filaments. *FASEB J* 2000 Oct; 14(13):2008-21.

185. Jensen F, Willis MA, Leopardo NP, Espinosa MB, Vitullo AD. The ovary of the gestating South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*): suppressed apoptosis and corpora lutea persistence. *Biol Reprod* 2008 Aug;79(2):240-6.
186. Jeung EB, Leung PC, Krisinger J, The human calbindin-D9k gene. Complete structure and implications on steroid hormone regulation, *J Mol Biol* 1994; 235:1231–1238.
187. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text & Atlas. 10<sup>th</sup> ed. 2003. Lange Medical Books Mc Graw-Hill.
188. Kafka M, Maragos PJ, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Brain Res* 1985; 327:344-347.
189. Kappers JA. Localization of indoleamine and protein synthesis in the mammalian pineal gland. *J Neural Transm* 1978 (13):13-24.
190. Kappers JA. Short history of pineal discovery and research. In: The pineal gland of vertebrates including man (Kappers JA, Schadé RE, eds.). *Prog Brain Research* 1979; 52: 1-22. Elsevier, Amsterdam-New York.
191. Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch* 1960 52:163-215.
192. Kappers JA. The mammalian pineal glarid, a survey. *Acta Neurochir (Wien)* 1976; 34:109-149.
193. Karasek M, Lewinska I, Lewinski A, Hansen JT, Reiter RJ. Ultrastructure of rat pinealocytes during the last phase of pregnancy. *Cytobios* 1982 33:103–110.
194. Karasek M, Reiter RJ. Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech* 1992 Apr 1;21(2):136–157.
195. Karasek M. The cilia in the white rat pineal gland. *J Microsc* 1970 9:1103-1104.
196. Karasek M. Ultrastructure of the mammalian pineal gland: Its comparative and functional aspects. En: *Pineal Research Reviews*, (Reiter RJ, ed.). 1983 1:1-48. Alan R. Liss, New York.
197. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965; 27(2):137-138A.
198. Karsch FJ, Malpaux B, Wayne NL, Robinson JE. Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 1988; 28(2B):459-72.

199. Kasper M, Terpe HJ, Perry G. Age-dependent pattern of intermediate filament protein expression in the human pineal gland. *J Hirnforsch.* 1990;31(2):215-21.
200. Kassam G, Le BH, Choi KS, Kang HM, Fitzpatrick SL, Louie P, Waisman DM. The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation, *Biochemistry* 1998; 37:16958–16966.
201. Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), *Biochim Biophys Acta* 1998;1448:200–211.
202. Kim J, Kim HW, Chang S, Kim JW, Je JH, Rhyu IJ. Growth patterns for acervuli in human pineal gland. *Sci Rep* 2012; (2):984.
203. King TS, Steger RW, Steinlechner S, Reiter RJ. Day-night differences in estimates rates of 5-hydroxytryptamine turnover in the rat pineal gland. *Exp Brain Res* 1984; 54: 432-436.
204. Kiryushko D, Novitskaya V, Soroka V, Klingelhofer J, Lukanidin E, Berezin V, Bock E. (2006). Molecular mechanisms of  $Ca^{(2+)}$  signaling in neurons induced by the S100A4 protein. *Mol Cell Biol* May;26(9):3625-38.
205. Kitay JI, Altschule MD. The pineal gland. 1954 Harvard Univ. Press, Cambridge
206. Klein D, Berg GR. Pineal gland: Stimulation of melatonin production by norepinephrine involves cyclic AMP-mediated stimulation of N-acetyltransferase. *Adv Biochem Physicopharmacol* 1970; 3: 241-263.
207. Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Bégay V, Falcón J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:307-57.
208. Klein DC, Moore RY, Reppert SM. SUPRACHIASMATIC NUCLEUS: The Mind's clock. 1991 3-15 Oxford University Press USA.
209. Klein DC, Schaad NL, Namboodori L, Yu L, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem Soc Transact* 1992; 20:299-304.
210. Klein DC, Weller JL, Moore RY: Melatonin metabolism: Neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc Nat Acad Sci (Wash)* 1971;68:3107-3110.
211. Klein DC. Circadian rhythms in the pineal gland. En: Krieger D, editor. *Endocrine rhythms* 1979; 203-223 Nueva York: Raven Press.
212. Kligman D, Marshak DR. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 Oct;82(20):7136-9.

213. Korf HW, Møller M. The central innervation of the mammalian pineal organ. En: The pineal gland (Mess B, Ruzsás C, Time L, Pevet P, eds.). Akadémiai Kiado, Budapest 1985:58-69.
214. Korf HW, Møller M. The innervation of the mammalian pineal gland with especial reference to the central pinealopetal projections. En: Reiter JR, editor. Pineal research reviews: Alan R. Liss 1984:41-86 Nueva York.
215. Korf HW, Sato T, and Oksch A. Complex relationships between the pineal organ and the medial habenular nucleuspretectal region of the mouse as revealed by S-antigen immunocytochemistry. *Cell Tissue Res* 1990 Sep;261(3):493-500.
216. Korf HW, White BH, Schaad NC, Klein DC. Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res* 1992 Nov;595(1):57-66.
217. Koshy S, Vettivel SK. Melatonin Pigments in Human Pineal Gland. *J Anat Soc India* 2001b; 50(2):122-126.
218. Koshy S, Vettivel SK. Varying appearances of calcification in human pineal gland: a light microscopic study. *J Anat Soc India* 2001a;50(1):17-18.
219. Kreis S, Schönfeld HJ, Melchior C, Steiner B, Kieffer N. The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin  $\alpha 2/\beta 1$  cytoplasmic tail complex and co-localizes with native  $\alpha 2/\beta 1$  in endothelial cell focal adhesions. *Exp Cell Res* 2005 Apr 15;305(1):110-21.
220. Larsen PJ, Enquist LW, Card JP. Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur J Neurosci* 1998; 10:128-145.
221. Lasso de la Vega JS. Los grandes filósofos griegos y la medicina. In: Lain Entralgo P, director. *Historia universal de la medicina. Tomo II, Antigüedad Clásica.*, S.A. 1972 37–72 Barcelona: Salvat Editores.
222. Lee SW, Tomasetto C, Swisshelm K, Keyomarsi K, Sanger R. Down-regulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and re-expression by azadeoxycytidine treatment. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1992 Mar;89(6):2504–2508.
223. Lehtonen E, Virtanen I, Saxén L. Reorganization of intermediate filament cytoskeleton in induced metanephric mesenchyme cells is independent of tubule morphogenesis. *Dev Biol* 1985 108:481-490.



224. Leonhardt H. Ependym und Circumventriculare Organe. In: Hdb. d. mikrosk. Anatomie d. Menschen (A Oksche, L Vollrath, Hrsg.), Ed., IV/10 (A Oksche, Hrsg). 1980 pp.177-666 Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
225. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J Am Chem Soc 1958; 80:2537.
226. Lerner AB, Case JD. Structure of melatonin. J Am Chem Soc 1959; 81:6084-6085.
227. Leukert N, Vogl T, Strupat K, Reichelt R, Sorg C, Roth J. Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. J Mol Biol 2006 Jun 16;359(4):961-72.
228. Lew GM. Morphological and biochemical changes in the pineal gland in pregnancy. Life Sci 1987; 41:2589–2596.
229. Lewczuk B, Ziółkowska N, Prusik M, Przybylska-Gornowicz B. Diurnal profiles of melatonin synthesis-related indoles, catecholamines and their metabolites in the duck pineal organ. Int J Mol Sci 2014 Jul 16;15(7):12604-30.
230. Leydig F. Traité d'Histologie comparée de l'homme et des animaux. (Trad. Franc.) 1866; 199.
231. Li K, Welsh MG. S-antigen and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the in situ pineal gland of hamster and gerbil and in pineal grafts: developmental expression of pinealocyte and glial markers. Am J Anat 1991 Dec;192(4):510-22.
232. Liedtke, W., Edelmann, W., Bieri, P. L., Chiu, F. C., Cowan, N. J., Kucherlapati, R., and Raine, C. S. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. Neuron 1996; 17:607–615.
233. Llanos AC, Crespo JA. Ecología de la vizcacha (*Lagostomus maximus maximus* Blainv.) en el Nordeste de la Provincia de Entre Ríos. [Ecology of viscacha (*Lagostomus maximus maximus* Blainv.) in the northeast of Entre Rios province) (In Spanish)] 1954;10:5–95 Revista de Investigaciones Agrícolas.
234. Lokhorst GJ. Descartes and the pineal gland. Stanford Encyclopedia of Philosophy. 2008. <http://plato.stanford.edu/entries/pineal-gland/>.
235. López-Egido J, Cunningham J, Berg M, Oberg K, Bongcam-Rudloff E, Gobl A. Menin's interaction with glial fibrillary acidic protein and vimentin suggests a role for the intermediate filament network in regulating menin activity. Exp Cell Res 2002; 278:175-183.
236. López-Muñoz F, Álamo C. El Tratado del Hombre: Interpretación cartesiana de la neurofisiología del dolor. Asclepio Rev Hist Med Ciencia 2000; 52:239-267.

237. López-Muñoz F, Boya J, Calvo JL, Marín F. Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in rat pineal stalk astrocytes. *Histol Histopathol* 1992b;7:643- 646.
238. López-Muñoz F, Boya J. El papel de la glándula pineal en la doctrina psicofisiológica cartesiana *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1992c;42: 205-216.
239. López-Muñoz F, Calvo JL, Boya J, Carbonell AL. Coexpresion of vimentin and glial fibrillary acidic protein in glial celís of the adult rat pineal gland. *J Pineal Res* 1992a;12:145-148.
240. Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylation: Measurement in pineal gland, brainstem and carcinoid tumor. *Science* 1967;155: 217-219.
241. Lowenthal A, Flament-Durand J, Karcher D, Noppe M, Brion JP. Glial cells identified by anti-alpha-albumin (anti-GFA) in human pineal gland. *J Neurochem.* 1982 Mar;38(3):863-5.
242. Lues, G. Die Feinstruktur der Zirbeldrüse normaler, trächtiger und experimentell beeinflusst der Meerschweinchen. *Z Zellforsch* 1971;114:38-60.
243. Luo ZR, Schultz RL, Whitter EF, Vollrath L. Ultrastructural characterization of glial cells in the rat pineal gland with special reference to the pineal stalk. *Anat Rec* 2 1984;10:663-674.
244. Macchi M, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25:177-195.
245. Maeda K, Naganuma M, Fukuda M, Matsunaga J, and Tomita Y. Effect of pituitary and ovarian hormones on human melanocytes in vitro. *Pigment Cell Res* 1996 Aug;9(4):204–212.
246. Mano H, Fukada, Y. A median third eye: pineal gland retraces evolution of vertebrate photoreceptive organs. *Photochem Photobiol* 2006. DOI: 10.1562/2006-02-24-IR-813 (phot.allenpress.com).
247. Marburg O. Die Physiologie der Zirbeldrüse (Glandula pinealis, Epiphysis) *Handb Norm Pathol Physiol* 1930;13:493-590.
248. Marques MD, Golombek DA, Moreni C. Adaptación temporal. En: *Cronobiología*. Marquez N, Menna-Barrteo L, Golombek DA. 1997; 57-97. Ed. EUDEBA Buenos Aires.
249. Martínez Soriano, F. Glándula pineal: Estructura y función. In Anonymous, 1987. Valencia. Editorial Gregori.

250. Matsushima S, Reiter RJ. Comparative ultrastructural studies of the pineal gland of rodents. in Comparative Ultrastructural Studies of the Pineal Gland of Rodents, M. Hess, 1975;335–356 Ed. John Willey and sons, New York.
251. Maywood ES, Bittman EL, Hastings MH. Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. Biol Reprod 1996 Feb;54(2):470-7.
252. McCall, MA, Gregg RG, Behringer RR., Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, Zhang CL, Pearce RA, Chiu SY, Messing A Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:6361–6366.
253. Meijer JH. Photic entrainment of mammals. En: Handbook of behavioural neurobiology: circadian clocks. Takahashi, JS., Turek FW y Moore RJ. 2001;183-222 (eds.) Kluwer Academics/Plenum Publisher, New York.
254. Meyer-Arendt J, Santamarina E. Identification of melanin in the bovine pineal gland. Acta Histochem 1956 Aug 20;3(1-2):1-5.
255. Miernicki M, Pospichal MW, Powers JB. Short photoperiods affect male hamster sociosexual behaviors in the presence and absence of testosterone. Physiol Behav 1990 Jan;47(1):95-106.
256. Mikami S. Cytological and histochemical studies of the pineal bodies of domestic animals. Tohoku J Agricult Res 1951;2:41-48.
257. Mikkelsen JO, Møller M. A direct neural connection from the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate nucleus to the deep pineal gland demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the rat. Brain Res 1990;520:342-347.
258. Min KW, Seo IS, Song J. Postnatal evolution of the human pineal gland. An immunohistochemical study. Lab Invest 1987 Dec;57(6):724-728.
259. Mohamed F, Fogal T, Domínguez S, Scardapane L, Guzmán J & Piezzi RS. Seasonal variations and ultrastructure of colloid accumulation in the pituitary pars distalis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). Biocell 1994;18:23-31.
260. Mohamed F, Fogal T, Domínguez S, Scardapane L, Guzmán J & Piezzi RS. Colloid in the pituitary Pars Distalis of viscacha (*Lagostomus maximus Maximus*): ultrastructure and occurrence in relation to season, sex and growth. Anat Rec 2000; 258: 252-261.

261. Mohamed F, Fogal T, Dominguez S, Scardapane L, Guzmán J, Piezzi RS. Ultrastructure of pars distalis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): pituitary cellular types. *Biocell* 1995;19:133–140.
262. Møller M, Baeres F. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 2002;309:139-150.
263. Møller M, Ingild E. Bock Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. *Brain Res* 1978;40: 1-13.
264. Møller M, Pujito PP, Morgan KC, Badiu C. Localization and diurnal expression of mRNA encoding the b1-adrenoreceptor in the rat pineal gland: an in situ hybridization. *Cell Tissue Res* 1997; 288:279-284.
265. Møller M. The ultrastructure of the human fetal pineal gland. I. Cell types and blood vessels. *Cell Tissue Res* 1974;152(1):13–30.
266. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system, *Biochem. Biophys Res Commun* 1965;19:739–744.
267. Moore RY, Klein DC. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* 1974;71:17-33.
268. Moore RY. Circadian timing. En: *Fundamental Neuroscience*. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL. y Squire LR. 1999:1189-1206 (eds.) Academic Press, San Diego.
269. Moore RY. The supraquiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. *Trends Neurosci* 1982; 5: 404-406.
270. Mora F, Sanguinetti AM. *Diccionario de neurociencias*. 2004. Alianza editorial, Madrid.
271. Moroz OV, Antson AA, Dodson EJ, Burrell HJ, Grist SJ, Lloyd RM, Maitland NJ, Dodson GG, Wilson KS, Lukanidin E, Bronstein IB. The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002 Mar;58(Pt 3):407-13.
272. Moroz OV, Dodson GG, Wilson KS, Lukanidin E, Bronstein IB. Multiple structural states of S100A12: A key to its functional diversity. *Microsc Res Tech* 2003 Apr 15;60(6):581-92.
273. Motoyama H. *Theories of the Chakras: Bridge to higher consciousness*. 1982 Ed. New Age Books.
274. Munch IC, Møller M, Larsen PJ, Vrang N. Light-induced c-Fos expression in suprachiasmatic nuclei neurons targeting the paraventricular nucleus of the hamster



- hypothalamus: Phase dependence and immunochemical identification. *J Comp Neurol* 2002;442(1):48-62.
275. Muñoz E, Calderón C, Fogal T, Domínguez S, Scardapane L, Guzmán J, Piezzi RS. Melatonina testicular: papel en la ciclicidad reproductiva. *Boletín Informativo SAA* 1999;8(4): 55-67.
276. Muñoz E, Fogal T, Dominguez S, Scardapane L, Guzmán J, Cavicchia JC, Piezzi RS. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anat Rec* 1998 Sep;252(1):8-16.
277. Muñoz E, Fogal T, Domínguez S, Scardapane L, Guzmán J, Piezzi RS. Seasonal changes of the Leydig cells of viscacha (*Lagostomus maximus Maximus*). A light and electron microscopy study. *Tissue Cell* 1997; 29:119-128.
278. Muñoz E, Fogal T, Domínguez S, Scardapane L, Piezzi RS. Ultrastructural and morphometric study of the Sertoli cell of the viscacha (*Lagostomus maximus Maximus*). *Anat Rec* 2001;262:176-185.
279. Murakami N, Singh SS, Chauhan VPS, Elzinga M. Phospholipid binding, phosphorylation by protein kinase C, and filament assembly of the COOH terminal heavy chain fragments of nonmuscle myosin II isoforms MIIA and MIIB. *Biochemistry* 1995 Dec; 34(49):16046–16055.
280. Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* 2006 Feb;8(2):156-62.
281. Nir I, Hirsschmann N, Goldhaber G, Shani J. Pinealectomy-induced changes in blood and pituitary luteinizing hormone and prolactine levels during the last phase of pregnancy in rats. *Neuroendocrinology* 1979;28:44–51.
282. Nir I, Hirsschmann N. The effect of pinealectomy on serum progesterone and oestradiol levels during the last phase of pregnancy in rats. *Experientia* 1980;36:259–260.
283. Nishikawa T, Lee ISM, Shiraishi N, Ishikawa T, Ohta Y, Nishikimi M. Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage, *J Biol Chem* 1997;272:23037–23041.
284. Nordlund JJ. The melanocyte and the epidermal melanin unit: an expanded concept. *Dermatol Clin* 2007 Jul;25(3):271–281.

285. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrang P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 2001Jun 1;61(11):1369-79.
286. Oshima RG. Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp Cell Res* 2007; 313(10):1981-1994.
287. Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, Heizmann CW, Kroneck PM, Fritz G. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J* 2007 Aug 22; 26(16): 3868–3878.
288. Pang SF, Tang PL, Tang GWK, Yam AWC, Ng KW. Plasma levels of immunoreactive melatonin, estradiol, progesterone, follicle stimulating hormone, and  $\beta$ -human chorionic gonadotropin during pregnancy and shortly after parturition in humans. *J Pineal Res* 1987;4:21–31.
289. Pangerl B, Pangerl A, Reiter RJ. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm* 1990; 81: 17-29.
290. Pedersen EB, Fox LM, Castro AJ, McNulty JA. Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res* 1993;2:257-265.
291. Peirson S, Foster RG. Melanopsin: another way of signaling light. *Neuron* 2006; 49:331–339.
292. Pekny M, Eliasson C, Chien CL, Kindblom LG, Liem R, Hamberger A, Betsholtz C. GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Expt. Cell Res* 1998;239:332–343.
293. Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 2004 Nov;204(4):428-37.
294. Pekny, M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J. Cell Biol* 1999; 145:503–514.
295. Pelzer LE, Calderón CP, Guzmán J. Changes in weight and hydroxyindole-O-methyltransferase activity of pineal gland of the plains viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Mastozool Neotrop* 1999; 6:31–38.

296. Perez Romera E, Mohamed F, Fogal T, Domínguez S, Piezzi R, Scardapane L. Effect of the photoperiod and administration of melatonin on the Pars Tuberalis of viscacha (*Lagostomus maximus Maximus*): an ultrastructural study. *Anat Rec* 2010 May;293(5):871-878.
297. Perez-Romera E, Mohamed F, Filippa V, Fogal T, Dominguez S, Scardapane L, Piezzi RS. Ultrastructural and immunocytochemical studies of the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) pituitary pars tuberalis. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005 May;284(1):431-8.
298. Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R, Fainzilber M. Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron*. 2005 Mar 3;45(5):715-26.
299. Pevet P, Smith AR. The pineal gland of the mole (*Talpa europaea* L.). II. Ultrastructural variations observed in the pinealocytes during different parts of the sexual cycle. *J Neural Transm* 1975;36:227–248.
300. Pevet P. The different classes of pineal peptides: Origin and probable physiological role during development. En: *The pineal gland during development* (Gupta G, Reiter RJ. 1986;224-247 (eds.) Croom Helm, London.
301. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxylradical-mediated oxidative damage, and aging: a Hypothesis. *J Pineal Res* 1993; 14: 151-168.
302. Quay WB. Indole biochemistry in pineal and retinal mechanisms. En: *Pineal and retinal relationships* (O' Brien P, Klein DC, 1986;107-118 (eds). Academic Press, Orlando.
303. Quay WB. Pineal Chemistry in Cellular and Physiological Mechanism. En: Thomas CC, editor. *Pineal Chemistry* 1974 Springfield.
304. Quinlan RA, Brenner M, Goldman JE, and Messing A. GFAP and its role in Alexander Disease. *Exp Cell Res*. 2007 Jun 10; 313(10): 2077–2087.
305. Quintanilla RH, Rizzo HF, Fraga CP. *Roedores perjudiciales para el agro en la República Argentina*. 1973 Ed. EUDEBA Lectores-Bs. As.
306. Rambotti MG, Spreca A, Leoncini P, Estenoz M, Costantino-Ceccarini E, Giambanco I, Donato R. Detection of S-100b protein in Triton cytoskeletons: an immunocytochemical study on cultured Schwann cells. *J Histochem Cytochem* 1990 Nov;38(11):1583-9.

307. Redondo E, Franco A, Masot AJ, Regodón S. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of interstitial cells in pre- and postnatal developing sheep pineal gland. *Eur J Histochem* 2001;45: 249-258.
308. Redondo E, Regodon S, Masot J, Gázquez A, Franco A. Postnatal development of female sheep pineal gland under natural inhibitory photoperiods: an immunocytochemical and physiological (melatonin concentration) study. *Histol Histopathol* 2003; 18(1):7-17.
309. Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(13):5178-82.
310. Regodón S, Franco A, Gazquez A, and Redondo E. Presence of pigment in the ovine pineal gland during embryonic development. *Histol Histopathol* 1998;13(1):147-154.
311. Regodón S, Franco A, Masot AJ, Redondo E. Immunohistochemical and ultrastructural study of interstitial cells during postnatal development of the sheep pineal gland. *Int J Dev Biol* 2001; 45: 87-88.
312. Reiter RJ, Rudden PK, Banks AF, Rollag MD. Acute effects of unilateral or bilateral superior cervical ganglionectomy on rat pineal N-acetyltransferase and melatonin content. *Experientia* 1979; 35: 691-692.
313. Reiter RJ. Pineal melatonin production. Photoperiodic and hormonal influences. En: Reiter RJ, editor. *Advances in pineal research*. Londres: John Libbey, Co., Ltd, 1986; 77-78.
314. Reiter RJ. Pineal melatonin production. Photoperiodic and hormonal influences. En: Reiter RJ, editor. *Advances in pineal research*. Londres: John Libbey, Co., Ltd, 1986; 77-78.
315. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*. 1991 May;12(2):151-80.
316. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both clock and calendar. *Experientia* 1993;49:654-664.
317. Reuss S. Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res* 1996; 285(3): 353-378.
318. Ribes AC, Mohamed F, Dominguez S, Delgado M, Scardapane L, Guzman J, Piezzi R. Probable effect of photoperiod on seasonal variation in the nuclear volume of



- the adrenal cortex of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). Braz J Med Biol Res 1999 Sep;32(9):1115-20.
319. Rio-Hortega P. Constitución histológica de la glándula pineal. I. Células parenquimatosas. Libro en honor de Dr. Santiago Ramón y Cajal 1922; 359-389.
320. Rio-Hortega P: Constitución histológica de la glándula pineal. II. Substratum neuróglíco. Libro Homenaje al Dr. Marañón 1929;26-68.
321. Rio-Hortega P: Pineal gland. En: Cytology and cellular pathology on the central nervous system (Penfield W, ed). Vol 2, Harper (Hoeber), 1932; 635-703. New York.
322. Roa I, del Sol M. Morfología de la Glándula Pineal - Revisión de la Literatura Int J Morphol 2014;32(2):515-521.
323. Roberts CM, Weir BJ. Implantation in the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. J Reprod Fertil 1973 May;33(2):299-307.
324. Rocca J Galen on the brain. 2003 Brill Academic Press, Leyden.
325. Rodríguez H, Filippa V, Mohamed F, Dominguez S, Scardapane L. Interaction between chromaffin and sustentacular cells in adrenal medulla of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). Anat Histol Embryol. 2007 Jun;36(3):182-5.
326. Rodríguez H, Filippa VP, Penissi A, Fogal T, Domínguez S, Piezzi RS, Scardapane L. Seasonal changes in the activity of the adrenal medulla of Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). Anat Rec (Hoboken) 2013 Jul;296(7):1089-95.
327. Romijn HJ, Mud MT, Wolters PS. Electron microscopic evidence of glycogen storage in the dark pinealocytes of the rabbit pineal gland. J Neural Transm 1977 40:69-79.
328. Romijn HJ. Structure and innervation of the pineal gland of the rabbit, *Onctolagus cuniculus* (L.). A light microscopic investigation Z Zellforsch 1973a; 139: 473-485.
329. Rosales GJ, Busolini FI, Mohamed FH, Filippa VP. Effects of melatonin and gonadal androgens on cell proliferation in the pituitary of viscachas (*Lagostomus maximus maximus*). Cell Prolif 2016 Oct;49(5):644-653.
330. Rouvière H, Delmas A. Anatomía Humana; Descriptiva, Topográfica y Funcional 2005 11ª ed. Ed. Masson.
331. Roux P. Contribution á l'étude de la glande pinéale ou épiphyse. Thèse de Doctorat Sciences 1937 París.
332. Runembert I, Queffeuilou G, Federici P, Vrtovsnik F, Colucci-Guyon E, Babinet C, Briand P, Trugnan G, Friedlander G, Terzi F. Vimentin affects localization and

- activity of sodium–glucose cotransporter SGLT1 in membrane rafts. *J Cell Sci* 2002; 115: 713-724.
333. Rusak B, Bina KG. Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13:387-401.
334. Safwat E. Morphological and immunohistochemical studies on the pineal gland of the donkey (*Equus asinus*). *J Vet Anat* 2012;5:47-74.
335. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and-independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* 2006;396(2):201-14.
336. Santamarina E. Melanin pigmentation in bovine pineal gland and its possible correlation with gonadal function. *Can J Biochem Physiol* 1958 Feb; 36(1):227–235.
337. Sato T, Kaneko M, Hama A, Kusakari T & Fujieda H. Expression of class II MHC molecules in the rat pineal gland during development and effects of treatment with carbon tetrachloride. *Cell Tissue Res* 1996;284(1): 65-76.
338. Satodate R, Sasou S, Ota M, Takashio M, Yoshida Y. An electron microscopical morphometrical study on pinealocytes of pregnant rats. *Endokrinologie* 1980;75: 285–291.
339. Scardapane L, Lucero JB, Domínguez S, Piezzi RS, Guzmán JA. Effect of chronic administration of melatonin on viscacha pars intermedia (*Lagostomus maximus maximus*). *Comunicaciones Biológicas* 1983; 2(2): 183-188.
340. Schachner M, Huang S, Ziegelmuller P, Bizzini B, Taugner R. Glial cells in the pineal gland of mice and rats. *Cell Tissue Res* 1984; 237: 245-252.
341. Schäfer BW, Fritschy JM, Murmann P, Troxler H, Durussel I, Heizmann CW, Cox JA. Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily, *J Biol Chem* 2000;275:30623–30630.
342. Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology, *Trends Biochem Sci* 1996;21:34–140.
343. Schietke R, Brohl D, Wedig T, Mucke N, Herrmann H, Magin TM. Mutations in vimentin disrupt the cytoskeleton in fibroblasts and delay execution of apoptosis. *Eur J Cell Biol* 2006;85:1-10.
344. Schomerus C, Ruth P, Korf HW. Photoreceptorspecific proteins in the mammalian pineal organ: immunocytochemical data and functional considerations. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1994;54:9–17.

345. Sheridan MN, Reiter RJ. Observations on the pineal system in the hamster. II. Fine structure of the deep pineal. *J Morphol* 1970 Jun;131(2):163-77.
346. Shibuki K, Gomi H, Chen L, Bao S, Kim JJ, Wakatsuki H, Fujisaki T, Fujimoto K, Katoh A, Ikeda T, Chen C, Thompson RF, Itohara S. Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron* 1996; 16:587–599.
347. Simmoneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003;55: 325–395.
348. Sin WC, Chen XQ, Leung T, Lim L. RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. *Mol Cell Biol* 1998 Nov;18(11):6325-39.
349. Sinclair JA, Lochmiller RL. The winter immunoenhancement hypothesis: associations among immunity, density, and survival in prairie vole (*Microtus ochrogaster*) populations. *Can J Zool* 2000;78:254–64.
350. Singh M, Jadhav HR. Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov Today* 2014; Sep;19(9):1410-8.
351. Skelton NJ, Kördel J, Akke M, Forsén S, Chazin W. Signal transduction versus buffering activity in calciumbinding proteins, *Nat Struct Biol* 1994;1:239–245.
352. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004 Oct;84(4):1155-228.
353. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009 Dec; 32(12): 638–647.
354. Sorci G, Agneletti AL, Bianchi R, Donato R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim Biophys Acta* 1998 Dec 10;1448(2):277-89.
355. Sozos Pasozomenos CH. Glial fibrillary acidic (GFA) protein-containing cells in the human pineal gland. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983; 42:391408.
356. Steensen N. Discours sur l'anatomie du cerveau. 1670 Paris.
357. Stefanovic S, Windsor M, Nagata KI, Inagaki M, Wileman T. Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde

- transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II. *J Virol* 2005 Sep;79(18):11766-75.
358. Stehle JH, Von Gall C, Korf HW. Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res* 2002; 309: 173-182.
359. Stehle JH. Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebestény T, Maronde E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res* 2011;51(1):17-43.
360. Sugden D. Circadian changes in the rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem* 1979; 33: 811-820.
361. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989 Oct 15;45(10):922-32.
362. Suzuki T, Kachi T. Immunohistochemical studies on supporting cells in the adrenal medulla and pineal gland of adult rat, especially on S-100 protein, glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Acta Anat Nippon* 1995; 70: 130-139.
363. Tang HL, Lung HL, Wu KC, Le AH, Tang HM, Fung MC. Vimentin supports mitochondrial morphology and organization. *Biochem J* 2008;410(1):141-146.
364. Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus–pineal pathway. *J Comp Neurol* 1999; 406(2): 171-182.
365. Tiedemann F. Anatomie du cerveau contenant l'histoire de son développement dans le fœtus avec une exposition comparative de sa structure dans les animaux. 1823 Traduction Jourdan, Paris.
366. Tigchelaar PV, Nalbandov AV. The effect of the pineal gland on ovulation and pregnancy in rat. *Biol Reprod* 1975; 13: 461–469.
367. Tolstonog GV, Mothes E, Shoeman RL, Traub P. Isolation of SDS-stable complexes of the intermediate filament protein vimentin with repetitive, mobile, nuclear matrix attachment region, and mitochondrial DNA sequence elements from cultured mouse and human fibroblasts. *DNA Cell Biol* 2001a;20(9):531-554.
368. Tolstonog GV, Shoeman RL, Traub U, Traub P. Role of the intermediate filament protein vimentin in delaying senescence and in the spontaneous immortalization of mouse embryo fibroblasts. *DNA Cell Biol* 2001b20(9):509-529.
369. Tolstonog GV, Wang X, Shoeman R, Traub P. Intermediate filaments reconstituted from vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein selectively bind repetitive



- and mobile DNA sequences from a mixture of mouse genomic DNA fragments. *DNA Cell Biol* 2000;19:647-677.
370. Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 2005 Sep;39(2):99-104.
371. Tsuruta D, Jones JC. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci* 2003 Dec 15;116(Pt 24):4977-84.
372. Tulchinsky E, Kramenov D, Ford HL, Reshetnyak E, Lukanidin E, Zain S. Characterization of a positive regulatory element in the *mts1* gene, *Oncogene* 8 1993;79-86.
373. Tzivion G, Luo ZJ, Avruch J. Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo. *J Biol Chem* 2000 Sep 22;275(38):29772-8.
374. Ueck M. The morphogenesis of the mammalian pineal organ. En: *The pineal gland during development* (Gupta G, Reiter RJ. 1986;43-55 (eds.). Croom Helm, London.
375. Ueda S, Kokotos Leonardi ET, Bell J 3rd, Azmitia EC. Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S-100 beta antisense gene. *Brain Res Mol Brain Res* 1995 Apr;29(2):365-8.
376. Uozumi MS, Murao S, Katayama N, Kitazawa S, Amatsu M, Maeda S. Induction of S100A4 gene expression inhibits in vitro invasiveness of human squamous cell carcinoma, KOSC-3 cells, *Cancer Lett* 2000 Feb; 149(1-2): 135-141.
377. Urbanski HF, White RB, Fernald RD, Kohama SG, Garyfallou VT, Densmore VS. Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the macaque brain. *Endocrinology* 1999 Apr;140(4):1945-8.
378. Uyeda CT, Eng LF, Bignami A. Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res* 1972; 37: 81-89.
379. Van Gijn J. Rene Descartes (1596-1650). *J Neurol* 2005;252(2):241-242.
380. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998 Jul;78(3):687-721.
381. Vaughan MK, Johnson LY, Dinh DI, Brainard GC, Petterreorg U, Guerra JC, Reiter RJ: Influence of Thr-Ser-Lys (TSL), a recently isolated pineal peptide, on ovarian and uterine weights and estrous cycles in mice, hamsters and rats. En: *Pineal function* (Mathews CD, Seamark RF, eds.) 1981;165-172 Elsevier, Amsterdam.

382. Vigh B, Szél A, Debreceni K, Fejér Z, Manzano e Silva MJ, Vigh-Teichmann I. Comparative histology of pineal calcification. *Histol Histopathol* 1998 Jul;13(3):851-70.
383. Voisin P, Namboodiri MA, Klein DC. Arylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem* 1984; 259: 10913-10918.
384. Vollrath L, Huss H. The synaptic ribbons of the guinea-pig pineal gland under normal and experimental conditions. *Z Zellforsch* 1973;139:417-429.
385. Vollrath L, Schmidt DS. Enzymhistochemische untersuchungen an der zirbeldrüse normaler und trächtiger meerschweinchen. (Enzyme histochemical Investigations on the pineal gland of normal and pregnant guinea pig) *Histochemie* 1969; 20: 328–337.
386. Vollrath L. The Pineal Organ. Berlin Heidelberg 1981;6(7):28-29 New York: Springer.
387. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 2002 Jul;309(1):151-62.
388. Vrang N, Larsen PJ, Møller M & Mikkelsen JD. Topographical organization of the rat suprachiasmatic-paraventricular projection. *J Comp Neurol* 1995;353(4):585-603.
389. Walker RF, McMahon KM, Pivorum EB: Pineal gland structure and respiration as affected by age and hypocaloric diet. *Exp Gerontol* 1978;13:91-99.
390. Wallace RE, Altman K, Das GO: An autoradiographic and morphological investigation of the postnatal development of the pineal body. *Am J Anat* 1969;126:175-183.
391. Wang N, Stamenović D. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 Jul;279(1):C188-94.
392. Wartenberg H. and Guserk W. Licht-und elektronenmikroskopische Beobachtungen über die struktur der epiphysis cerebri des kaninchens. *Progr Brain Res* 1965;10: 296-316.
393. Wartenberg H. The mammalian pineal organ: Electron microscopic studies on the fine structure of pinealocytes, glial cells and on the perivascular compartment. *Z Zellforsch* 1968;86:74-97.
394. Weiger G. Beitrag zur kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. *Abhandlungen der Senckenbergerger Naturforscher-Gesellschaft Frankfurt a.M.*, 1895 Bd.19.

395. Weir BJ. The reproductive organs of the female plains viscacha, *Lagostomus maximus*. J Reprod Fertil 1971a Jun;25(3):365-73.
396. Weir BJ. The reproductive physiology of the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. J Reprod Fertil 1971b Jun;25(3):355-63.
397. Welser JR, Hinsman EJ, Stromberg MW. Fine structure of the canine pinealocytes. Amer J Vet Res 1968;29:587-599.
398. Welsh MG, Reiter RJ. The pineal gland of the gerbil, *Meriones unguiculatus*. Cell Tissue Res 1978;193:323-336.
399. Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Astroglial 5-HT<sub>1a</sub> receptors and S-100 beta in development and plasticity. Perspect Dev Neurobiol 1994;2(3):233-8.
400. Whitaker-Azmitia PM, Wingate M, Borella A, Gerlai R, Roder J, Azmitia EC. Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 beta show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. Brain Res 1997 Nov 21;776(1-2):51-60.
401. Wildt L, Hutchison JS, Marshall G, Pohl CR, Knobil E. On the site of action of progesterone in the blockade of the estradiol-induced gonadotropin discharge in the rhesus monkey. Endocrinology 1981 Oct;109(4):1293-4.
402. Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. J Cell Biol 1989 Dec;109(6 Pt 1):3063-71.
403. Wolfe DE. The epiphyseal cell: an electron-microscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat. Progr Brain Res 1965;10:332-386.
404. Wurtman RJ, Axelrod J. The pineal gland. Sci Amer 1965;213:50-60.
405. Wurtman RJ, Axelrod J. A 24-hour rhythm in the control of norepinephrine in the pineal and salivary glands of the rat. Life Sci 1974;5: 665-666.
406. Wyrzykowski ZB, Przybylska B, Wyrzykowski K. Morphology of the pineal gland in pregnant and nursing sows. J Pineal Res 1987;4(2):125-134.
407. Xie J, Burz DS, He W, Bronstein IB, Lednev I, Shekhtman A. Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycated end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. J Biol Chem 2007;282(6):4218-31.

408. Yang X, Wang J, Liu C, Grizzle W, Yu S, Zhang S, Barnes S, Koopman WJ, Mountz JD, Kimberly RP, Zhang HG. Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Am J Pathol* 2005;167:705-719.
409. Zang X, Nilaver G, Stein BM, Fetell MR, Duffy PE. Immunocytochemistry of pineal astrocytes: species differences and functional implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985 Sep;44(5):486-95.
410. Zarazaga LA, Chemineau P, Malpaux B, Forcada F. La melatonina: síntesis, ritmo de secreción y catabolismo. 2000; 71:1-86 Monografía ovis.
411. Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behavior. *Mol Pathol* 2001 Dec;54(6):414-418.
412. Zecca L, Zucca FA, Wilms H, Sulzer D. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 2003;26(11):578-580.
413. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression, *Brain Res Bull* 1995;37:417-429.
414. Zrenner C. Theories of pineal function from classical antiquity to 1900: a history R.J. Reiter (Ed.), *Pineal Research Reviews III*, 1985;1-40 Alan R. Liss, New York.





# PUBLICACIONES

Shawn Thornton "Witch Doctors at The Eye of The Solar Epoch" 2010