

T. Prov. 22/35

*Departamento*

UNIVERSIDAD DE GRANADA	
Facultad de Ciencias	
Fecha	11/3/98
ENTRADA NUM.	1038

UNIVERSIDAD DE GRANADA

T  
16  
89

TESIS DOCTORAL

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR  
NUCLEAR DE MELATONINA EN HEPATOCITOS DE RATA

*MMG*

Manuel Macías Gonzalez

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	619687412
Nº Copia	121239228

UNIVERSIDAD DE GRANADA
27 FEB. 1998
COMISION DE DOCTORADO

Darío Acuña Castroviejo, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE: **D. MANUEL MACÍAS GONZALEZ**, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, que ha sido el objeto de su Tesis Doctoral, sobre el tema: **“Purificación y Caracterización del receptor nuclear de melatonina en hepatocitos de rata”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.



D. AMW

Granada, Febrero, 1998

Antonio Osuna Carrillo, Catedrático del Departamento de Parasitología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE: **D. MANUEL MACÍAS GONZALEZ**, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, que ha sido el objeto de su Tesis Doctoral, sobre el tema: **“Purificación y Caracterización del receptor nuclear de melatonina en hepatocitos de rata”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.



A handwritten signature in black ink, appearing to be "Antonio Osuna Carrillo".

Granada, Febrero, 1998

## ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	<b>Hormona adenocorticotropa</b>
<b>AC</b>	<b>Adenil ciclasa</b>
<b>ADNc</b>	<b>Acido desoxirribonucleicol complementario</b>
<b>ADP</b>	<b>Difosfato de adenosina</b>
<b>AMPc</b>	<b>Monofosfato de adenosina cíclico</b>
<b>APS</b>	<b>Persulfato de amonio</b>
<b>ARNm</b>	<b>Acido ribonucleico mensajero</b>
<b>ATP</b>	<b>Trifosfato de adenosina</b>
<b>BSA</b>	<b>Albúmina de suero bovino</b>
<b>BSP</b>	<b>Sialoproteína del hueso</b>
<b>CET</b>	<b>Extensión carboxilo terminal</b>
<b>CRE</b>	<b>Elemento de respuesta al AMPc</b>
<b>CREB</b>	<b>Proteína de unión al CRE</b>
<b>DAB</b>	<b>3,3-diaminobenzidina</b>
<b>DBD</b>	<b>Dominio de unión al ADN</b>
<b>DNasa</b>	<b>Desoxiribunucleasa</b>
<b>DO</b>	<b>Densidad óptica</b>
<b>DTT</b>	<b>Ditiotreitol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Acido etilendiaminotetracético</b>
<b>FITC</b>	<b>Isotiocianato de fluoresceína</b>
<b>FL<sub>1</sub></b>	<b>Fluorescencia en el detector 1 (fluoresceína)</b>
<b>FL<sub>2</sub></b>	<b>Fluorescencia en el detector 2 (ioduro de propidio)</b>
<b>FSC</b>	<b>Luz dispersa frontal</b>
<b>FSH</b>	<b>Hormona estimuladora del folículo</b>
<b>GABA</b>	<b>Acido gamma-amino-butírico</b>
<b>GM-CSF</b>	<b>Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos</b>
<b>GTP</b>	<b>Trifosfato de guanosina</b>
<b>HRE</b>	<b>Elemento de respuesta a hormona</b>
<b>HIOMT</b>	<b>Hidroxi-indol-oxi-metil transferasa</b>
<b>5-HT</b>	<b>5-hidroxiptamina (serotonina)</b>
<b>IEF</b>	<b>Isoelectroenfoque</b>
<b>IFN-</b>	<b>Interferón-</b>
<b>IgG</b>	<b>Inmunoglobulina G</b>
<b>IL-</b>	<b>Interleucina-</b>
<b>IP</b>	<b>Ioduro de propidio</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>LBD</b>	<b>Dominio de unión al ligando</b>
<b>LCR</b>	<b>Líquido cefalorraquídeo</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolisacárido bacteriano</b>
<b>LH</b>	<b>Hormona lúteo estimuladora</b>
<b>ML</b>	<b>Receptor de melatonina de membrana</b>
<b>NA</b>	<b>Noradrenalina</b>
<b>NAS</b>	<b>N-acetilserotonina</b>

<b>NAT</b>	<b>N-acetiltransferasa</b>
<b>NMDA</b>	<b>N-metil-D-aspartato</b>
<b>NADPH</b>	<b>Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina</b>
<b>NO</b>	<b>Oxido nítrico</b>
<b>NOS</b>	<b>Sintasa del óxido nítrico</b>
<b>NSQ</b>	<b>Núcleo supraquiasmático</b>
<b>PBS</b>	<b>Tampón fosfato salino</b>
<b>PAGE</b>	<b>Electroforesis de poliacrilamida</b>
<b>PBST</b>	<b>Tampón fosfato salino con tween 20</b>
<b>PBST</b>	<b>Tampón fosfato salino con tween 20 y gelatina</b>
<b>pI</b>	<b>Punto isoeléctrico</b>
<b>PKA</b>	<b>Proteín quinasa dependiente de AMPc</b>
<b>PKC</b>	<b>Proteína quinasa C</b>
<b>pM</b>	<b>Peso molecular</b>
<b>PMSF</b>	<b>Fluoruro de fenilmetasulfonil</b>
<b>RAR</b>	<b>Receptor de ácido retinoico</b>
<b>Rf</b>	<b>Movilidad electroforética</b>
<b>ROR</b>	<b>Receptor nuclear huérfano</b>
<b>ROS</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>RNasa</b>	<b>Ribonucleasa</b>
<b>RNS</b>	<b>Especies reactivas de nitrógeno</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Transcripción inversa-reacción en cadena polimerasa</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil sulfato sódico</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Electroforesis de poliacrilamida en dodecil sulfato sódico</b>
<b>TEMED</b>	<b>Tetrametilendiamina</b>
<b>SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>Sulfato amónico</b>
<b>VDR</b>	<b>Receptor de vitamina D</b>

<b>1.-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
I.-Glándula Pineal Humana .....	3
B.- Anatomía de la Glándula Pineal .....	4
C.- Bioquímica de la glándula pineal.....	5
1.- Contenido pineal de aminos biógenas .....	5
2.- Contenido pineal en péptidos y lípidos.....	6
II.- Biosíntesis de la melatonina .....	6
A.- Síntesis de la melatonina .....	7
B.- Regulación de la síntesis de melatonina.....	9
1.- Regulación por el fotoperíodo .....	9
2.- Control neural de la síntesis de melatonina .....	9
3.- Control intracelular de la síntesis de melatonina .....	10
4.- Regulación hormonal de la síntesis de melatonina .....	12
5.- Circulación y excreción de melatonina.....	13
C.-Producción extrapineal de la melatonina .....	13
III.- Metabolismo y excreción de la melatonina .....	14
IV.- Acciones de la melatonina .....	16
A.- Control de los ritmos biológicos.....	16
B.- Melatonina y los ciclos sueño-vigilia en humanos .....	16
C.- Melatonina y reproducción.....	17
D.- Melatonina y actividad cerebral.....	19
E.- Melatonina y el estrés oxidativo .....	22
F.- Melatonina y envejecimiento .....	23
G.- Melatonina y sistema inmune.....	24
V.- Mecanismo de Acción de la melatonina .....	27
A.- Receptores nucleares de melatonina .....	27
2.- Receptores nucleares huérfanos .....	29
3.- Familia de receptores RZR/ROR .....	31
4.- Propiedades de unión de los receptores RZR/ROR a ADN.....	33
5.-Ligandos para los receptores RZR/ROR .....	33
6.- RZR $\beta$ y la glándula pineal .....	36
B.- Receptores demembrana de melatonina .....	37
1.- Características de los sitios de unión de melatonina .....	37
2.- Estructura de los receptores de membrana de melatonina.....	40
D.- Receptores citosólicos de la melatoninaprimeras .....	42
E.- Acciones de la melatonina que no necesita receptor.....	42
1.- Actividad antioxidante y radicales libres.....	42
a.- Sistemas de protección frente a los radicales libres.....	43
b.-- Melatonina como antioxidante y depurador de radicales libres.....	44
2.- Melatonina y calmodulina.....	45

<b>2.- OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>53.</b>
I.- Animales de experimentación.....	55
II.- Manipulaciones experimentales .....	55
III.-Aislamiento de núcleos de hepatocitos de rata por gradiente de sacarosa.....	56
IV.- Estudio por microscopía electrónica de transmisión.....	56
V.- Estudio por Citometría de Flujo .....	57
A.- Introducción a la citometría de flujo .....	57
B.- Procedimiento .....	59
VI.- Métodos de eliminación de sales .....	61
B.- Cromatografía de filtración en gel.....	61
VII.- Determinación de la concentración de proteínas.....	61
A.- Método de Lowry .....	61
1.- Reactivos.....	62
2.- Procedimiento.....	62
B.- Método de Bradford.....	63
1.- Reactivos.....	63
2.- Procedimiento.....	64
VIII.- Preparación y solubilización de las proteínas nucleares.....	64
IX.- Precipitación de proteínas .....	65
X.- Técnicas cromatográficas .....	65
A.- Cromatografía de afinidad .....	66
2.- Preparación de la agarosa- melatonina.....	68
3.- Cromatografía de afinidad de las muestras solubilizadas .....	69
XI.- Electroforesis .....	70
1.- Aparato de electroforesis .....	72
2.- Composición de los geles.....	73
a.- Reactivos .....	73
b.- Procedimiento de preparación de los geles y de las pastillas.....	74
3.- Preparación y aplicación de las muestras .....	74
4.- Tinción con azul coomassie.....	75
5.- Tinción con nitrato de plata .....	76
6.- Cálculo del peso molecular por electroforesis en presencia de SDS-PAGE.....	77
B.- Isoelectroenfoque (IEF).....	78
1.- Procedimiento y aplicación de la muestra .....	79
2.- Tinción con nitrato de plata .....	80
1.- La primera dimensión (IEF) .....	81
2.- Segunda dimensión (SDS-PAGE).....	82
3.- Tinción con nitrato de plata .....	83

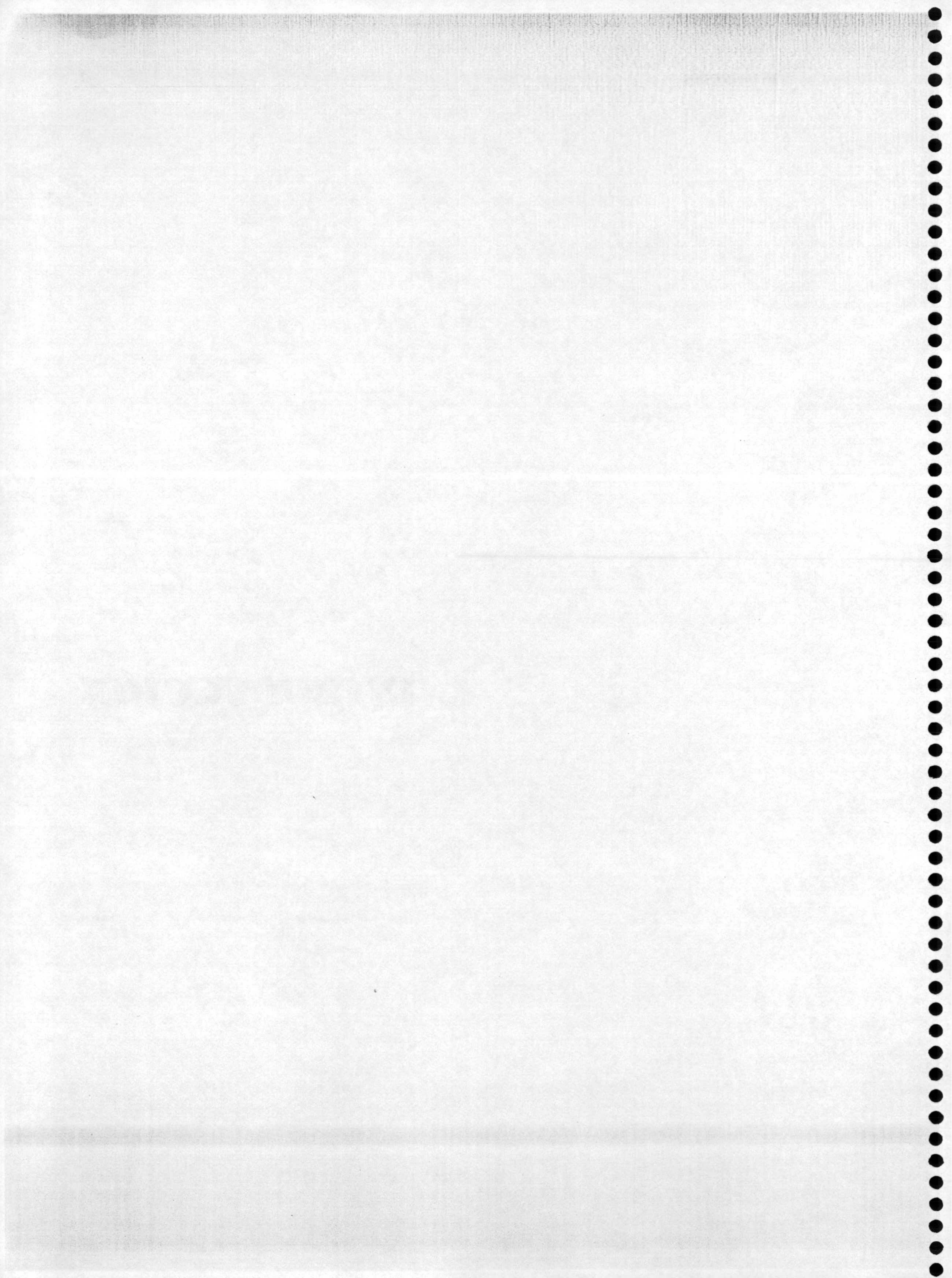
## Indice

---

XII.- Técnicas Autorradiográficas.....	85
B.- Reactivos y equipo.....	86
C.- Procedimiento.....	86
XIII.- Técnicas inmunológicas.....	87
A.- Inmunotransferencia (Western-blotting).....	87
1.- Reactivos.....	88
2.- Procedimiento.....	89
3.- Determinación de los pesos moleculares.....	89
B.- Ensayo Inmuno oro.....	90
2.- Preparación de oro coloidal de 10-20 nm.....	90
3.- Preparación del complejo anticuerpo melatonina-oro coloidal.....	91
C.- Inmunomarcado directo con oro coloidal (método post-inclusión).....	92
XIV.- Análisis densitométrico.....	94
<b>4.- RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
<b>5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>147</b>
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>165</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>169</b>



# 1.- INTRODUCCIÓN



## I.-Glándula Pineal Humana

### A.- Perspectiva Histórica

La glándula pineal de los vertebrados superiores, incluido el hombre, es una formación localizada en el centro del cerebro que desempeña un papel esencial en el control de los ritmos biológicos. Se denomina también a esta glándula “ojo pineal” o “epífisis del cerebro”. Esto debido a que dicha estructura representa la transformación filogenética de un órgano sensible a la luz presente en vertebrados inferiores, de ahí que se llamara también “tercer ojo. Independientemente de los ojos laterales y del tercer ojo que poseen los vertebrados existen además los ojos accesorios o mejor llamados “formaciones supernumerarias”, estructuras que aparecen vinculadas al tercer ojo. Estas formaciones son: el órgano parapineal de lampreas y peces, el órgano frontal de los anfibios y el órgano parietal de los reptiles. El conjunto que forman el tercer ojo y las formaciones supernumerarias se denomina “complejo pineal”; entre ésta estructuras y el tercer ojo existe una conexión nerviosa. Las aves y los mamíferos en donde se perdió su capacidad fotosensible sólo poseen la glándula pineal, careciendo de estructuras accesorias. La glándula pineal es la encargada de controlar los ritmos diarios, como los cambios de color de la piel entre el día y la noche, y los ritmos estacionales, como el ciclo de la actividad sexual, suministrando al organismo una información temporal al liberar por la noche una hormona, la melatonina.

El primero en observar la existencia de la glándula pineal en la especie humana fue Herófilo de Alejandría (325-328 A.C.). Los estudios de los autores clásicos de la medicina grecorromana la consideraron una estructura capaz de materializar y vehicular el flujo de pensamiento desde el tercer al cuarto ventrículo. Fue Galeno, en el siglo II, el primero en estudiar su anatomía en detalle, y a él se debe el nombre actual, que proviene del vocablo griego *konareion*, latinizado *conarium* (piña). Vesalio señala su situación anatómica en su célebre obra *De Humanis Corporis Fabrica* (1514-1564). Más tarde en el siglo XVII, René Descartes (1596-1656) embelleció las anteriores concepciones fisiológicas y anatómicas, proponiendo en su libro *De Homine* que la pineal es un centro donde el alma recibe informaciones del cuerpo. Descartes fue el primero en proponer una función fisiológica a la apineal. En el siglo XIX, Gutzeit en 1896, asocia por primera vez la existencia de un tumor

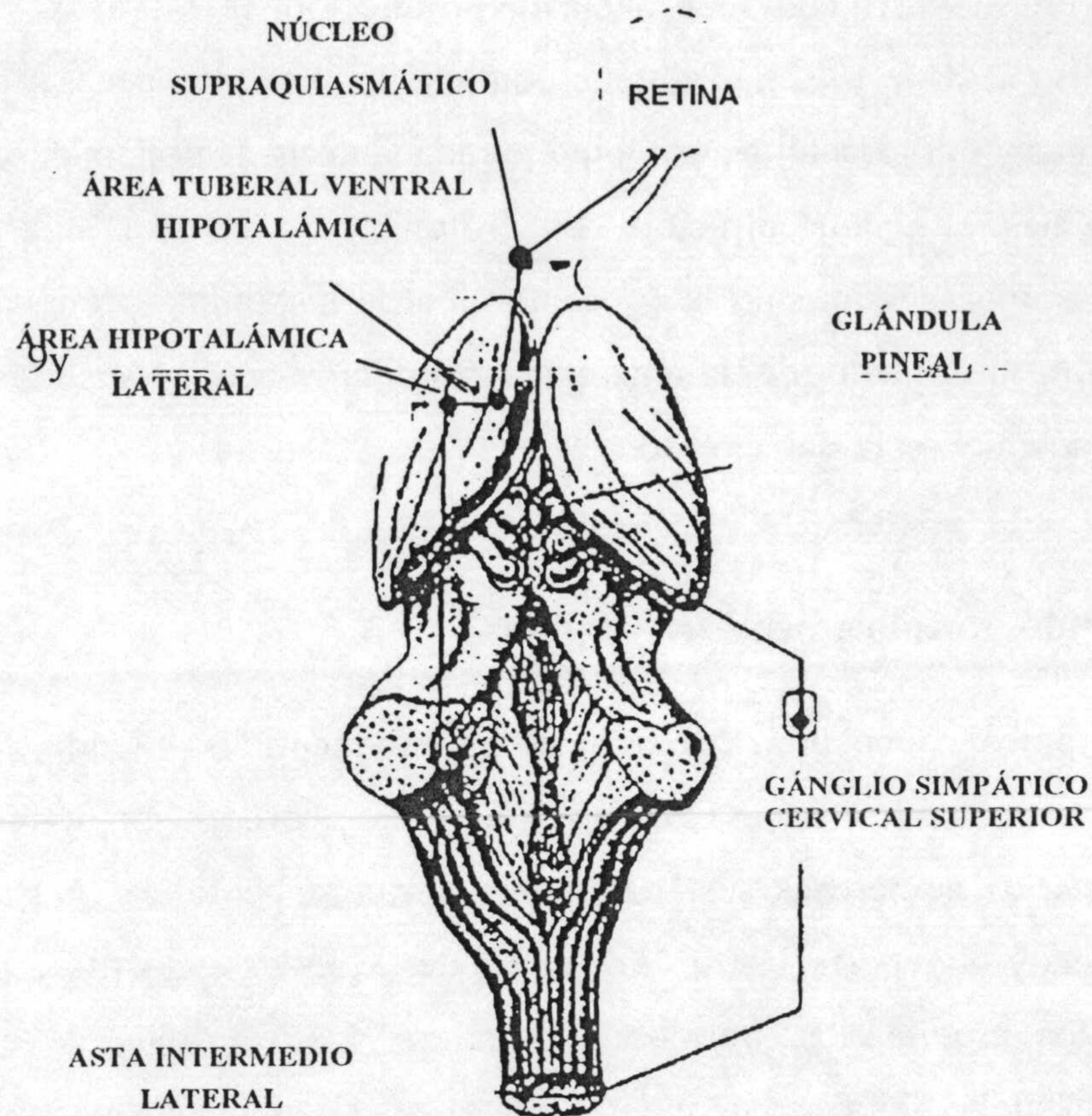
pineal con un síndrome de desarrollo sexual precoz. Otto Heubner publicó en 1898 el caso clínico de un niño que presentaba pubertad precoz, acompañada de la existencia de un tumor pineal. En los cincuenta años siguientes fueron observados otros casos similares de niños con tumor de la pineal y desarrollo sexual precoz. Toda esta literatura científica fue recogida en un libro publicado en 1950 (Kitay y Altschule, 1954)

### **B.- Anatomía de la Glándula Pineal**

Filogenéticamente, la morfología de la glándula pineal es muy variable. Así en peces, anfibios y lacértidos presenta una estructura celular con células fotorreceptoras semejantes a las retinianas lo que le convierte en un órgano fotosensible, ya que no existe estructura ósea ni cartilaginosa entre el exterior y la pineal, estando separada del resto él sólo por la piel. En mamíferos debido al cierre completo del cráneo pierde su contacto con la luz, y por tanto su capacidad fotorreceptora. Se transforma entonces en una típica glándula endocrina que pertenece al grupo de órganos circunventriculares. Sin embargo, no pierde su conexión con el medio ambiente, siendo informada del ciclo luz:oscuridad por vía retino-hipotalámica.

En el caso del hombre, la glándula pineal se origina por invaginación del techo del diencéfalo, se hace evidente a partir del segundo mes de vida intrauterina, y llega a pesar entre 100 y 200 miligramos. Se sitúa en la porción posterior e inferior del cuerpo caloso, entre los tubérculos cuadrigémicos superiores y detrás del tercer ventrículo (Figura 1).

La pineal se encuentra inervada por fibras post-ganglionares originadas en el ganglio cervical superior, pudiéndose considerar como un órgano efector del sistema nervioso autónomo (Wurtman y Antón-Tay), 1969), y se compone de dos poblaciones celulares: pinealocitos y células neurogliales. Los pinealocitos se clasifican por su diferente densidad al microscopio electrónico en claros y oscuros. Los pinealocitos oscuros contienen gránulos de pigmentos de naturaleza aún poco establecida y depósitos de glucógeno. Ya que la diferencia en "claros" y "oscuros" se basa en criterios morfológicos, es posible que se trate del mismo tipo celular en diferentes estados funcionales que se manifiesta en un comportamiento diferente al fijador (Karasek y Reiter, 1992). Además del pinealocito y de las células gliales, en la pineal también aparecen células nerviosas, endimarias, cebadas, pigmentarias y un número indeterminado de linfocitos, plasmocitos y fibrocitos.



*Figura. 1: Localización anatómica de la glándula pineal humana*

### C.- Bioquímica de la glándula pineal

La glándula pineal se reconoce como glándula endocrina a partir del descubrimiento de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) de estructura indólica y derivada de la serotonina a partir del triptófano (Lerner y cols., 1958; 1959).

#### 1.- Contenido pineal de aminas biógenas

Entre los derivados de los aminoácidos de importancia conocida, se encuentran las indolaminas y las catecolaminas. El común precursor de las indolaminas pineales y

cerebrales es el aminoácido esencial, triptófano. En la pineal existen todos los enzimas necesarios en su vía metabólica hacia la producción de 5-hidroxi- y 5-metoxi- indoles (Beck y cols., 1981 y 1982).. También contiene los enzimas necesarios para la síntesis de catecolaminas y noradrenalina, así como para la síntesis de dopamina y GABA.

La más alta concentración de serotonina de la economía se encuentra en el parénquima pineal. Asimismo la concentración de histamina, producida en los mastocitos pineales por intermedio de la enzima histamina-N-acetil-transferasa, es mayor en la glándula que en el resto del cerebro.

## 2.- Contenido pineal en péptidos y lípidos

La pineal tiene una alta actividad aminopeptidasa siendo capaz de una rápida síntesis de aminoácidos, como se demuestra por la incorporación de precursores marcados. Se han descrito numerosas sustancias de naturaleza peptídica (hasta 23) en la glándula pineal (Ebels y Noteborn, 1986). Entre ellas destacan las endorfinas, péptidos de actividad similar a los hipofisarios, hormona liberadora de tirotrópina, el nonapéptido (péptido inductor del sueño delta), componentes peptídicos no identificados y pteridinas.

El pinealocito posee también una alta actividad lipasa y esterasa inespecífica. La presencia de estas enzimas sugiere un activo papel para los lípidos en el metabolismo pineal.

## II.- Biosíntesis de la melatonina

La primera observación de la capacidad secretora de la pineal se debe a McCord y Allen (1917) que demostraron que el extracto pineal de bóvidos era capaz de dar una tonalidad más clara a la piel de los renacuajos. Fue en 1958 cuando Lerner y colaboradores aislaron e identificaron la sustancia responsable: la N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina (Lerner y cols., 1959). Se comprobó que la glándula pineal poseía todos los enzimas necesarios para su síntesis a partir de la serotonina (Axerold y cols., 1960) y que toda esta actividad bioquímica se veía afectada por los ciclos luz-oscuridad (Quay, 1964).

La N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina, se pensaba inicialmente que era sintetizada exclusivamente en la glándula pineal (Ebadi, 1984). Sin embargo, el estudio posterior de otros tejidos indican que la melatonina es producida también en la retina, las

glándulas de Harder (Bubenik y cols., 1976), las glándulas lacrimales extra-orbitales, el tracto gastro-intestinal (Vakkuri y cols., 1985), y ciertas células sanguíneas como los linfocitos (Finocchiaro y cols., 1988; Reiter, 1991a).

#### A.- Síntesis de la melatonina

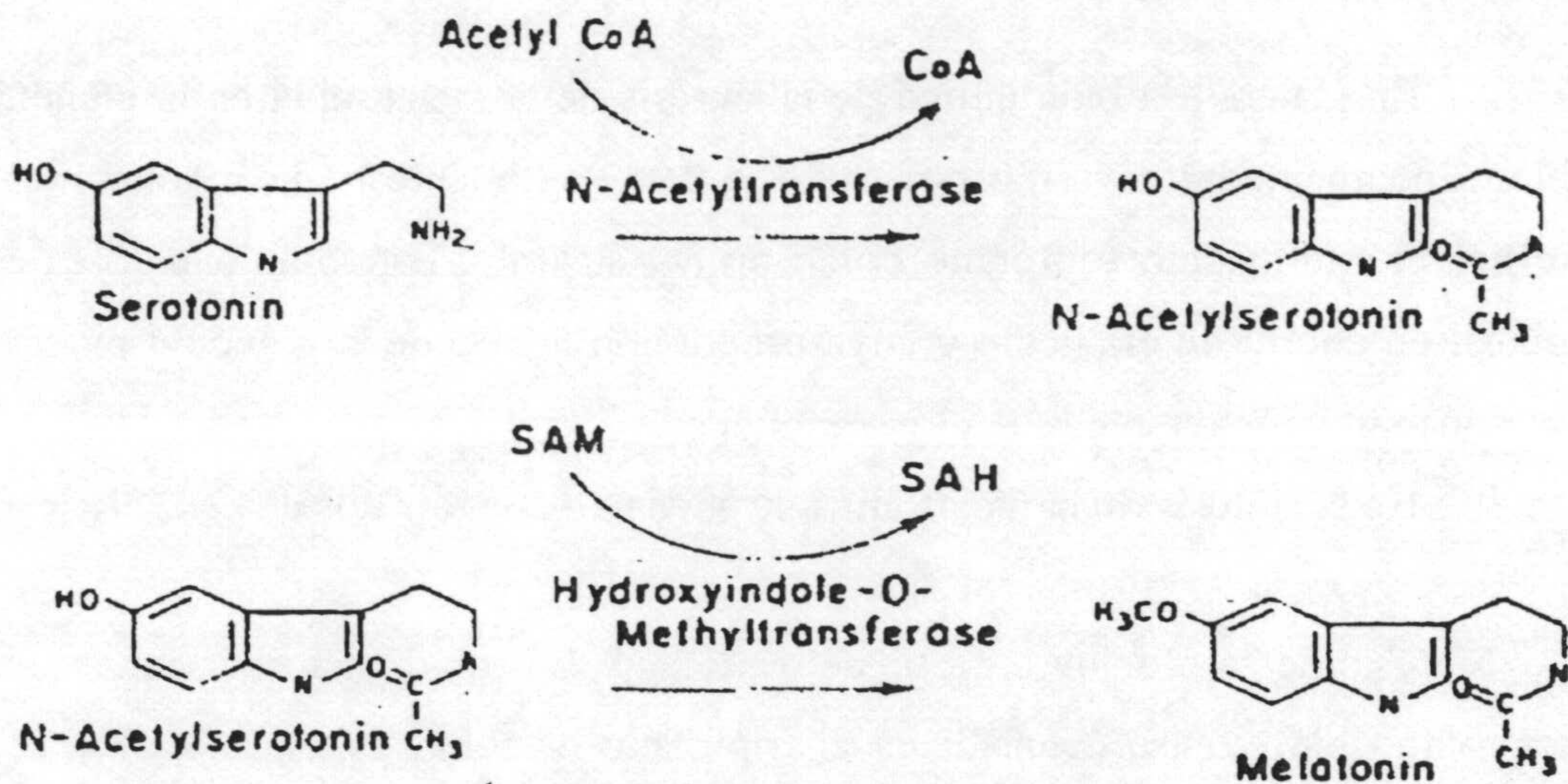
En general, la bioquímica de la síntesis de la melatonina en la glándula pineal está bien documentada (revisado por Sugden, 1989). La síntesis de indolaminas en la pineal utiliza el aminoácido triptófano como primer sustrato. Este aminoácido es captado por la pineal en contra de gradiente y cuya proporción dentro de la glándula parece depender de su concentración en la circulación sanguínea.

En la síntesis de la melatonina se pueden distinguir dos etapas (Figura 2):

1.- Síntesis de serotonina a partir de triptófano. En esta etapa intervienen dos enzimas, la triptófano hidroxilasa (transforma el triptófano en 5-hidroxitriptófano) y la L-aromático-aminoácido-descarboxilasa (convierte el 5-hidroxitriptófano en 5-hidroxitriptamina o serotonina). La primera de ellas es de localización mitocondrial, y constituye el paso limitante de la síntesis. Esta enzima no exhibe en condiciones fisiológicas modificación rítmica o circadiana alguna, aunque posee un ritmo endógeno que se mantiene en oscuridad consante. La segunda es citosólica, y al igual que la triptófano hidroxilasa, no es la responsable del ritmo circadiano que caracteriza a la glándula.

2.- Conversión de serotonina en melatonina y otros indoles, a través de la N-acetilserotonina (NAS). La serotonina es convertida en N-acetilserotonina por el enzima citosólica N-acetiltransferasa (NAT). Se ha comprobado que la actividad de la NAT está sometida a los cambios de luz-oscuridad, siendo de entre 30 a 70 veces más alta por la noche. La N-acetilación de las aminas es específica en la pineal debido a ciertas características: la existencia de cambios diarios en la actividad modulados por la luz ambiental, y la diferente especificidad del sustrato de la NAT en la pineal comparada con otros tejidos como el hígado ó cerebro. El siguiente paso en esta etapa sería la metilación sufrida por la N-acetilserotonina gracias a la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) para convertirse en la N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina (Axelrod y Weissbach, 1960; Reiter, 1991a). Tanto la NAT como la HIOMT son enzimas características de la pineal

(Wurtman y Mosckowitz, 1977). Ambas son estables y se han medido en pineales humanas *postmortem* en concentraciones variables según la hora del día en que se produjo el fallecimiento, así como las condiciones individuales (Smith y cols., 1981).



*Figura 2: Ruta biosintética de la melatonina en la glándula pinea*

Se cree que un aumento en la concentración de N-acetilserotonina provoca un aumento en la producción de la melatonina; por lo tanto, la biosíntesis de melatonina en la pineal es principalmente controlada por la actividad de la N-acetiltransferasa, que actuaría como enzima limitante.

Aunque la acetilación hacia N-acetilserotonina es un paso necesario en la biosíntesis de la melatonina, la deaminación de la serotonina en la pineal por la monoamina oxidasa también puede ocurrir. El producto deaminado puede ser, o bien oxidado a 5-hidroxiindolacético, o bien reducido a 5-hidroxitriptofol. Ambos compuestos pueden ser entonces metilados por la HIOMT para rendir 5-metoxindol o 5-metoxitriptofol.



## **B.- Regulación de la síntesis de melatonina**

La biosíntesis de los metoxi-indoles en general está controlada por un impulso nervioso simpático que le imprime un ritmo circadiano sincronizado con el ciclo de la luz y modulado por las hormonas circulantes que modifican el metabolismo pineal (Wetterberg, 1978).

### **1.- Regulación por el fotoperíodo**

La síntesis de la melatonina se ve dramáticamente afectada por la exposición de la luz. Por la noche hay un incremento en la actividad de la N-acetiltransferasa, de 10 a 100 veces respecto a los valores diurnos. La concentración de N-acetilserotonina se ve consecuentemente incrementada de 10 a 30 veces. La actividad HIOMT también se encuentra incrementada por la noche. Por otra parte, los niveles de serotonina sufren un ritmo circadiano opuesto, con valores bajos por la noche y altos por el día, como corresponde al principal sustrato de la N-acetiltransferasa. Un cambio a la inversa de las condiciones de iluminación conlleva una actividad inversa de las enzimas de la pineal y de la síntesis de indolaminas. Por otra parte, las fluctuaciones diarias en las actividades de las enzimas pineales y de la síntesis de melatonina se pierden en condiciones de iluminación continua. El ritmo permanente sin alteraciones, aunque disminuido, en aquellos animales que se mantienen en condiciones de oscuridad continua. Esto es debido a un control por parte del núcleo supraquiasmático responsable de la persistencia de la ritmicidad pineal. Estos resultados están bien documentados en mamíferos (revisado extensamente por Underwood y Goldman, 1987; Reiter, 1991; Binkley, 1993).

### **2.- Control neural de la síntesis de melatonina**

El papel del SNC en el control de la síntesis de melatonina en mamíferos ha sido determinado gracias al uso de aproximaciones y técnicas quirúrgicas (Herbert, 1989). La melatonina es sintetizada en respuesta a la liberación de norepinefrina desde las neuronas postgangliónicas del ganglio cervical superior. Por eso la glándula es considerada como un transductor neuroendocrino, como el tejido adrenal cromoafín, donde las aferencias nerviosas se convierten en señales endocrinas (Wurtman, 1968). La estimulación

postgangliónica de los pinealocitos depende de la ausencia de la activación de la retina por luz. La percepción de luz por los ojos se transmite al núcleo supraquiasmático del cerebro via retinohiportalámica (Moore, 1978). La glándula pineal, es, en esencia, el intermediario entre el fotoperiodo externo y el medio interno, siendo esta información transmitida en forma de mensajes químicos (Reiter 1991b). Los circuitos neuronales desde el núcleo supraquiasmático transmiten la información a través del cerebro medio hasta la espina dorsal torácica superior y de aquí al ganglio cervical superior. Desde estos ganglios parten unas fibras postganglionares simpáticas que inervan a la pineal.

La ruptura de esta vía neural en cualquier punto entre los ojos y el núcleo supraquiasmático estimula la síntesis de melatonina. La eliminación de los ganglios cervicales superiores hace que desaparezca el ritmo de la síntesis de melatonina. Todo este conjunto de datos sugiere que el núcleo supraquiasmático debe ser el responsable en el SNC de la generación nocturna de melatonina y la actividad oscilatoria circadiana del mismo debe estar en función del fotoperíodo diario (Reiter, 1978).

### 3.- Control intracelular de la síntesis de melatonina

La noradrenalina (NA) liberada desde las neuronas postganglionares actúa a través de los receptores  $\beta_1$  y  $\alpha_1$ -adrenérgicos de los pinealocitos provocando un incremento de  $AMP_c$ . Este efecto está modulado a su vez por los receptores  $\alpha_1$ . Los niveles en  $AMP_c$  citosólico provocan un aumento de los niveles de ARNm para la N-acetil transferasa (Roseboom y cols., 1996). En la NAT existen lugares portenciales de fosforilación localizados en las regiones amino y carboxilo terminal fosforilables por kinasas dependientes de nucleótidos cíclicos. Estos lugares de fosforilación son de particular interés ya que el  $AMP_c$  regula la actividad del enzima NAT, siendo su aumento intracelular la señal para una rápida inducción enzimática, y pudiendo ser en parte los responsables de la regulación por  $AMP_c$  de la NAT.

La noradrenalina actúa sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de los pinealocitos. Su activación estimula una proteína  $G_s$ , situada en la cara interna de la membrana, que lleva acoplado un GTP y que induce un aumento de la actividad adenil-ciclase con la consiguiente síntesis intracelular de  $AMP_c$ , el cual estimula y activa la NAT. Esta enzima incrementa los niveles de N-acetilserotonina, inmediato precursor de la melatonina (Reiter, 1991b). Esta respuesta se logra tanto con inhibidores de la fosfodiesterasa (teofilina) como

con diburitol-AMP<sub>c</sub>, ya que en ambos casos se logra un incremento en los niveles intracelulares de AMP<sub>c</sub>. La norepinefrina, a su vez, produce un aumento en la captación de triptófano, fenómeno que es específico y que no puede ser reproducido por el mero incremento en los niveles intracelulares de AMP<sub>c</sub> con diburitol-AMP<sub>c</sub> o teofilina.

La acción de la noradrenalina sobre los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos estimula una proteína G que está conectada a la cascada de los fosfatidilinositoles cuyo último mecanismo es activar la proteinquinasa C. Esta proteína es capaz de activar a la adenilato ciclasa, aumentando la concentración de AMP<sub>c</sub> y activando de esta manera al enzima NAT (Klein, 1985; Binkley, 1987; Ho y cols., 1988).

La NA activa tanto el receptor  $\beta_1$ , como el  $\alpha_1$  adrenérgico del pinealocitor. Sin embargo, el número de receptores  $\alpha_1$  no sigue un ritmo circadiano y tampoco disminuyen tras estímulo agudo con agonistas adrenérgicos. Sus variaciones en número ocurren lentamente, tal como sucedería si su regulación ocurriese por un proceso de síntesis y degradación. Este proceso es opuesto, y mucho más lento al postulado para los  $\beta$ -receptores: activación e inactivación por ocultamiento y reciclado (Sugden y Klein, 1985). La concentración de  $\beta$ -receptores varía de una manera circadiana en la glándula pineal de rata; sin embargo los estudios difieren en el momento pico en que ocurre la mayor concentración de receptor (Reiter, 1991c). Durante la noche los niveles altos de melatonina podrían restaurar la sensibilidad  $\beta$ -adrenérgica que se pierde por la exposición diurna a altas concentraciones de catecolaminas circulantes. De hecho, la inyección de porpanolol, un antagonista del receptor  $\beta$ -adrenérgico, antes del comienzo del período de oscuridad inhibe el incremento nocturno en la actividad de la NAT, al igual que la reserpina, una droga que depleciona las neuronas de catecolaminas. La exposición de la rata a luz continua, y la extirpación bilateral del ganglio cervical superior provocan un reducido impulso noradrenérgico hacia la glándula (Bowers y Zigmond, 1982), con el resultado de un aumento compensatorio en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos pineales. Ello condiciona que una inyección de isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) en el período de luz cause un incremento inmediato en la actividad pineal de la NAT (Klein y cols., 1978; Reiter y cols., 1987; Guerrero y cols., 1988; Santana y cols., 1988; González-Brito y cols., 1988). Consecuencia de todo lo cual debiera ser un aumento de la producción de melatonina. Sin embargo, Heydorn y colaboradores (1983) describen lo contrario: una

menor producción, por mecanismo aún desconocido, quizá debido a la supresión de la actividad HIOMT.

#### 4.- Regulación hormonal de la síntesis de melatonina

Está firmemente establecida la participación de la glándula pineal en la regulación de la función gonadal (Cardinali, 1981). Varios componentes pineales comparten propiedades antigonadales, entre ellos la melatonina (Cardinali, 1981) y varios péptidos (Benson y cols., 1981). Asimismo algunas hormonas de procedencia gonadal o adenohipofisiaria afectan por mecanismo retroalimentación al penealocito y/o su innervación simpática ocasionando un cambio en su actividad biosintética (Cardinali y cols., 1983). Las manipulaciones endocrinas (extirpación de hipófisis, tiroides o adrenal) afectan la morfología y bioquímica de la pineal (Cardinali y cols., 1987).

El efecto directo de diversas hormonas sobre la fisiología pineal viene apoyado por la descripción de receptores específicos en fracciones subcelulares de pineal. Se han descrito receptores para estrógenos, progesterona, testosterona, 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona, glucocorticoides, prolactina y melatonina (Cardinali, 1986).

Puesto que la noradrenalina liberada por las terminales nerviosas simpáticas estimula la actividad NAT y la secreción de la melatonina, sería previsible que el aumento plasmático de catecolaminas procedentes de la médula adrenal o del sistema nervioso simpático inducido por estrés, produjera un aumento en la actividad de la NAT. Sin embargo, las neuronas del ganglio cervical superior no se estimulan por estrés, mientras que sí lo hacen el resto de las neuronas del sistema nervioso simpático. Parfitt y Klein en 1976 encuentran que el aumento en la concentración de la NAT pineal tras estrés agudo (susceptible de bloqueo mediante adrenalectomía bilateral) es bastante menor en comparación con el que ocurre normalmente durante la noche. Con el mismo estímulo estresante obtienen tanto un aumento como disminución de la actividad de la NAT (Joshi y cols., 1986).

El estímulo pineal por estrés agudo puede suprimirse mediante demedulación adrenal y por tanto podría deberse a la liberación de catecolaminas por la médula suprarrenal. La respuesta pineal al estrés crónico parece depender de los esteroides adrenocorticales (Beck y cols., 1982) y podría conducir a un descenso en la producción de

melatonina tanto en animales de experimentación como en humanos (Lynch y Deng, 1986).

### **5.- Circulación y excreción de melatonina**

El alto grado de lipofilicidad de la melatonina hace que escape rápidamente del pinealocito al torrente sanguíneo y al LCR a través de un mecanismo de difusión pasiva siguiendo un gradiente de concentración.

La melatonina se encuentra presente en el plasma, en la orina y en la saliva de todos los animales, incluyendo la especie humana, y la pinealectomía reduce los niveles circulantes de la misma y suprime su ritmo circadiano (Karasek y Reiter, 1992). Además el ritmo circadiano de melatonina en la sangre y en la orina, en los primates existe un ritmo en el LCR(FSC) (Reppert y cols., 1979). Si hay mecanismos específicos que gobiernan la liberación de la melatonina desde la glándula pineal, permanecen desconocidos. Aun no estando claramente establecido si la melatonina se libera a la sangre o al FSC, existe un cierto consenso por el que se piensa que la melatonina se libera directamente a la sangre, y sólo secundariamente a otros fluidos del cuerpo, pasando de la sangre a los ventrículos cerebrales a través del plexo coroideo.

En aquellos animales en los que la glándula pineal o parte de ella se encuentra muy próxima al receso pineal, existen modificaciones morfológicas que permitirían una liberación directa de la misma al LCR (Welsh y cols., 1989). La mayor concentración de melatonina en el LCR que en el plasma en algunos casos puede tomarse como evidencia de que el LCR pueda ser un importante ruta de secreción y transporte hacia los lugares efectores (Hedlund y cols., 1976).

### **C.-Producción extrapineal de la melatonina**

Como se ha comentado anteriormente la síntesis de melatonina también tiene lugar en estructuras extrapineales como el tracto gastrointestinal, hígado, la retina, el timo, los linfocitos de sangre periférica, la glándula Harderiana y el hipotálamo (revisado por Kvetnoy y Yuzhakov, 1994); Igor y cols., 1994), siendo posible que la melatonina extrapineal ejerza su función en el caso de la pinealectomía. En cada uno de estos lugares

se ha demostrado la actividad de la HIOMT y, en el caso de la retina, la síntesis de melatonina ha sido demostrada en las cuatro clases de vertebrados.

Con respecto al papel de la pineal en el interior de estos lugares de síntesis extrapineal, todos los datos se refieren al caso de la retina, donde la melatonina provoca la condensación de melanina (Pierce y Besharse, 1985) y la concentración de conos (Pang y Yew, 1979). Los niveles intraoculares de melatonina y la actividad de la NAT muestran ritmicidad circadiana, con valores superiores de noche respecto al día, tanto en especies diurnas como nocturnas. Los efectos de la luz sobre los niveles oculares de melatonina en aves son muy similares a los efectos ya observados en la glándula pineal (Wiechmann, 1986). En el anfibio *Xenopus laevis*, el ritmo ocular de la NAT persiste *in vitro*, demostrado que hay un reloj circadiano en cada ojo. Es muy probable, en el caso de algunos anfibios y aves, que los controladores de los ritmos circadianos residan en los ojos además de en la glándula pineal.

La síntesis de la melatonina extrapineal no está completamente descrita, pero parece que este proceso es independiente de la glándula pineal, y que estos tejidos puedan mantener una regulación de la ruta de biosíntesis diferente de la regulación de la síntesis en la glándula pineal. Además, esta melatonina parece ser utilizada en exclusiva por el órgano que la produce, ya que no pasa a la circulación, aparentemente

### III.- Metabolismo y excreción de la melatonina

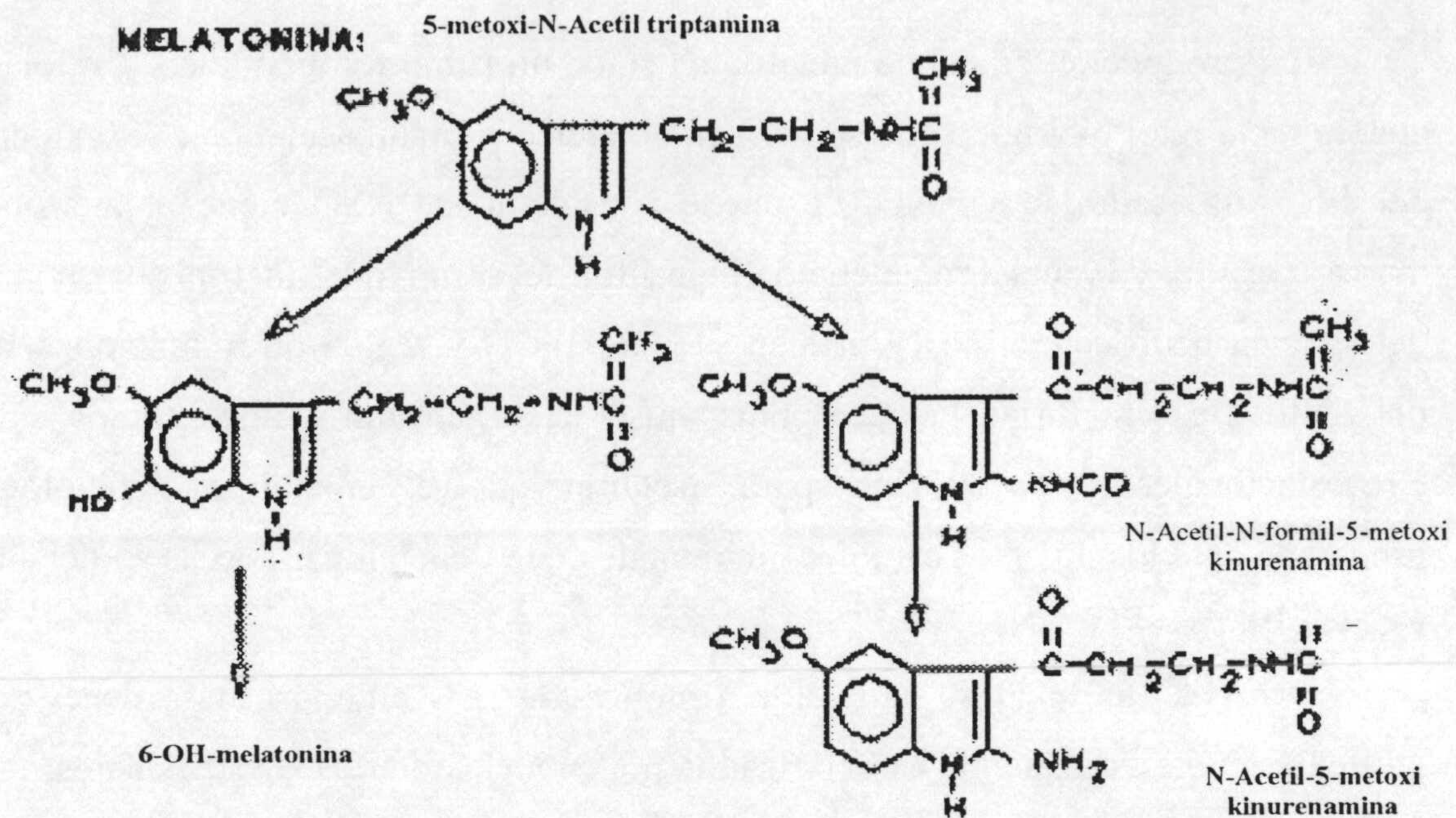
La mayoría de la melatonina liberada a la sangre es metabolizada en el hígado (Fig. 3), mediante 6-hidroxilación, produciendo metabolitos hidroxilados que a su vez conjugan con el ión sulfato y con el ácido glucurónico. Otros autores (Leone y Silmon, 1984) refieren una metabolización por O-demetilación, y en el cerebro por formación de kinurenamina (Hirata y cols., 1974).

En el SNC es rápidamente oxidada hacia N-acetil-5-metoxi-kinurenamina, sustancia que supone un 15 % del total de los metabolitos de la hormona (Dubocovich, 1983).

Además de la 6-hidroxilación, otras vías metabólicas de melatonina incluyen:

- 1.- deacetilación mediante una aryl-acylamidasa hepática hasta producir 5-metoxi-triptamina (MT).

2.- rotura de su anillo pirrólico por la indoleamina-2,3-dioxigenasa con la producción de derivados de la kinurenamina.



*Figura 3: Esquema del metabolismo de la melatonina*

En enfermos con cirrosis hepática se han descrito mayores concentraciones de melatonina, medida entre las 9 y las 11 h (Iguchi y cols., 1983). Los principales metabolitos en orina y heces son el sulfato (70 % del total) y glucuronato de 6-hidroximelatonina (Wurtman y cols., 1983).

La vida media de melatonina tiene unos valores que fluctúan de 20 min (Dubocovich, 1983), a 45-60 min (Wurtman y cols., 1983), según distintos autores. Esta variedad de resultados pueden ser debidos parcialmente a diferentes vías de administración, diferentes métodos usados para la determinación de melatonina o a diferencias específicas de especie.

## **IV.- Acciones de la melatonina**

### **A.- Control de los ritmos biológicos**

La producción pineal de melatonina sigue un ritmo fotoperiódico controlado por el denominado reloj biológico que se sitúa en el núcleo supraquiasmático (NSQ), dependiente del ciclo luz:oscuridad y SNC. Se puede considerar a l NSQ como el metrónomo que marca la pauta, y la melatonina como el ejecutor del ritmo, que sincroniza a su vez el resto del sistema neuroendocrino (Wurtman y cols., 1961) y regula otras funciones superiores del SNC. De esta forma la melatonina ajusta el organismo a unos ritmos circadianos, circaestacionales y circanuales, para asegurar que el animal esté fisiológicamente preparado ante los diversos cambios ambientales que tienen lugar a lo largo del año (Reiter y cols., 1987).

Ritmos anormales han sido implicados en algunos desórdenes afectivos, particularmente en aquellos caracterizados por modelos diarios o estacionales, tales como la depresión endógena y el desorden afectivo estacional (Rusk, 1995). En estos casos, se han registrado bajas concentraciones nocturnas de melatonina en el suero de los pacientes con depresión (Brown y cols., 1987), y alteraciones en la secreción de melatonina en los pacientes con desorden estacional afectivo (Blehar y cols., 1989). Esto pone de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre los niveles de melatonina y la sincronización de los ritmos biológicos.

### **B.- Melatonina y los ciclos sueño-vigilia en humanos**

Las alteraciones debidas a la pérdida de sincronización entre el ritmo circadiano de secreción de la melatonina y las horas habituales de sueño conducen, por lo general, a situaciones de insomnio. Recienintemente, se ha descrito a través de estudios electrofisiológicos que una mayor disminución en los niveles de 6-sulfatoximelatonina nocturna en orina de individuos de edad avanzada con problemas de insomnio respecto a individuos sanos de la misma edad (Tzischinsky y cols., 1993).

La ingestión exógena de la melatonina (a partir de 0,5 mg) modifica la capacidad para iniciar el sueño, así como la duración y calidad del mismo (Lieberman y cols., 1984). El incremento sérico de los niveles de melatonina (tanto a valores nocturnos normales como a valores farmacológicos) provoca el inicio del sueño, con independencia del ritmo



circadiano endógeno. Por otra parte los efectos hipnóticos de la melatonina podrían relacionarse con los efectos hipotérmicos de la misma (Cagnacci y cols., 1992). El ciclo circadiano de la temperatura corporal está íntimamente unido al ciclo de 24 horas de sueño-vigilia e inversamente relacionado con las concentraciones de melatonina en suero.

Además, la melatonina modifica los niveles cerebrales de los neurotransmisores monoaminérgicos, iniciando así, una cascada de reacciones que pueden culminar en la activación de los mecanismos del sueño.

### C.- Melatonina y reproducción

La relación entre la glándula pineal y los mecanismos reproductores se puso de manifiesto a partir de los estudios llevados a cabo en el hámster (*Mesocricetus auratus*).

Los cambios en la longitud del fotoperiodo diario controlan la actividad gonadal en el hámster (Reiter, 1978), un animal con un estricto comportamiento estacional e hibernante. Los órganos reproductivos del hámster son extremadamente sensibles a la influencia ambiental y a la actividad de la glándula pineal. En el macho, la ceguera o los fotoperiodos cortos producen una atrofia gonadal con una pérdida completa de la actividad espermatogénica. Las gónadas pueden llegar a reducirse hasta en un 80% de su tamaño normal. Estos efectos resultan de una secreción disminuida de FSH y LH desde la pituitaria.

La pinealectomía previene la regresión gonadal en los animales que se mantienen en días con fotoperiodos cortos. En el caso de las hembras los datos son menos concluyentes; sin embargo, hay una pérdida de peso uterino, aparentemente debida a una disminución en la secreción de estrógenos en respuesta a los fotoperiodos cortos, estando también los niveles plasmáticos de gonadotropina disminuidos.

La ceguera no causa una inhibición permanente de la función testicular u ovárica en el hámster. Hay una reversión espontánea de las gónadas al estado adulto normal en aquellos animales que han estado ciegos durante 27 semanas. Esto podría explicar lo que normalmente sucede bajo condiciones de hibernación, cuando los hámsters son reproductivamente competentes al salir de sus cubículos en la primavera. La explicación a este fenómeno de activación espontánea no está clara. Parece ser que el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal puede llegar a ser refractario a la melatonina. Se ha demostrado que las inyecciones exógenas de melatonina causan regresión testicular en los hámsters

pinealectomizados, a pesar del fotoperiodo. También, en presencia de niveles elevados de melatonina se observa una falta de respuesta a las inyecciones diarias de la misma. Así, la exposición continua a melatonina provoca una desensibilización de los tejidos diana. Por lo tanto, es importante que la melatonina se libere de manera rítmica más que de forma continuada, para ser fisiológicamente efectiva.

La eficacia de la administración exógena de melatonina para modificar algunos patrones reproductivos varía mucho de una especie a otra, con la edad, el sexo y el momento de la administración.

Aunque la especie humana no presenta fuertes patrones de estacionalidad, los estudios epidemiológicos en diversas áreas geográficas apuntan a una distribución estacional de las concepciones y los nacimientos (Rojansky y cols., 1992). En aquellas poblaciones que viven en el ártico, las funciones bajo control del eje pituitario-gonadal y el número de concepciones están disminuidos en los meses de invierno respecto a los de verano (Kauppila y cols., 1987); Rojansky y cols., 1992).

La primera relación entre la glándula pineal y los mecanismos reproductores en humanos se indica ya en 1898 por Heubner, quien describe un caso de pubertad precoz en un niño con un tumor no parenquimal en la glándula pineal. Muchos otros casos fueron descritos más tarde, apoyando la relación entre una deficiencia de melatonina y una activación de la función pituitaria-gonadal. En la literatura hay descrito un caso clínico de un paciente con hipogonadismo hipogonadotrópico, con pubertad retrasada y altos niveles séricos de melatonina, en el que la secreción gonadotrópica aumentó y el desarrollo sexual ocurrió tras una disminución espontánea de la secreción de melatonina (Puig-Domingo y cols., 1992; ). Estos descubrimientos sugieren que los cambios en la secreción de melatonina pueden afectar a la producción de esteroides sexuales, y viceversa. Por tanto, el comienzo de la pubertad en los humanos puede estar relacionado con el declive en la secreción de melatonina que acompaña al crecimiento de los niños. Algunos niños con pubertad precoz poseen bajos niveles de secreción de la melatonina para su edad (Waldhauser y cols., 1991).

En mamíferos se ha estudiado el efecto de los esteroides sobre la secreción de melatonina así como el efecto de la melatonina sobre la síntesis de esteroides (Férrandez y cols., 1990, 1992; Alonso y cols., 1993). Los primeros indicios de la relación entre la glándula pineal y los niveles de estrógenos se encontraron al comparar los ritmos de varias sustancias encontradas en la glándula pineal con los ritmos de estrógenos, como por

ejemplo el ritmo de adenilato ciclasa (Weiss y Crayton, 1970), serotonina, melatonina e incluso el enzima HIOMT (Wurtman y cols., 1970) que parecen ser paralelos a los ritmos de las hormonas reproductivas durante la fase de "estro" del ciclo, pero no ha sido demostrado para el enzima NAT (Cardinalli y Vacas, 1978).

Los mecanismos de acción de los esteroides sobre la glándula pineal parecen encontrarse a varios niveles: en algún elemento neural localizado entre la retina y los pinealocitos, en la membrana o en el interior celular de los pinealocitos o incluso en las células blanco de la melatonina donde los esteroides podrían modular su acción. Sin embargo, durante años se han buscado los receptores para estrógenos de la glándula pineal y se han descrito sitios de unión específicos para el estradiol en el citoplasma de los pinealocitos (Nagle y cols., 1972) cuyo coeficiente de sedimentación es similar al encontrado en otras células blanco del esteroide.

Los hechos experimentales llevan a la conclusión de que existe una relación recíproca entre la melatonina y los esteroides. La naturaleza de las acciones inducidas por los esteroides, no ha sido completamente establecida, pero las hormonas gonadales podrían acutar a diferentes niveles dentro y fuera del los pinealocitos, icnluyendo niveles presinápticos y postsinápticos de interacción así como sobre algunos neurotransmisores que podrían estar implicados en su mecanismo de acción.

La melatonina también es capaz de modular la función ovárica directamente (Brzezinski y cols., 1987), y se han detectado receptores de melatonina en las membranas de las células de la granulosa (Yie y colbs., 1995). Asimismo, la melatonina estimula in vitro la síntesis de progesterona en las células de la granulosa del cuerpo lúteo (Webley y colbs., 1986). Colectivamente, estos descubrimientos sugieren que la melatonina posee un importante papel en la regulación intraovárica de la estereogénesis.

#### **D.- Melatonina y actividad cerebral**

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos relacionando a la melatonina con el control de la función cerebral. La melatonina ejerce una influencia inhibidora sobre el SNC; dosis farmacológicas de esta hormona previenen las convulsiones en varios modelos animales (Acuña-Castroviejo y cols., 1995). Además, la melatonina presenta efectos analgésicos y asiolíticos (Golombeck y cols., 1993), efectos todos ellos similares a los producidos por las benzodiazepinas.

En consecuencia, el papel propuesto para la pineal como un órgano homeostático que influencia la excitabilidad del SNC, podría relacionarse con cambios en la actividad de los receptores del complejo GABA-benzodiazepinas, o que a su vez induciría cambios en la actividad GABAérgica (Cardinali y cols., 1986). Los niveles cerebrales de GABA, el neurotransmisor inhibitor más importante del cerebro de mamífero incluido el hombre, aumentan tras la inyección de melatonina (Antón-Tay, 1974). Estos datos fueron la base de los estudios posteriores que demostraron que los receptores cerebrales de GABA y benzodiazepinas están bajo control de la pineal (Acuña-Castroviejo cols., 1986a, 1986b). Dichos receptores cambian a lo largo del día mostrando un ritmo circadiano con un mínimo en el número de receptores a las 12 de la noche. La pinealectomía altera dicho ritmo, que puede normalizarse tras la administración de melatonina (Figura 4)

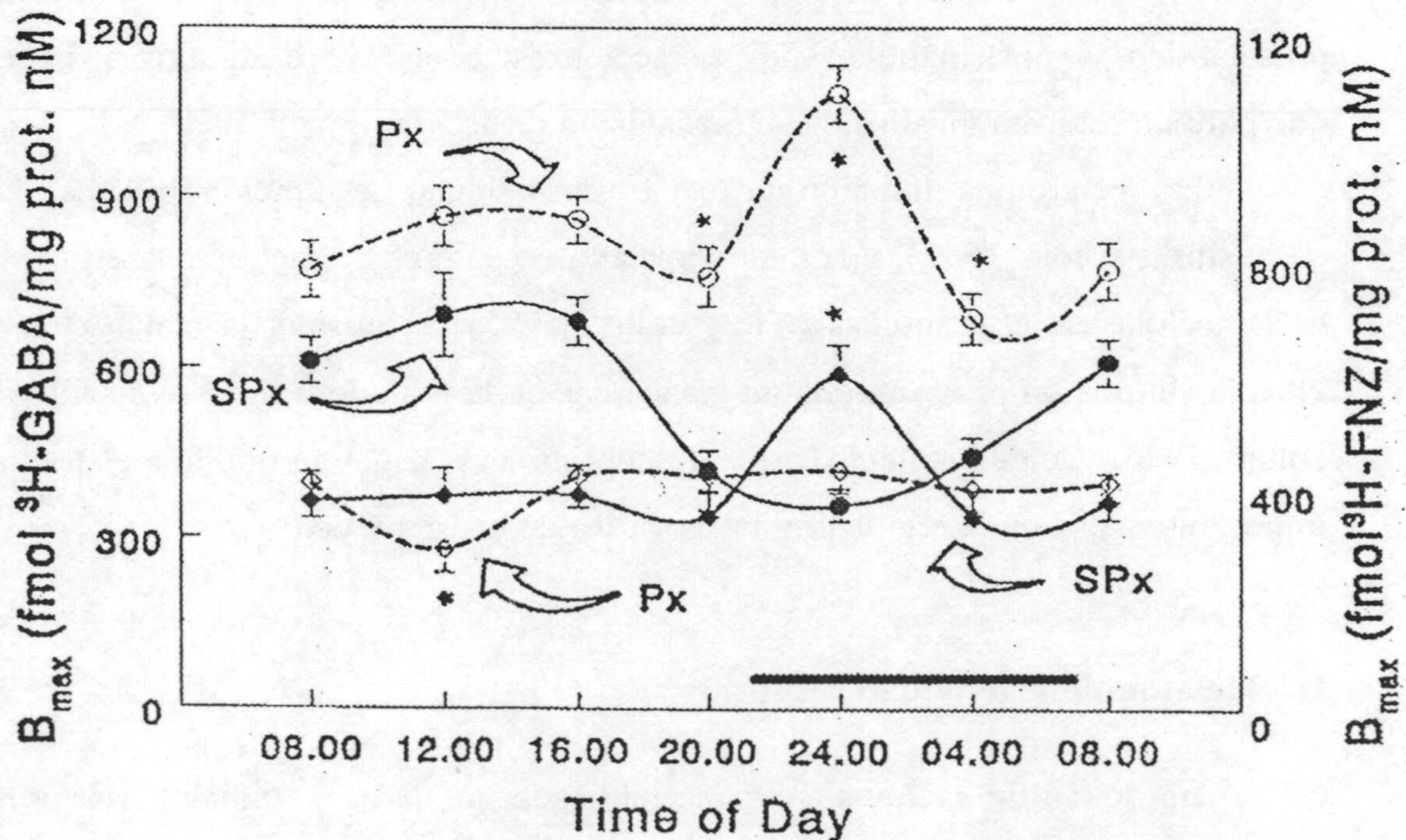


Figura 4: Relación pineal y receptores de GABA

Lo más interesante es que la administración de dosis fisiológicas de melatonina (50µg/kg de peso) son suficientes para normalizar dicho ritmo (Acuña-Castroviejo y cols., 1986b). Los efectos anticonvulsionantes, antimotores, relajantes musculares y ansiolíticos de la melatonina son muy similares a los de benzodiazepinas, aunque con una potencia menor. Los receptores de benzodiazepinas, asociados al del GABA, también presentan un bajo control de la pineal siendo la melatonina la hormona encargada de sincronizar su ritmo circadiano (Acuña-Castroviejo y cols., 1986a) (Figura 4).

El efecto de la melatonina sobre los receptores GABA y de benzodiazepinas no es directo, ya que la melatonina no compete *in vitro* con dichos receptores (Acuña-Castroviejo y cols., 1986a, 1990). La melatonina regula la actividad de la bomba de sodio cerebral, el enzima encargado del mantenimiento del potencial de reposo de la membrana. Como consecuencia de la modificación de la actividad de la bomba de sodio, la melatonina puede indirectamente alterar la permeabilidad de la membrana, potenciando la neurotransmisión GABAérgica (Acuña-Castroviejo, 1992b).

En el efecto de la melatonina sobre la actividad cerebral también participan los péptidos corticotropos y opiodes (Gomar y cols., 1993c). Así, la analgesia inducida por la melatonina es bloqueada tanto por la administración de naloxone como de flumazenil, lo que sugiere que algunos efectos de la melatonina dependen de la integridad de los receptores de benzodiazepinas y opioides. Estudios posteriores han demostrado que la melatonina puede operar vía sistema opioide endógeno (Gomar y cols., 1993a, 199b). Se ha propuesto la existencia de un sistema homeostático opioide-antiopioide, en el que el complejo GABA-benzodiazepinas actuaría como efector (Acuña-Castroviejo y cols., 1995). La melatonina interacciona con los péptidos corticotropos (Gomar y cols., 1994), y se ha sugerido que esta indolamina puede acutar sobre la síntesis de neuroesteroides a nivel mitocondrial. La interacción melatonina-neuroesteroides podría explicar, al menos en parte, la regulación que la hormona pineal ejerce sobre el complejo GABA-benzodiazepinas.

Las acciones de la melatonina para potenciar la neurotransmisión GABAérgica no explican en su totalidad la actividad inhibidora de la hormona sobre el SNC. Los datos más recientes obtenidos a partir de estudios bioquímicos y electrofisiológicos indican que los efectos anticonvulsionantes y depresores del SNC realizados por la melatonina pueden depender también de su actividad antioxidante y antiexcitotóxica. Estos efectos se

manifiestan actuando la melatonina como depurador de radicales libres e inhibiendo los receptores cerebrales glutamatérgicos (Escames y cols., 1996).

### **E.- Melatonina y el estrés oxidativo**

El estrés oxidativo resulta de la acción biológica de los radicales libres. Este tipo de reacciones producen daño tisular y patologías neurodegenerativas en muchas situaciones (Coyle y Puttfarcken, 1993). Los radicales libres son, además, estimulantes de la liberación de glutamato (Pellegrine-Giampietro y cols., 1990), el aminoácido excitador más importante del cerebro humano. El glutamato se une y activa dos grandes grupos de receptores en el SNC: los receptores glutamatérgicos ionotrópicos, que se clasifican en NMDA y no NMDA, y los receptores metabotropos (Nakanishi, 1992). Si el glutamato se une a sus receptores ionotrópicos durante demasiado tiempo, se produce una excesiva excitación neuronal o excitotoxicidad (Choi, 1988). El proceso de excitotoxicidad lleva a la generación de radicales libres que causan un daño cerebral progresivo con la consecuente muerte celular. Además, el glutamato puede inducir la formación de radicales de oxígeno directamente (Dykens y cols., 1987).

Existen pruebas directas de que la melatonina inhibe los receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Así, la melatonina protege las neuronas de la excitotoxicidad del kainato, un agonista de un subtipo no NMDA, tanto *in vitro* como *in vivo* (Giusti y cols., 1995). La iontoforesis de melatonina también inhibe de forma dosis-dependiente la excitación del receptor NMDA *in vivo* (Castillo-Romero y cols., 1993) por un mecanismo que involucra a la dopamina (Escames y cols., 1996) y los canales de calcio (Acuña-Castroviejo y cols., 1995). La excitotoxicidad de los receptores NMDA glutamatérgicos depende de la activación de la óxido nítrico sintetasa (NOS) calcio-dependiente, que a su vez produce óxido nítrico (NO). Aunque el NO es necesario para los procesos de comunicación intra e intercelular, su producción en exceso es causa de excitotoxicidad. Ha sido demostrado recientemente que la melatonina regula la actividad de la NOS, ya que la melatonina se une a la calcio-calmodulina impidiendo que este complejo active a la NOS (Pozo y cols., 1994; Betahi y cols., 1996; León y cols., 1998a, 1998b).

El efecto protector celular de la melatonina, derivado directamente de su acción depuradora de radicales libres, se manifiesta a todos los niveles de la célula, y esto hace de la melatonina un excelente antioxidante, mejor que otros conocidos como las vitaminas E,

C y A, y el glutathion. En diversas situaciones experimentales en las que se generan radicales libres por administración de tóxicos (paraquat, lipopolisacáridos bacterianos), por la exposición de carcinógenos (safrole) o radiaciones ionizantes, la melatonina ha sido capaz de proteger a la célula del daño que normalmente causan esos agentes (Reiter, 1995). Recientemente, se ha demostrado que la melatonina es muy eficaz en la protección del sistema nigroestriatal de la degeneración parkinsoniana inducida por la administración de MPTP a ratones (Acuña-Castroviejo y cols., 1997).

#### **F.- Melatonina y envejecimiento**

La funcionalidad de la glándula pineal va disminuyendo a medida que la edad va avanzando. Esta degeneración se hace especialmente evidente en la gradual reducción de la amplitud del pico melatonina nocturno (Iguchi y cols., 1982).

Si bien la fisiología de la melatonina fue inicialmente definida en términos de regulación del eje neuroendocrino en especies fotoperiódicas, su papel como antioxidante y el hecho de que su producción decline con la edad han reforzado su papel como molécula cicloprotectora dentro del contexto general de la Teoría del Envejecimiento por radicales libres.

Dos patologías importantes asociadas al envejecimiento como son el Parkinson o la enfermedad de Alzheimer están relacionadas en parte con los radicales libres. Por otra parte, los niveles de melatonina en pacientes con Alzheimer son menores que en pacientes sanos (Nair y cols., 1986; Skene y cols., 1990), aunque lógicamente es difícil aventurar cualquier relación causa-efecto. Recientemente se ha descrito que en cultivos de células de neuroblastoma la melatonina previene la muerte de las mismas asociada a la exposición a la proteína amiloidea (Papolla y cols., 1997).

Los efectos más espectaculares y controvertidos del efecto antienvjecimiento de la melatonina son los publicados por Pierpaoli y Regelson (1994) donde se demuestra, en ratones de laboratorio, un aumento de la longevidad en aquellos animales transplantados con una pineal de animal joven.

Se ha demostrado que la melatonina puede modular el recambio de zinc (Mocchegiani y cols., 1994). A medida que el envejecimiento progresa, no sólo disminuyen los niveles de melatonina en plasma, sino que también lo hacen los niveles de timulina y los niveles de zinc en el mismo, acompañándose de degeneración tímica

(Derdenne y cols., 1982). En los ratones de edad muy avanzada el tratamiento con melatonina, como los explantes de pineal en timo, corrigen todos los parámetros inmunológicos, incluyendo la celularidad del timo y el número de linfocitos periféricos, así como el contenido de zinc, a valores similares a los de animales jóvenes.

### **G.- Melatonina y sistema inmune**

Las propiedades inmunorreguladoras de la melatonina y la sensibilidad de la pineal a sustancias de origen inmunológico, tales como las citokinas o las hormonas del timo nos indican la existencia de un flujo bidireccional de información entre la glándula pineal y el sistema inmune. Así, se ha demostrado que el IFN $\gamma$  aumenta la producción de melatonina en cultivos de glándula pineal de rata (Withyachumnarnkul y cols., 1990), mientras que por otra parte inhibe la actividad NAT estimulada por isoproterenol (Withyachumnarnkul y cols., 1991). Dos posibles mecanismos para la activación por IFN $\gamma$  de la glándula pineal de rata han sido propuestos: una mejor entrada de triptófano en las terminales nerviosas simpáticas y en el pinealocito, junto a una regulación a la baja de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana plasmática del pinealocito.

El resultado final, tanto para obtener un incremento como una inhibición en la producción de melatonina, depende de la dosis de IFN $\gamma$  y del nivel de estimulación noradrenérgica del pinealocito (Withyachumnarnkul y cols., 1990).

La primera evidencia de una relación funcional entre la glándula pineal y el sistema inmune fue descrita por Csaba y Barath (1975), junto a Jankovic y cols. (1970), quienes hallaron desorganizaciones en las estructuras tímicas tras pinealectomía en las ratas recién nacidas. Posteriormente, Maestroni y Pierpaoli mantuvieron bajo luz continua a ratones de laboratorio durante cuatro generaciones para suprimir la producción de melatonina. La tercera y la cuarta generación de estos animales crecieron de manera anómala y mostraron una deficiente producción de anticuerpos, acompañada de depleción celular en la corteza del timo y atrofia de la pulpa blanca del bazo (Maestroni y Pierpaoli, 1981).

Estudios adicionales de ratones a los que se les administraba propanolol a última hora del día dieron como resultado una incorrecta respuesta primaria a la exposición frente a eritrocitos de carnero (Maestroni y cols., 1986). La administración de melatonina durante la noche revertía los efectos antes indicados, y en los animales control la administración de melatonina aumentaba el número de células formadoras de placas y estimulaba tanto las



respuestas primarias como secundarias frente a los eritrocitos de carnero (Maestroni y cols., 1987).

En ratones, la melatonina antagoniza la depresión en la producción de anticuerpos que se produce bajo condiciones agudas de estrés o bajo el tratamiento con corticoesteroides o ciclofosfamida (Maestroni y cols., 1986; Maestroni y cols., 1988). La administración concomitante de antagonistas específicos de opioides como la naltrexona abole los efectos antiestrés de la melatonina (Maestroni y cols., 1988), mientras que opioides como la  $\beta$ -endorfina o la dinorfina<sub>1-13</sub> mimetizan los efectos antiestresantes de la melatonina (Maestroni y cols., 1989). Estos mismos autores demostraron que concentraciones fisiológicas de melatonina estimulan a las células CD4<sup>+</sup> *in vitro* para liberar ciertos mediadores que compiten con la unión específica de la <sup>3</sup>H-naloxona a las membranas de timo y a cerebro de ratón (Maestroni y Conti, 1990; 1991). Hasta la fecha estos ligandos de receptores opioides con efectos análogos a los de la melatonina sobre la celularidad del timo y reactividad a antígenos no han sido identificados. Por otra parte Maestroni y colaboradores han demostrado que la melatonina rescata a las células de la médula ósea de la apoptosis inducida por drogas usadas en quimioterapia como el etopósido o la ciclofosfamida, tanto *in vitro* como *in vivo* (Maestroni y cols., 1994; 1994b). Sus estudios indican que este efecto está mediado por la estimulación de la producción de una sustancia análoga a la IL-4, que puede entonces estimular a las células del estroma para producir GM-CSF (glicoproteína secretada principalmente por macrófagos).

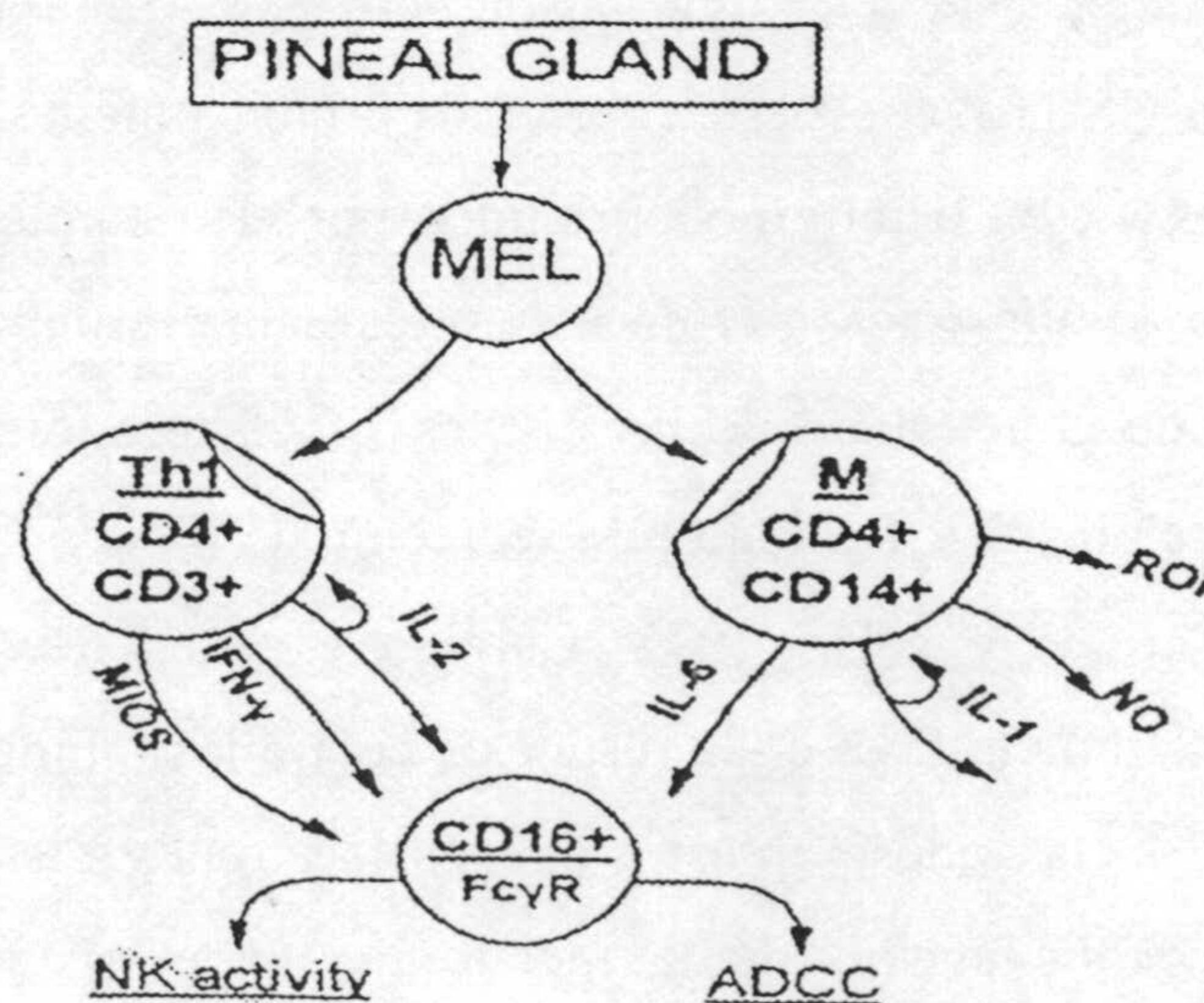
En ratones viejos o inmunodeprimidos por el tratamiento con ciclofosfamida, la administración crónica de melatonina estimuló la respuesta de antígenos tras la inducción de la actividad de las células T colaboradoras, aumentó la respuesta de mitógeno de las células B y T e indujo la secreción de IFN $\gamma$  y de IL-2 en esplenocitos (Sze y cols., 1993; Carolec y cols., 1992; Caroleo y cols., 1994). Además, la melatonina potencia la actividad de la IL-2 en la respuesta contra los tumores en humanos (Lissoni y cols., 1992; 1992b). Basándose en estos datos, Maestroni y Lissoni postulan que dos de los principales blancos de acción de la melatonina en el sistema inmune deben ser los linfocitos T y los macrófagos (Lissoni y cols., 1993).

La melatonina reduce la letalidad que se produce en situaciones de estrés experimental en aquellos ratones que han sido infectados con dosis subletales de virus de la encefalomiocarditis (Maestroni y cols., 1988). Además, antagoniza la reducción del peso del timo inducida por corticoesterona en ratones inmunizados con el virus de la viruela.

Estos datos han sido confirmados por Ben-Nathan y cols. (1995) mostrando una reducción en la viremia y retrasando la aparición de la enfermedad y la muerte tras la infección con el virus Semliki, causante de una encefalitis.

Recientemente, García-Mauriño y cols. (1997) han demostrado una activación por melatonina de la producción de IL-2 y de IFN $\gamma$ , en linfocitos humanos Th1 *in vitro*, mientras que los linfocitos Th2 parecen no verse afectados por la melatonina, como lo demuestra el hecho de que la secreción de IL-4 no se altera en ninguna de las situaciones experimentales.

Los autores demuestran que la melatonina estimula la secreción de IL-6 en células mononucleares periféricas humanas tras estimular a los monocitos, como lo indica el hecho de que la población es incapaz de responder a la melatonina tras la depleción con anticuerpos CD14<sup>+</sup>. Por otra parte, la melatonina aumenta la expresión del marcador de activación CD69 en células CD4<sup>+</sup>, y no así en células CD8<sup>+</sup>. Los autores, por otra parte, muestran que el mecanismo de acción pudiera estar mediado por la transactivación de los receptores nucleares RZR/ROR y proponen un esquema de acción para la melatonina sobre los CD4<sup>+</sup> circulantes que se esquematiza en la Figura 5.



**Figura 5:** Hipótesis sobre la acción de la melatonina en las células CD4<sup>+</sup> circulantes humanas

Por último es de destacar que los efectos de la melatonina varían de una forma circadiana y también incluso a lo largo de las estaciones del año, describiéndose en este sentido un aumento en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos tras la administración de melatonina en verano, no obteniéndose efecto alguno en otras épocas del año (Giordano y cols., 1993).

## V.- Mecanismo de Acción de la melatonina

Hoy en día se empieza a considerar a la melatonina no como una hormona en el sentido clásico, sino como un protector celular conservado evolutivamente. La melatonina no es una hormona en el sentido clásico por dos motivos principales:

- a.- no se sintetiza en un órgano específico. Hoy en día sabemos que la melatonina se sintetiza en muchos otros sitios además de la glándula pineal, tal y como se ha descrito en apartados anteriores.
- b.- no actúa en un órgano diana específico. La melatonina al ser muy lipofílica, actúa a todos los niveles de la célula (membrana, citosol, núcleo y mitocondria), y llega a todas las células del organismo

### A.- Receptores nucleares de melatonina

#### 1.- Introducción

Las hormonas lipofílicas, debido a su capacidad de difusión por ambiente hidrófobos, son candidatos ideales para servir como reguladores de expresión diferencial de diversos genes. Entre estas hormonas se incluyen los esteroides, retinoides, hormonas tiroideas y la vitamina D<sub>3</sub> así como la melatonina.

Los receptores nucleares se caracterizan por un dominio de unión al ADN localizado centralmente, que guía al receptor hacia las secuencias específicas en el ADN conocidas como elementos de respuesta o HRE (*Hormone Response Element*). La zona de unión al ADN o DBD (*DNA Binding Domain*) se compone de dos dedos de zinc muy conservados, que caracteriza y diferencia a los receptores nucleares de otras proteínas de unión a ADN.

El extremo carboxilo terminal del receptor funciona como dominio de unión al ligando o LBD (*Ligand Binding Domain*). En términos muy simples, el LBD se puede asimilar a un interruptor molecular, que tras la unión del ligando, hace que éste pase a un estado transcripcional activo en un proceso denominado transactivación.

No se conoce si estos dominios surgieron independientemente unos de otros, o si los primeros miembros fueron factores de transcripción constitutivos que fueron adquiriendo propiedades ligando-dependiente. Posee dos dominios de transactivación (AF-1 y AF-2) involucrados en la interacción con represores, correpresores y activadores. El dominio CET (*Carboxi Terminal Extension*) es una extensión de los dominios de zinc, formando un conjunto de 66 aminoácidos altamente conservados. Hay dos dominios de dimerización; uno, en el LBD, se requiere para la heterodimerización de los receptores sobre repeticiones directas y el otro, se encuentra poco conservado entre familiar distintas pero altamente conservado dentro de cada una de las familias. A diferencia de los receptores esteroideos, no todos los ligandos para receptores nucleares son exclusivamente endocrinos, y pueden ser activados por productos de rutas metabólicas del interior de la célula.

La composición de los HRE puede ser en forma de repetición directa, de palíndrome o bien de palíndrome invertido. La secuencia mínima requerida es de 6 nucleótidos; la composición nucleotídica, la orientación y espaciamiento entre estas secuencias confiere la especificidad necesaria para la unión de los receptores nucleares. La secuencia AgAACA es reconocida preferentemente por glucocorticoides, mineralocorticoides, progesterona y andrógenos, mientras que la secuencia Agg/TTCA es reconocida preferencialmente por estrógenos, hormona T<sub>3</sub>, ácido retinoico y los receptores de vitamina D.

La respuesta a hormonas en secuencias progresivamente más alejadas del consenso es dependiente de la interacción cooperativa con factores de transcripción cercanos. Estas interacciones sirven para restringir la respuesta hormonal a aquellos tipos celulares que expresen la combinación apropiada de factores de transcripción en un momento determinado. Estas secuencias no consenso a menudo solapan con los sitios de unión para otros factores de transcripción, formando lo que se conoce como elemento de respuesta compuesto o CRE (*Composite Response Elements*). Por lo tanto, podemos obtener respuestas hormonales diferentes para un mismo elemento de respuesta compuesto en función de la combinación específica de receptores nucleares y factores de transcripción.

La descripción anterior no es absolutamente realista, ya el ADN a su vez posee una estructura terciaria y cuaternaria que influye en los eventos transcripcionales. Así, las propias histonas han dejado de tener un papel estático para pasar a tener un papel regulador más activo; éstas se asocian al ADN en localizaciones específicas en función de la secuencia del ADN, conformando lo que se conoce por nucleosoma posicional y regulando así la transcripción tanto corriente arriba como corriente abajo en el ADN. En un nucleosoma posicional los contactos histona/ADN empiezan y terminan en posiciones definidas, y el ADN se organiza de tal manera que las secuencias reguladoras se orientan bien hacia fuera, bien hacia dentro o bien quedan en el espacio de conexión entre nucleosomas. De esta manera, una modificación post traduccional de estas histonas puede poner al descubierto secuencias reguladoras que antes estaban ocultas, así como poner en contacto elementos reguladores que estarían muy separados en el caso de un ADN lineal.

Hay aproximadamente unas 150 proteínas que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares. La superfamilia de los receptores nucleares se divide a su vez en dos familiar: a) la familia de los receptores esteroideos y b) la familia de los receptores no esteroideos (TR, RAR, RXR, VDR), diferenciándose en el tipo de secuencia de unión al ADN y la capacidad de heterodimerización. Los subtipos de receptores son productos de genes individuales (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ ), mientras que las isoformas (RAR $\alpha$ 1, RAR $\alpha$ 2, RAR $\alpha$ 3) son productos del uso diferencial de exones, del diferente uso del protmor o de ambos a la vez.

## 2.- Receptores nucleares huérfanos

El término “receptor huérfano” se acuñó a principios de los 90 para describir el primero de lo que sería una larga familia de nuevos productos génicos que, por homología, pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares para los cuales no hay ligando conocido. Actualmente se reconoce que el término de receptor huérfano no es correcto en algunos casos, ya que no todas estas proteínas son dependientes de ligando. Hasta la fecha se han descrito unas 30 subfamilias de receptores huérfanos.

En función de la identidad en la secuencia de ADN, la estructura del DBD, la necesidad de dimerización y la actividad dependiente de ligando, los receptores nucleares se clasifican en 4 categorías.

I.- Formada por aquellos receptores nucleares que forman heterodímeros con RXR. El proceso de heterodimerización es necesario para alcanzar una alta afinidad por los elementos de respuesta, compuestos por al menos dos repeticiones directas o invertidas. Estos heterodímeros responden al ácido 9 *cis* retinoico. Así, estos heterodímeros constituyen nuevas rutas de señalización por retinoides, y son además blanco de ligandos de receptores huérfanos.

II.- La segunda categoría la constituyen aquéllos que se unen a los elementos de respuesta como homodímeros. Estos homodímeros, en contraste con los homodímeros esteroideos pueden unirse a repeticiones directas además de a palíndromes. Muchas de estas secuencias se solapan con elementos de respuesta para otros receptores hormonales. Los receptores huérfanos diméricos son típicamente potentes transactivadores o transrepresores, sugiriendo que son independientes de ligando. Por el contrario, los receptores COUP (*Chicken Ovoalbumin Upstream Promoter Transcription Factor*) son potentes represores tanto de la transcripción basal como de la transactivación por otros receptores, incluyendo RXR, RAR, VDR y TR. La represión de estas rutas de señalización por COUP se cree que se debe en parte a la competición directa por el elemento de respuesta y a la presencia de un dominio carboxiterminal represor muy potente. La habilidad de COUP de unirse a repeticiones directas espaciadas tanto por uno como por cinco nucleótidos sugiere que COUP juega un papel central como regulador negativo general, manteniendo los genes inactivos en ausencia de señal hormonal, aumentando así el efecto inductor posterior de la hormona. Así, aunque muchos de los miembros de esta familia no sean dependientes de ligando, podrían funcionar estableciendo un equilibrio dinámico con otros receptores para modular una respuesta dependiente de ligando.

III y IV. – Integradas por receptores nucleares que se unen como monómeros. Necesitan pues, para una correcta especificidad, del contacto con las posiciones -3 y -1 respecto a la secuencia consenso del elemento de respuesta. Por lo tanto, las diferencias en los residuos de aminoácidos del CET (*Carboxi Terminal Extension*) determina los sitios de unión del monómero. En esta categoría se incluyen receptores que sólo poseen LBD o bien DBD, lo que apoya un origen evolutivamente independiente.

### 3.- Familia de receptores RZR/ROR

El receptor nuclear RZR $\alpha$  fue aislado en 1993 (Becker-André y cols., 1993) a partir de células endoteliales umbilicales humanas, siendo posteriormente identificado como el primer receptor nuclear para la melatonina. A partir de la secuencia de aminoácidos consenso que incluye a los dos dedos de zinc del DBD de los receptores nucleares conocidos se diseñaron oligonucleótidos con un alto grado de degeneración (Figura 6). Tras la extracción del ARN total de las células endoteliales umbilicales, se realizó la síntesis de la primera cadena de ADNc con el oligonucleótido CC y la reacción de PCR final con la mezcla DY como cebador 5' y CC como cebador 5' interno para aumentar la especificidad del proceso. Tras el subclonaje en DH5 $\alpha$  de la banda amplificada correspondiente a la longitud predicha (123 pb) se realizó una hibridación en la réplica de las placas de nitrocelulosa con oligonucleótidos marcados de secuencias conocidas de receptores nucleares, secuenciando los clones que fueron negativos (5% total). De esta manera se identificaron tres nuevas secuencias; una de ellas mostró una alta homología con el receptor revErbA denominándose "revErbA-R1". La segunda secuencia mostró una alta similitud con los receptores del tipo RAR, denominándose RZR $\alpha$ , y la tercera secuencia se denominó PHR-1 (*Pancreas Hormone Receptor*).

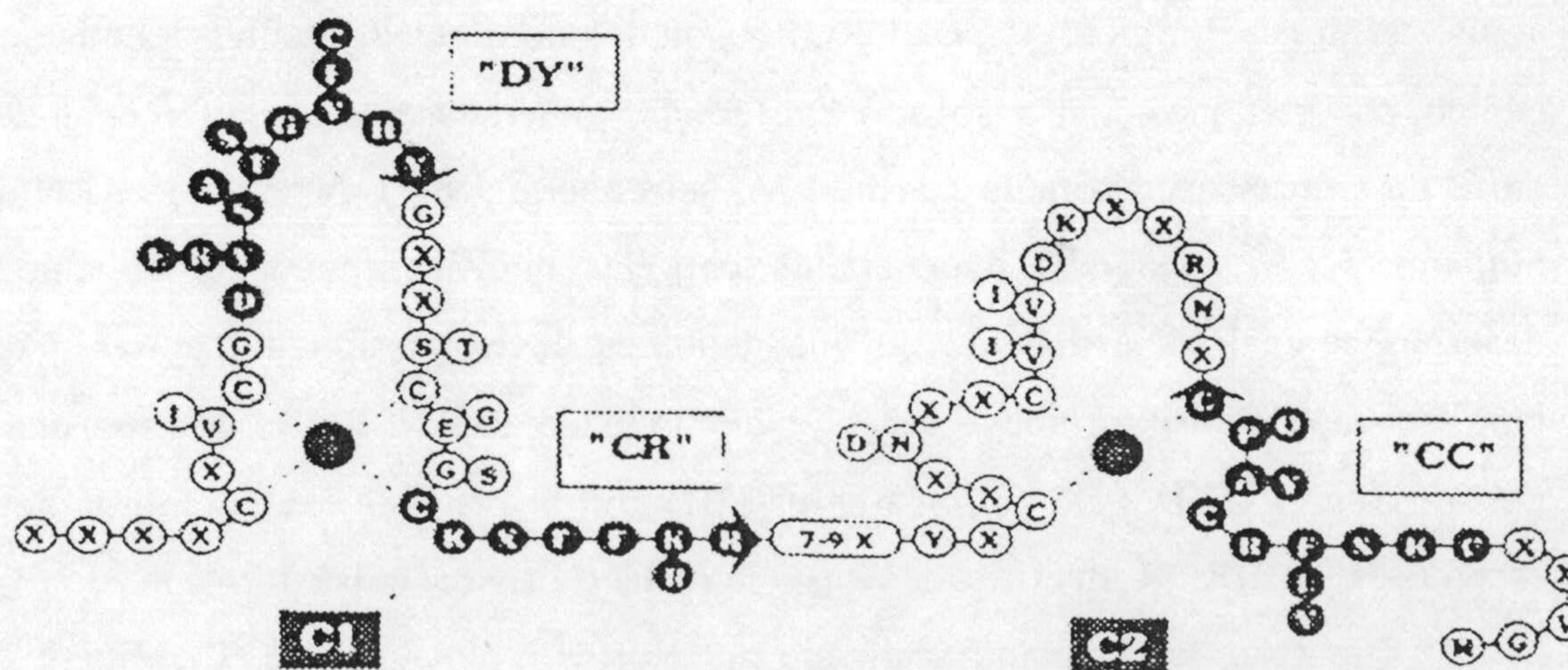


Fig. 6: Diseño experimental de los cebadores que permitieron clonar el primer receptor nuclear para la melatonina

El gen para el RZR $\alpha$  humano muestra una identidad del 76% con su homólogo en *Drosophila melanogaster* FTZ-F1, de un 70% con RAR $\alpha$  y de un 65% en el DBD.

Usando una estrategia similar se aisló el RZR $\beta$  de rata (Carlberg y cols., 1994). Los dos tipos de RZR muestran una identidad del 92% en sus dominios de unión al ADN y un 62% en sus dominios de unión al ligando.

De una manera independiente, y usando como sonda el ADNc de RAR $\alpha$  humano en condiciones poco restrictivas sobre una genoteca de expresión de cerebro de rata, se aisló un clon parcial, que en condiciones restrictivas elevadas y sobre una genoteca de expresión humana de testículo y retina identificó tres clones, los cuales se denominaron ROR $\alpha$ 1, ROR $\alpha$ 2 y ROR $\alpha$ 3 (Giguère y cols., 1994).

ROR $\alpha$ 2 y ROR $\alpha$ 3 son idénticos en los primeros 45 aminoácidos del extremo amino-terminal, mientras que los 66 primeros aminoácidos del extremo amino-terminal de ROR $\alpha$ 1 son diferentes a los de ROR $\alpha$ 2 y ROR $\alpha$ 3. Los restantes 457 residuos son comunes para los tres isoformas del receptor. En esta región común la que es idéntica a la correspondiente en RZR $\alpha$ . RZR $\alpha$  sólo tiene 11 aminoácidos adicionales en el extremo amino-terminal. Por tanto, RZR $\alpha$  y ROR $\alpha$  son dos nombres diferentes del mismo producto génico, con al menos cuatro isoformas diferentes generadas por uso diferencial de exones a partir de un transcrito común (Carlberg y Weisenberg, 1995). A partir de ARN de páncreas humano y con cebadores degenerados para las nuevas secuencias de unión a ADN descritas se realizó un barrido en una genoteca de expresión del músculo esquelético humano, clonándose un nuevo receptor denominado ROR $\gamma$ . ROR $\gamma$  muestra una identidad del 89% en el DBD y de un 53% en el LBD con el resto de los miembros de la familia receptores RZR/ROR identificados hasta la fecha (Hirose y cols., 1994).

El patrón de expresión analizado por Northern blot y RT-PCR competitiva muestra una distribución ubicua para RZR/ROR $\alpha$  (Becker-André y cols., 1993); Forman y cols., 1994), con una elevada expresión en linfocitos de sangre periférica y una expresión diferencial de las distintas isoformas (Steeinhilber y cols., 1995).



RZR $\beta$  muestra un patrón de expresión más restrictivo, principalmente en cerebro, con los mayores niveles en glándula pineal, hipotálamo y tálamo (Becker-André y cols., 1994). ROR $\gamma$  se expresa preferentemente en músculo esquelético, aunque también se han encontrado cantidades apreciables en timo, páncreas, próstata, corazón e hígado (Hirose y cols., 1994).

#### **4.— Propiedades de unión de los receptores RZR/ROR a ADN**

Los receptores RZR/ROR se unen como monómeros a la secuencia RggTCA (R =A o G) (Carlberg y cols., 1994). Ya que una secuencia de este tipo no es suficiente para alcanzar una especificidad elevada la secuencia de nucleótidos que flanquea a la misma 5' ha mostrado ser de gran importancia. Así, la posición -1 debe corresponder siempre a la T, mientras que -2 puede tolerar la presencia de cualquier nucleótido. La posición -4 deber ser A y, en general, la zona precedente al motivo consenso de seis nucleótidos debe ser rica en A/T (Giguère y cols., 1994). Las afinidades de estos receptores para unirse a elementos de respuesta es de 1,6 nM (Carlberg y cols., 1994), lo que está en concordancia con otros receptores nucleares que se unen al ADN como monómeros (Schäder y cols., 1994). Esta afinidad se incrementa tres veces cuando se alinean dos secuencias consenso incluyendo sus secuencias flanqueantes en vecindad (Carlberg y cols., 1994). Los receptores RZR/ROR muestran un efecto cooperativo para establecer homodímeros cuando las secuencias se sitúan de forma palindrómica sin nucleótidos espaciadores o con repeticiones directas espaciadas por 8 nucleótidos.

En este sentido, RZR/ROR es el primer ejemplo de receptor huérfano que puede reconocer a un elemento de respuesta como monómero o como homodímero, lo que representa una homología funcional con los receptores de hormonas tiroideas que en la combinación adecuada pueden unirse como monómeros, homodímeros o heterodímeros (Forman y cols., 1992).

#### **5.-Ligandos para los receptores RZR/ROR. Control transcripcional mediado por la melatonina**

Durante los experimentos de transfección transitoria, la actividad constitutiva de RZR/ROR sobre construcciones de promotores heterólogos fusionados con un elemento de

respuesta a RZR/ROR se vió reducida si el suero era omitido o deplecionado, indicando que algún componente del suero bien directa (como en el caso de un ligando) o indirectamente activaba a RZR/ROR (Becker-André y cols., 1994; Weisenberg y cols., 1995).

En este punto, dos observaciones independientes probaban que la melatonina constituía el ligando natural de los hasta entonces receptores nucleares huérfanos RZR/ROR. La primera de estas evidencias provino del estudio sobre diferentes receptores nucleares de una serie de sustancias con propiedades antiartríticas, llamadas tiazolidinadionas, en la búsqueda de posibles efectos directos sobre los mecanismos de regulación génica. Tanto el compuesto denominado CGP-52608 como otros estructuralmente relacionados fueron capaces de activar a las proteínas RZR/ROR en un rango de 1-5 nM (Missbach y cols., 1996). Dado que algunas de las características farmacológicas de estos compuestos eran similares a los de la melatonina, se realizaron estudios de transactivación con la hormona y derivados metabólicos de la misma, lo que arrojó como resultado un efecto específico para la melatonina y la  $^{125}\text{I}$ -iodomelatonina (Becker-André y cols., 1994).

La segunda evidencia provino de estudios de hibridación *in situ* que localizaban la expresión de los genes RZR/ROR en la glándula pineal, el SNC y en retina (Becker-André y cols., 1994). Este hecho era la contrapartida biológica de estudios de transactivación, ya que estos tejidos son productores de melatonina y/o blancos para la misma, demostrando que la melatonina es de hecho un ligando para RZR/ROR $\alpha$ . No hay estudios hasta la fecha respecto a RZR/ROR $\gamma$  como receptor nuclear de la melatonina. La elevada actividad constitutiva de RZR/ROR parece ser la razón por la que en algunos sistemas de transactivación que usan promotores heterólogos la melatonina no es capaz de modular la actividad de los mismos (Tini y cols., 1995). Ya que la actividad de los receptores nucleares puede ser regulada por fosfoproteínas, es necesario establecer si son importantes para la función de RZR/ROR.

El primer gen descrito regulado por la transactivación de RZR/ROR inducida por melatonina fue el de la 5-lipoxigenasa (Steinhilber y cols., 1995) en linfocitos B humanos. Este gen posee elemento de respuesta CAAAATgggTCA entre las posiciones -1521 y -1510 de la zona promotora, al que se unen tanto RZR/ROR $\alpha$ 1 como RZR/ROR $\alpha$ , mientras que por el contrario ni RZR/ROR $\alpha$ 2 ni RZR/ROR $\alpha$ 3 tiene capacidad de unión al mismo (Steinhilber y cols., 1995). La melatonina reprime la expresión de este gen, lo que es de

gran importancia ya que confirma un papel regulador de la melatonina en los procesos inflamatorios. De hecho, los leucotrienos están relacionados con procesos patológicos como el asma o la artritis (Ford-Hutchinson y cols., 1994).

La búsqueda de secuencias consenso en la zona promotora ha identificado otros genes candidatos a ser regulados por la melatonina (Schäder y cols., 1996). Estos 11 elementos de respuesta para RZR/ROR muestran valores de  $K_d$  dispares. Responden funcionalmente a melatonina en los ensayos de transfección del gen para la sialoproteína del hueso (BSP) de rata, el gen humano p21<sup>WAF1/CIP1</sup> y el gen de ratón PCP-2.

El papel fisiológico de la melatonina en el contexto de la regulación génica mediada por receptores nucleares necesita de estudios posteriores. Por ejemplo, los niveles de melatonina en suero raramente alcanzan el rango nanomolar (excepto durante el pico nocturno), y sin embargo es éste el rango mínimo necesario para provocar la transactivación de los receptores RZR/ROR. En cualquier caso hay evidencias experimentales de una acumulación preferente de melatonina intracelular respecto a la existente en suero (Menéndez-Pélaez y cols., 1993), lo que sugiere algún tipo de transporte a través de la membrana celular y/o citosol.

El elemento de respuesta RZR/ROR del gen de rata de la BSP forma parte de un elemento de respuesta para la vitamina D, y se superpone con una secuencia TATA invertida. Esto significa que, en este elemento de respuesta compuesto RZR/ROR puede interactuar con proteínas de unión a la caja TATA y con factores de transcripción de naturaleza no receptora. La proteína BSP es una proteína extracelular de la matriz celular que se expresa en los tejidos mineralizados (Bianco y cols., 1991) y en las células de cáncer de mama (Bwellehcéne y cols., 1994). Hasta la fecha no hay datos que relacionen la melatonina en la regulación génica de la BSP o en la formación de hueso en general.

Respecto a la proteína p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina y por lo tanto un regulador negativo del ciclo celular (Harper y cols., 1993). Estos resultados son interesantes, ya que se ha asociado un papel inhibidor de la proliferación celular y oncostático a la melatonina (Blask y Hill, 1986).

El gen PCP-2 juega un importante papel en la regulación del desarrollo de las células de Purkinje (Zou y cols., 1994). De hecho los ratones mutantes *straggerer*, caracterizados por una severa ataxia debido a un defecto en el desarrollo de las células de Purkinje. El gen PCP-2 mapea genéticamente en una región que contiene al gen

RZR/ROR $\alpha$  (Hamilton y cols., 1996). Este hecho hace pensar que PCP-2 es un gen que responde fisiológicamente a RZR/ROR.

## 6.- RZR $\beta$ y la glándula pineal

El receptor nuclear RZR $\beta$  posee unos niveles altos de expresión en la glándula pineal (Becker-André y cols., 1994). Ya que muchos de los aspectos de la regulación circadiana por melatonina incluyen eventos transcripcionales de *novo*, el papel de RZR $\beta$  puede ser fisiológicamente de gran relevancia.

Recientemente Baler y cols., (1996) han puesto de manifiesto la existencia de un ritmo circadiano en la expresión de RZR $\beta$  de la glándula pineal de rata. Los niveles de ARNm para RZR $\beta$  se incrementan tres veces durante la noche respecto a los valores normalizados durante el día, y ese ritmo permanece inalterable tras las exposición de los animales a la luz constante durante 4 días consecutivos, lo que sugiere la existencia de un ritmo circadiano real, a través de un oscilador endógeno, y no un efecto debido a alteraciones en la periodicidad de la luz externa artificial. La hipótesis de un control de la expresión de RZR $\beta$  a través del SNC se comprobó tras bloquear la conexión entre el SNC y la glándula pineal (tanto por ganglionectomía cervical superior como por exposición a luz en periodo de oscuridad) lo que abolía los incrementos de expresión de RZR $\beta$  observados previamente.

Ya que la estimulación de la glándula pineal por el SNC involucra la liberación de noradrenalina desde los terminales nerviosos al espacio extracelular pineal y la activación de subsiguiente de los receptores  $\beta$ -adrenérgico, Baler y cols (1996) analizaron los niveles de ARNm para RZR $\beta$  tras inyectar a las ratas con agonistas adrenérgicos. Así, la expresión de RZR $\beta$  se incrementó tras las inyecciones con isoproterenol, no observándose efecto alguno tras el tratamiento con salino o con  $\alpha$  agonistas.

Estos efectos fueron posteriormente confirmados en cultivos de explantes de pineal en los que la norepinefrina provocó un incremento en la expresión del gen RZR $\beta$  tras 9 h de tratamiento.

## B.- Receptores de membrana de melatonina

### 1.- Características de los sitios de unión de melatonina

La agregación de los melanosomas producida por la melatonina en los melanóforos de anfibios, además de utilizarse como bioensayo para aislar la propia molécula de melatonina (McCord y Alla, 1917), sirvió de base para postular la existencia de receptores de melatonina (Heward y Hadley, 1975), establecer las primeras relaciones estructura-función para análogos de la misma y demostrar que la activación de los receptores de melatonina produce una inhibición de la acumulación de AMP<sub>c</sub> mediada por proteínas G sensibles a la toxina pertúsica (White y cols., 1987). El desarrollo de radioligandos de la melatonina como <sup>3</sup>H-melatonina, de baja actividad específica, y en especial la aparición de la melatonina iodada en posición 2 (<sup>125</sup>I-Mel) ha permitido el análisis de los sitios de unión en diversos tejidos. Los receptores de melatonina caracterizados con <sup>125</sup>I-Mel se encuentran en tejido nervioso y en tejidos periféricos. Así los receptores en el SNC del hipotálamo están relacionados con el efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos (Reppert y cols., 1994), los situados en el núcleo paraventricular del tálamo están involucrados en la regulación de las funciones límbicas (Krause y Dubocovich, 1990; Reppert y cols., 1994), los situados en la retina como heterorreceptores presinápticos modulan la liberación de dopamina dependiente de calcio (Dubocovich, 1983) y aquéllos que no son receptores neuronales como los situados en la pars tuberalis de diversas especies con fuerte comportamiento estacional o los situados en arterias cerebrales o caudales se relacionan con funciones reproductivas (Morgan y cols., 1994) y termorreguladores respectivamente (Viswanathan y cols., 1990). La caracterización de sitios de unión ajenos al SNC y la retina se ha llevado a cabo en glándula harderiana de rata (López-González y cols., 1991), pulmón de pollo (Pang y cols., 1993) o intestino humano (Pontoire y cols., 1993), así como membranas o células inmunocompetentes tanto en roedores como en humanos (Guerrero y Reiter, 1992; Calvo y cols., 1995). Ya que no existe un criterio unificado para la clasificación de los receptores de melatonina, usaremos la nomenclatura desarrollada por Dubocovich (1995) en función de los criterios cinéticos y farmacológicos.

Los sitios de unión de <sup>125</sup>I-Mel pertenecen a uno de al menos dos grupos definidos como (receptor de afinidad picomolar) y ML<sub>2</sub> (receptor de afinidad nanomolar). El receptor ML<sub>1</sub> se localiza en retina, área postrema, arteria caudal, arterias del anillo de Willis, pars tuberalis, núcleo talámico paraventricular, colículo

úcleo supraquiasmático, mientras que el receptor  $ML_2$  se localiza en cerebro de hámster y ratón, testículo y riñón de hámster y en la línea celular de melanoma RPMI1846 (revisado por Morgan y cols., 1994).

La unión de  $^{125}I$ -Mel al receptor  $ML_1$  es reversible, saturable y de alta afinidad, con una  $K_d$  siempre inferior a 300 pM para el estado de alta afinidad y entre 0,3-5 nM para el estado de baja afinidad. Las cinéticas de asociación ( $t_{1/2} = 9-60$  min) y disociación son lentas ( $t_{1/2} < 40$  min), incrementándose su afinidad cuando la temperatura aumenta (Dubocovich y Takahashi, 1987; Morgan y cols., 1994; Ebisawa y cols., 1994). Por el contrario, el receptor tipo  $ML_2$  posee una  $K_d$  de entre 0,9-10,0 nM par un único estado de alta afinidad, con cinéticas de asociación ( $t_{1/2} = 1-2$  min) y disociación ( $t_{1/2} = 1-2$  min) rápidas en los tejidos antes indicados (Duncan y cols., 1988; Duncan y cols., 1989; Pickering y Niles; 1992). Dada sus rápidas cinéticas de asociación y disociación, la unión de  $^{125}I$ -Mel se pone de manifiesto en incubaciones realizadas a 4 ° C, lo que hace posible la detección de los tipos  $ML_1$  y  $ML_2$  cuando se expresan en el mismo tejido, como ocurre en cerebro de hámster (Duncan y cols., 1988; Duncan y cols., 1989).

Si bien es cierto que en el caso del receptor  $ML_1$  la mayoría de los datos hacen referencia a un único estado de alta afinidad, en función de las condiciones experimentales (temperatura, pureza y concentración de radioligando y presencia de cationes o GTP) es posible poner de manifiesto dos estados de afinidad. Así, en el caso de membranas de retina o sinaptosomas de cerebro de pollo se detecta un único estado de alta afinidad en estudios de saturación con  $^{125}I$ -Mel (0,005-1 nM) (Dubocovich, 1991), mientras que se ponen de manifiesto dos estados de afinidad ( $K_d = 21$  pM y  $K_d = 298$  pM) cuando se realizan estudios de saturación con  $^{125}I$ -Mel (0,005-1 nM) a 25° C (Ying y Niles, 1991). En cualquier caso, los diferentes estados de afinidad para el receptor  $ML_1$  son sensibles a GTP y análogos no hidrolizables, sin alterarse su capacidad de unión a los mismos, mientras que en el caso de  $ML_2$  no hay sensibilidad a GTP (Dubocovich, 1995).

La unión de  $^{125}I$ -Mel a los receptores  $ML_1$  y  $ML_2$  es sensible a diferentes iones. La unión de  $^{125}I$ -Mel disminuye en presencia de  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$  tanto en retina y cerebro de pollo como en SNC y área postrema de rata (Dubocovich y Takahashi, 1987; Dubocovich y cols., 1989; Latinen y Saavedra, 1990). Los estudios de especificidad para los receptores  $ML_1$  y  $ML_2$  son diferentes. Así, en el caso de  $ML_1$  la potencia en el desplazamiento de la unión de  $^{125}I$ -Mel para diferentes análogos fue  $^{125}I$ -Mel  $\gg$  melatonina  $>$  6-hidroxi-melatonina  $\gg$  N-acetil 5-HT  $\gg$  5-HT  $>$  prazosín. El receptor  $ML_1$  de retina de

pollo tiene la misma farmacología que el heterorreceptor presináptico de retina involucrado en la inhibición dependiente de calcio de dopamina (Dubocovich, 1988). Para el ML<sub>2</sub> los estudios de especificidad muestran una relación diferente <sup>125</sup>I-Mel > prazosín > N-acetil 5-HT > melatonina > 6-hidroximelatonina >> 5-HT (Pickering y Niles, 1992). Los diferentes perfiles farmacológicos de ambos receptores sugieren la existencia real de dos tipos diferentes receptores para melatonina.

Los conocimientos sobre las relaciones actividad-estructural para análogos de melatonina con relación a la unión a receptores de membrana no están claramente establecidos, es especial cuando diferentes mecanismos de acción están en juego, si bien es cierto que la sustitución del grupo metoxi en la posición C5 del anillo indólico y la cadena N-acil juegan un papel muy importante en la afinidad de la unión al receptor.

El fenómeno según el cual tras la exposición de células a agonistas específicos de diversos tipos de receptores se produce una respuesta reducida a estimulaciones posteriores del agonista está bien documentado. Esta atenuación a ulteriores respuestas para una hormona o una droga puede ser clasificada como desensibilización homóloga (específica del agonista) o heteróloga (no específica del agonista), involucrando diversos mecanismos de fosforilación del receptor y secuestro o disminución del número de receptores presentes en la célula (regulación a la baja).

El marcado ritmo circadiano de los niveles circulantes de melatonina es un excelente modelo fisiológico para estudios de regulación del receptor de melatonina. En estudios que usan autorradiografía cuantitativa se observa una variación circadiana en la densidad de receptores de melatonina del SNC de la rata (Laitinen y cols., 1989), siendo ésta mayor en la transición oscuridad-luz y menor al final de la fase de luz. Estos resultados son inusuales, ya que muestran que la unión de melatonina aumenta durante el pico de producción de la misma, sugiriendo que la hormona regula al alza la expresión de su propio receptor, en contraste con la regulación a la baja típica de los receptores inducida por agonista (Lefkowitz y cols., 1990). En un segundo estudio realizado por los mismos autores, no se observó cambio alguno en los patrones autorradiográficos en el SNC de rata tras la depleción de melatonina circulante (por exposición crónica a la luz, pinealectomía o ganglionectomía) o inyecciones crónicas de melatonina, sugiriendo que no regula su nivel de receptores, al menos a nivel de interacciones ligando-receptor (Laitinen y cols., 1992).

Sin embargo, otros estudios con membranas de hipotálamo que incluían al SNC sí muestran un ritmo circadiano en los sitios de unión de melatonina (Tenn y Niles, 1993). Además, el ritmo circadiano en los sitios de unión de melatonina mostraba una correlación inversa en la densidad de los receptores y la concentración de melatonina. Así, los mayores niveles de unión a melatonina se encontraron al final de la fase luminosa, detectándose los menores niveles durante la oscuridad, donde presumiblemente la mayor concentración de melatonina produce una regulación a la baja del receptor. Asimismo, en el caso de la eminencia al final del día comparados con aquellos sacrificados a media mañana (Vanacek y cols., 1990). Un patrón similar ha sido descrito en tejidos periféricos como timo o bazo de rata (Martín-Cacao y cols., 1993). Por otra parte, una única inyección de melatonina revierte el efecto de la luz constante o de la pinealectomía sobre los sitios de unión de melatonina en SNC y pars tuberalis de la rata (Gauer y cols., 1993). En conjunto, la mayoría de los trabajos demuestran que la melatonina está relacionada con la regulación de sus propios sitios de unión. Los estudios circadianos indican que sólo el estado de alta afinidad del receptor de melatonina en el SNC de rata puede ser detectado durante el periodo de luz, mientras que tanto el estado de alta afinidad como el de baja pueden ponerse de manifiesto durante el periodo de oscuridad (Tenn y Niles, 1993).

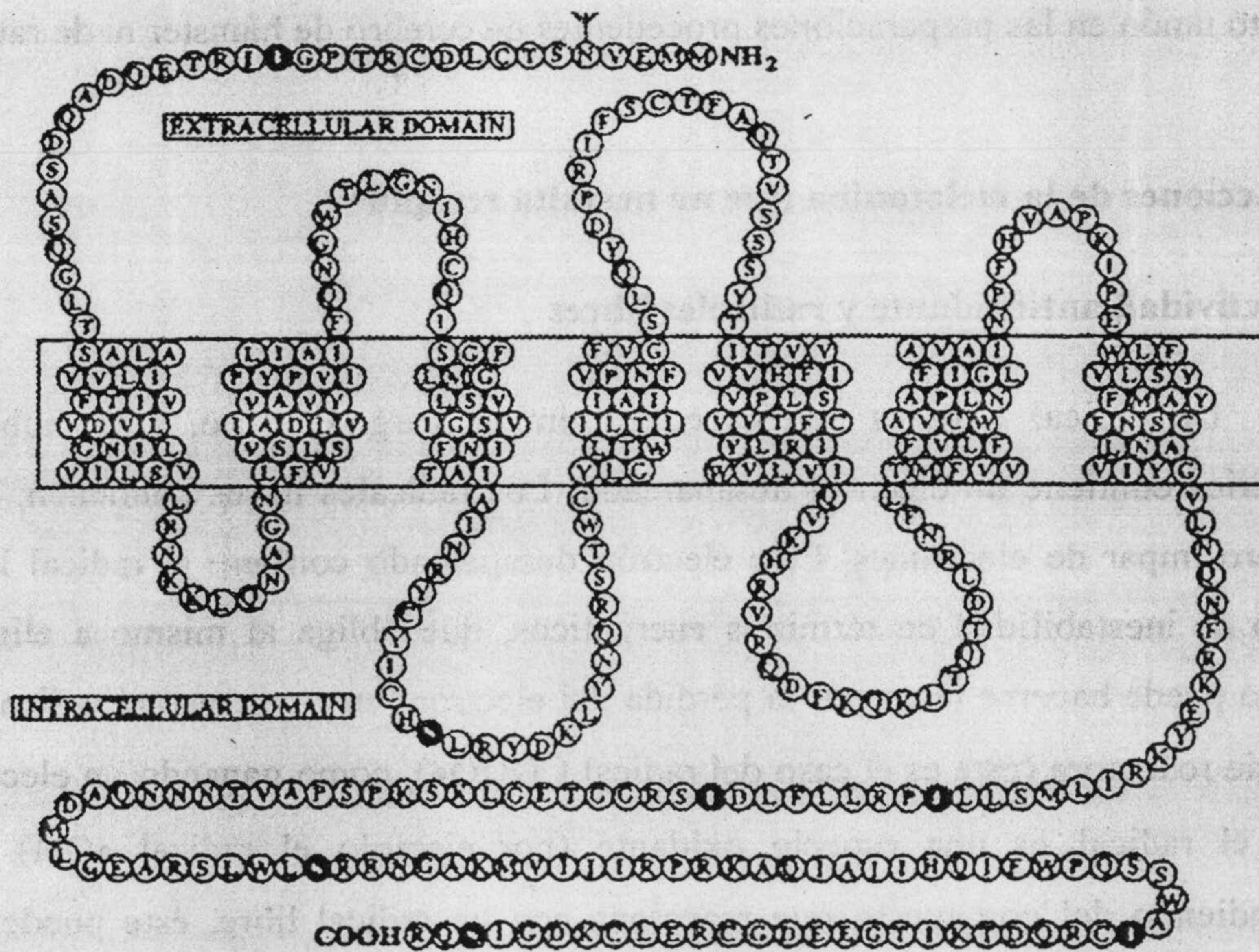
## 2.- Estructura de los receptores de membrana de melatonina

La identificación del gen que codifica para el receptor de melatonina en melanóforos se llevó a cabo a partir de una genoteca de expresión realizada con ARNm de una línea inmortalizada de melanóforos de *Xenopus laevis* (Ebisawa y cols., 1994). Para ello, se realizaron experimentos de unión con  $^{125}\text{I}$ -Mel sobre réplicas de células de COS-7 previamente transfectadas con ADNc de melanóforos. La secuenciación en ambos sentidos del fragmento de 2,2 kb codifica para una proteína de 420 aminoácidos con un peso molecular de 47,4 kDa, estructurados en siete dominios transmembrana (Figura 7). La clonación del primer receptor de melatonina en *Xenopus* permitió identificar los genes de los receptores en mamíferos (Reppert y cols., 1994) y en humanos. El clon identificado posee una identidad del 85% de la secuencia aminoacídica respecto a la secuencia en oveja, y de un 65% respecto a la de *Xenopus* (Reppert y cols., 1994).



La expresión funcional de los receptores clonados en células COS-7 demuestra que son receptores de alta afinidad con valores de  $K_d$  de 63 pM (*Xenopus*), 36 pM (oveja) y 26 pM (humano), y el pretratamiento con toxina pertúsica demuestra una pérdida del efecto inhibitorio de la melatonina sobre la producción de AMPc estimulada por foskolín (Reppert y cols., 1994).

El receptor de membrana de melatonina no parece poseer una identidad común con otros grupos de receptores acoplados a proteínas G. La mayor identidad, aproximadamente un 25%, la comparte con los receptores opoides mu y con los receptores de somatostatina de tipo 2. Por lo tanto el receptor de melatonina acoplado a proteínas G formará parte de un nuevo grupo de receptores de membrana (Ebisawa y cols., 1994).



**Figura 7:** Estructura del receptor de membrana de melatonina de *Xenopus Laevis* (siete dominios transmembrana).

#### D.- Receptores citosólicos de la melatonina primeras

Las primeras evidencias experimentales de unión de melatonina a proteínas receptoras de localización citosólica se obtuvieron en estudios que identificaban unión específica de  $^3\text{H-Mel}$  en fracciones de sobrenadante de preparaciones de tejido de ovario procedente de hámster, rata y de humano (Cohen y cols., 1978). El análisis matemático de los datos obtenidos en el sobrenadante ( $105.000\times g$ ) de preparaciones de ovario pone de manifiesto dos sitios de unión, uno de alta afinidad ( $K_d = 6,3 \text{ nM}$ ) y baja capacidad ( $B_c = 52 \text{ fmol/mg proteína}$ ) y otro de baja afinidad ( $K_d = 55 \text{ }\mu\text{M}$ ) y alta capacidad de unión ( $B_c = 418,7 \text{ fmol/mg proteína}$ ). La máxima unión se alcanza a las 3 h, permaneciendo constante durante 9 h adicionales y siendo sensible a temperaturas elevadas. En dichos estudios no se detectó unión en las preparaciones procedentes de cerebro de hámster ni de rata.

#### E.- Acciones de la melatonina que no necesita receptor

##### 1.- Actividad antioxidante y radicales libres

Un radical libre es una especie química, cargada o no, cuya nube electrónica periférica contiene un electrón desapareado. Los radicales libres contienen, por tanto, un número impar de electrones. Este electrón desapareado confiere al radical libre un cierto grado de inestabilidad en términos energéticos, que obliga al mismo a eliminarlo. Esto último puede hacerse tanto por la pérdida del electrón, en cuyo caso el radical libre es una especie reductora (éste es el caso del radical  $\text{COOO}\bullet$ ), como ganando un electrón, en cuyo caso el radical es una especie oxidante (por ejemplo el radical  $\bullet\text{OH}$ ). También, y dependiendo del compuesto que reacciona con un radical libre, éste puede comportarse como un agente reductor u oxidante. Por otra parte un radical a menudo puede auto-oxidarse, en un proceso denominado dismutación. En esta reacción, uno de los dos radicales  $\text{O}_2\bullet$  es oxidado mientras que el otro es reducido. En la atmósfera el oxígeno se encuentra en forma de dirradical libre, llamado oxígeno triplete, que es una especie estable. Una vez dentro del organismo se transforma en agua mediante un proceso de reducción en el que intervienen cuatro electrones produciendo intermediarios reactivos los radicales superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno.

El término "especies reactivas de oxígeno" (ROS) se emplea para incluir todos los radicales del oxígeno y a otros derivados que, aunque no contienen electrones

desapareados, están implicados en la generación de radicales libres como son el agua oxigenada, el oxígeno singlete o el ácido hipoclorhídrico. De igual modo se habla de "especies reactivas de nitrógeno" (RNS), como son el óxido nítrico y peroxinitritos.

En general las principales especies de radicales libres de oxígeno son el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), el radical aloxilo ( $RO\bullet$ ) y el peroxilo ( $ROO\bullet$ ).

#### a.- Sistemas de protección frente a los radicales libres

Actualmente los sistemas de defensa antioxidantes celulares pueden dividirse en primarios y secundarios. El sistema de defensa primario consiste en una variedad de enzimas antioxidantes como superóxidos dismutasas, catalasas y glutatión peroxidasas y reductasas entre otras. El sistema de defensa secundario incluye enzimas proteolíticos y lipolíticos, así como sistemas de reparación de ADN. Sin embargo, y con un interés creciente en los últimos años se está estudiando la capacidad antioxidante de pequeñas moléculas como el  $\alpha$ -tocoferol, el ácido ascórbico, los carotenoides, el coenzima Q, el ácido úrico, la vitamina A, la melatonina y diversos aminoindoles. También son de interés fisiológico y/o farmacológico los flavonoides, polifenoles y ácidos  $\alpha$ -lipoicos presentes en ciertos alimentos. Por otra parte, se están desarrollando antioxidantes sintéticos como agentes terapéuticos frente a situaciones de estrés oxidativo. Entre estos compuestos destacan los análogos del  $\alpha$ -tocoferol, las tiazolidinas y algunos antioxidantes fenólicos.

Debido al altísimo número de compuestos naturales y sintéticos, es difícil establecer un mecanismo general de acción a nivel molecular que justifique sus actividades antioxidantes. Sin embargo, podemos distinguir al menos tres tipos diferentes de mecanismos antioxidantes:

- 1.- El primero es la formación de una especie reactiva radical derivada del antioxidante al reaccionar éste con el radical. El concepto básico de este mecanismo se basa en que el antioxidante, a través de una transición redox que implica la donación de un electrón a la especie radical libre se transforma. Durante el curso de la transferencia electrónica, el carácter radical se transfiere al antioxidante, formándose el radical derivado del antioxidante.

2.- El segundo mecanismo implica la formación de una especie inerte o estable entre el radical y el antioxidante., y el tercer mecanismo incluye a pequeñas moléculas que imitan las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa o la glutatión peroxidasa.

#### **b.-- Melatonina como antioxidante y depurador de radicales libres**

La estructura indólica de la melatonina apoya su capacidad antioxidante, ya que diversos metabolitos del triptófano han demostrado poseer propiedades antioxidantes (Christen y cols., 1990). En particular, estudios *in vivo* realizados con la 5-hidroxitriptamina (serotonina), atribuían a su capacidad antioxidante uno de sus posibles mecanismos de acción (Leterrier y Laborit, 1964). Posteriormente, se demostró que uno de los metabolitos de la melatonina, la N-acetil-5-metoxi-kinurenamina, y un análogo estructural de la misma, la indometacina, inhibían la producción de radicales libres generados durante la síntesis de prostaglandinas (Leach y Trhornburn, 1980; Kelly y cols., 1984). Es en 1993 cuando aparecen los dos primeros trabajos relacionados con la capacidad antioxidante de la melatonina. Así, Tan y cols. (1993) demostraron, en un sistema *in vitro* bien caracterizado de generación de radicales hidroxilo por fotoexcitación, que la melatonina es aproximadamente 5 veces más potente que el glutatión y 14 veces más potente que el manitol como depurador de radicales hidroxilo (Tan y cols., 1993). En el mismo año, con un estudio *in vivo*, Pierrefiche y cols. demostraron que la melatonina posee efectos protectores frente a la diabetes inducida por aloxano en ratones.

El mecanismo por el cual la melatonina actúa como depurador de radicales hidroxilo no está aún claramente establecido. Se postula que el efecto detoxificador está mediado por la donación de un electrón, dando como resultado el radical catión indólico (Hardeland y cols., 1993; Poeggeler y cols., 1994). Este radical indólico puede a su vez actuar como depurador del radical  $O_2^{\bullet-}$ , un precursor del radical hidroxilo, formando el metabolito no enzimático de la melatonina N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikirunamina, que es eliminado por la orina. Gracias a la capacidad de depurador de los radicales  $O_2^{\bullet-}$ , el radical catión indólico reduce aún más la producción de radicales hidroxilo. Queda por dilucidar si el radical catión indólico puede ser reciclado de nuevo a melatonina.

La capacidad antioxidante de la melatonina se extiende también a radicales peroxilo (ROO•), siendo dos veces más potente que la vitamina E en la inhibición de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Pieri y cols., 1994).

La melatonina protege del daño a ADN generado en ratas por el carcinógeno safrol, un donador de radicales libres, así como del daño generado por la exposición a radiaciones ionizantes en linfocitos humanos (Tan y cols., 1993; Vijayalaxmi y cols., 1995). Los estudios de protección de ADN por parte de melatonina son coherentes con la localización nuclear de la misma, como ya se había demostrado anteriormente (Mennenga y cols., 1991; Menéndez-Peláez y cols., 1993).

La melatonina también ha demostrado ser un potente protector *in vivo* de la peroxidación lipídica. Estudios realizados en hígado y pulmón de ratas sometidas a un intenso estrés oxidativo inducido por paraquat (Melchiorri y cols., 1995) han confirmado los primeros estudios *in vitro* realizados por Pieri y cols. (1994). Por otra parte cuando se administran a los animales endotoxinas, como por ejemplo lipopolisacáridos bacterianos (LPS), se generan procesos oxidativos que son atenuados con un tratamiento de melatonina (Sewerynek y cols., 1995).

También en el caso de toxicidad oxidativa generada por sustancias naturales, como el glutamato o kainato, en cultivos de neuronas cerebrales se ha demostrado un papel protector por parte de la melatonina (Giusti y cols., 1995). El papel citoprotector de la melatonina no sólo se relaciona con su capacidad como antioxidante *per se*. La melatonina estimula la actividad de un importante antioxidante como es la glutatión peroxidasa (Barlow-Walden y cols., 1995); dicho aumento de la actividad parece estar relacionado con un discreto incremento en los niveles de ARNm de la misma. Otros efectos protectores de la melatonina relacionados con cambios en los niveles de ARNm han sido demostrados recientemente, observándose incrementos en la expresión de la manganeso superóxido dismutasa y de la cobre-zinc superóxido dismutasa como disminuciones en la expresión de la aminolevulinato sintasa (Antolín y cols., 1986; Kotler y cols., 1998). La melatonina afecta igualmente a dos importantes enzimas peroxidantes como son la óxido nítrico sintasa (Pozo y cols., 1994; León y cols., 1997a, 1997b) y la 5-lipoxigenasa (Steinhilber y cols., 1995), demostrando efectos protectores en modelos de isquemia-reperfusión (Guerrero y cols., 1997).

## 2.- Melatonina y calmodulina

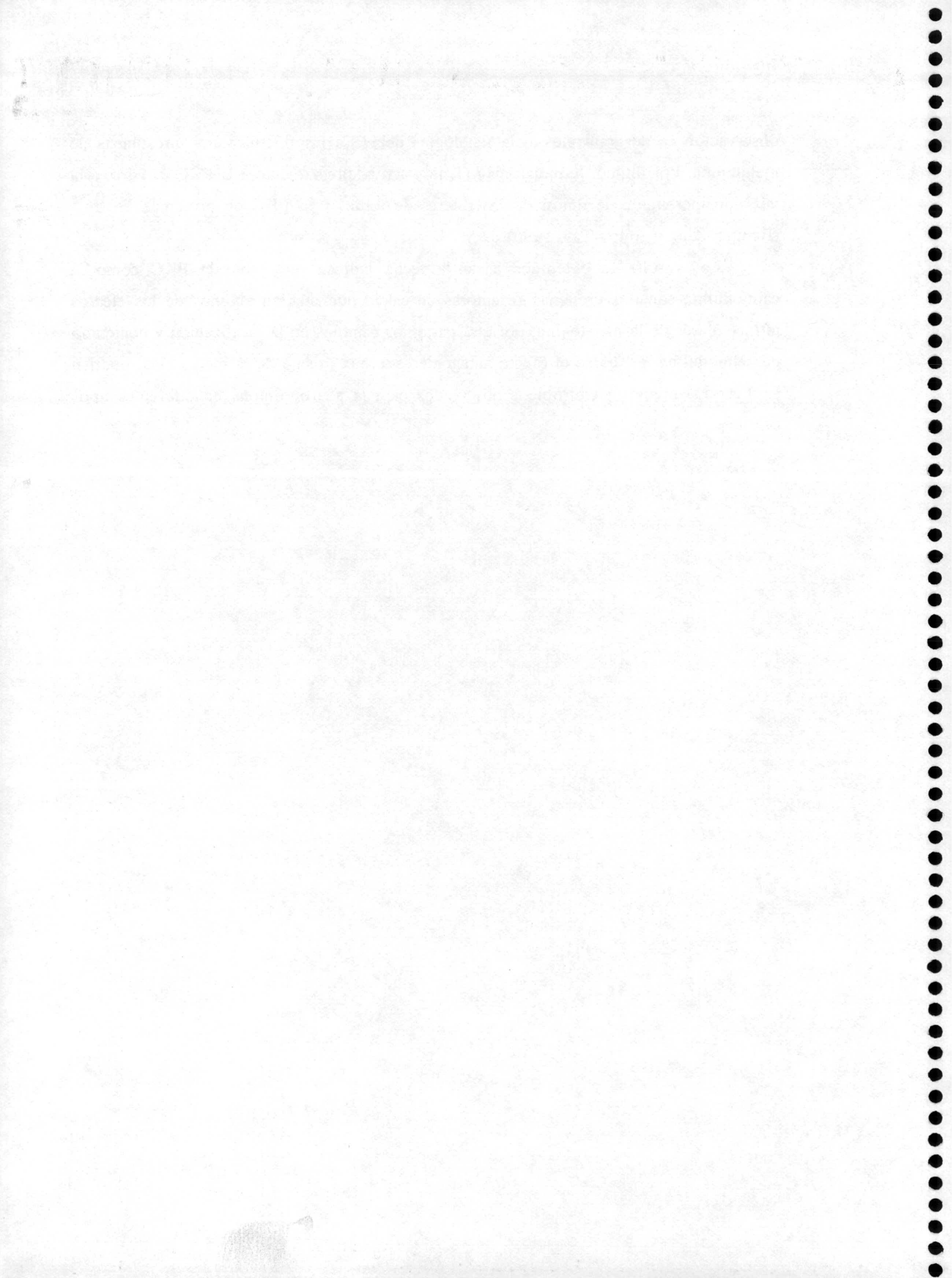
Los primeros estudios que sugirieron una interacción fisiológicamente relevante de la melatonina directamente sobre estructuras citosólicas, tales como los microtúbulos

fueron realizados por Cardinali y Freire (1975) (revisado por Cardinali, 1981). Posteriormente, Benítez-King y cols. (1990) describieron el efecto de la melatonina sobre la reorganización de las proteínas del citoesqueleto en dos líneas celulares (NIH-3T3 y MDCK), afectando al proceso de elongación de los microtúbulos y al crecimiento de las neuritas. Ya que estos efectos están modulados por calmodulina, los mismos autores (Benítez-King y cols., 1993) han caracterizado la unión de  $^3\text{H-Mel}$  a calmodulina. La unión de melatonina a calmodulina tiene características de un solo sitio de unión con una  $K_d = 188 \text{ pM}$  y una  $B_c = 35 \text{ pM}/\mu\text{g}$  de calmodulina. En conjunto, la unión de melatonina a calmodulina explicaría otros efectos observados como son la inhibición de las actividades fosfodiesterasa de  $\text{AMP}_c$  y  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa dependiente de calmodulina (Benítez-King y cols., 1991), de la NOS de cerebelo de rata (Bettahi y cols., 1996; Pozo y cols., 1997) o de la proteína kinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$  (Benítez-King y cols., 1996).

La melatonina, en la fracción citosólica, actuaría preferentemente como un antagonista de calmodulina en lugar de establecer uniones directas con otras proteínas, modulando así positivamente el ensamblaje de los microtúbulos, ya que éste es un proceso inhibido por la asociación de proteínas MAP (proteínas asociadas a microtúbulos) a complejos  $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$  (Huerto-Delgadillo y cols., 1994). La reversión por melatonina del efecto inhibitorio de la calmodulina se observa a concentraciones en el rango nanomolar, mientras que a concentraciones elevadas, del orden de micromolar, la melatonina tiene un efecto inhibitorio sobre la polimerización de los microtúbulos a causa del establecimiento de uniones inespecíficas a las tubulinas (Huerto-Delgadillo y cols., 1994). Además de los efectos antagonistas *in vitro* e *in vivo* sobre la calmodulina, que podrían considerarse efectos a corto plazo, la melatonina puede producir respuestas a largo plazo sobre la distribución y compartimentalización de la calmodulina cuyo mecanismo de acción a nivel molecular no está establecido (Benítez-King y cols., 1991; Benítez-King y Antón-Tay, 1996). Recientemente, Antón-Tay y cols. (1997, en prensa) han descrito, a través de técnicas de inmunofluorescencia en células MDCK, una translocación de la calmodulina desde la periferia hacia el citosol y núcleo provocada por el tratamiento con melatonina (1nM) a largo plazo (de 6h a 4 días) (Benítez-King y Antón-Tay, 1997). Los autores sugieren que un aumento de la actividad PKC por melatonina (Benítez-King y Antón-Tay, 1996) podría ser la causante de la redistribución de la calmodulina celular, ya que la fosforilación de las proteínas asociadas a calmodulina produce la disociación del complejo. Los efectos de la melatonina son reversibles pocas horas después de su retirada. Esta

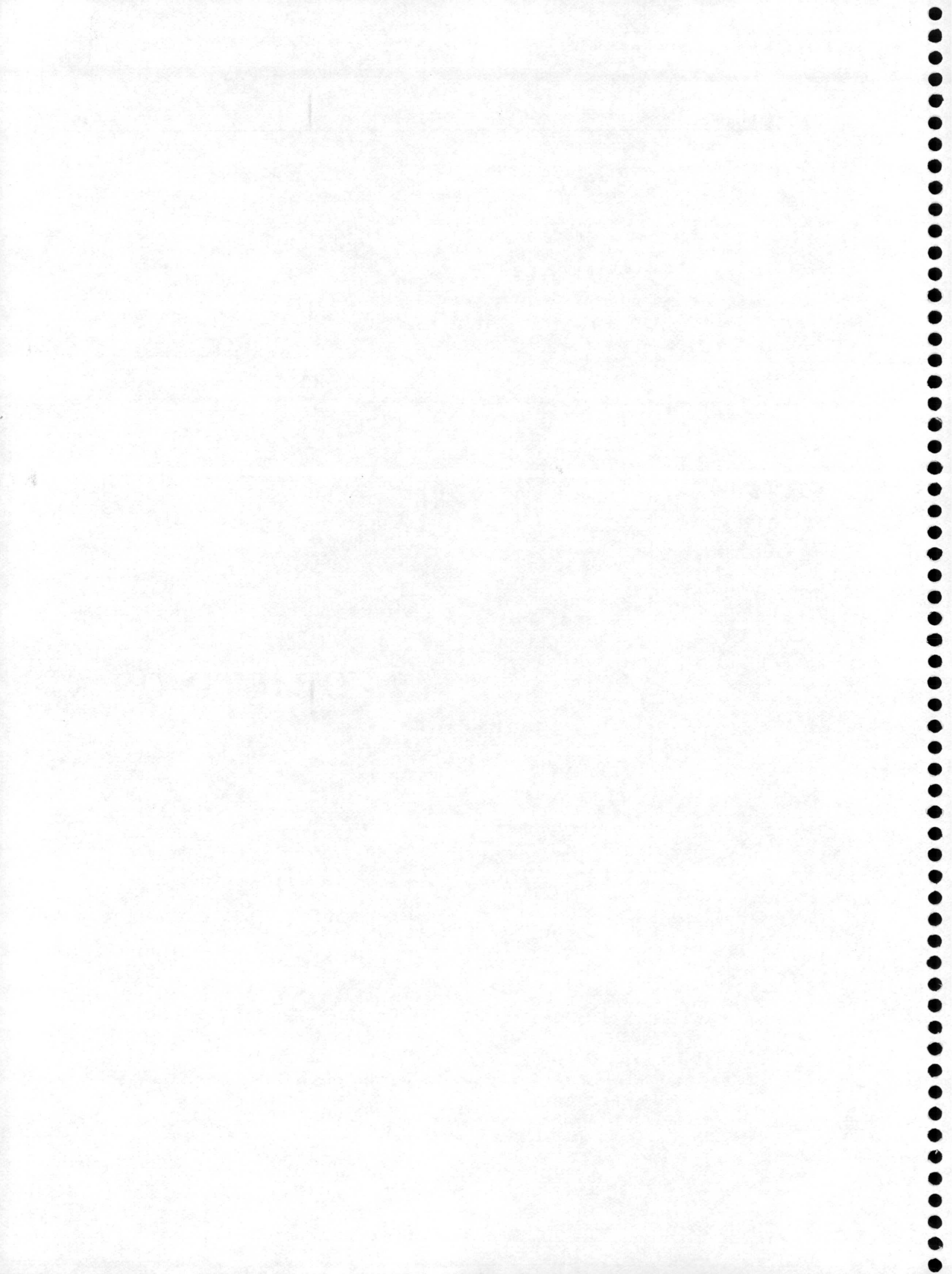
observación es de gran relevancia fisiológica debido a las fluctuaciones circadianas de melatonina. Por último, la melatonina (1 nM) activa directamente a la PKC *in vitro*, a la vez que incrementa la unión de los ésteres de forbol a la PKC en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  (Benítez-King y Antón-Tay, 1996).

Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que tanto la PKC como la calmodulina son dos proteínas receptoras de calcio que median algunos de los efectos intracelulares de la melatonina; por otra parte, los cambios en la localización y contenido de calmodulina, así como el efecto antagónico sobre la misma de la melatonina, podrían explicar los efectos pleiotrópicos observados para la neurohormona en diferentes tipos celulares.





## 2.- OBJETIVOS

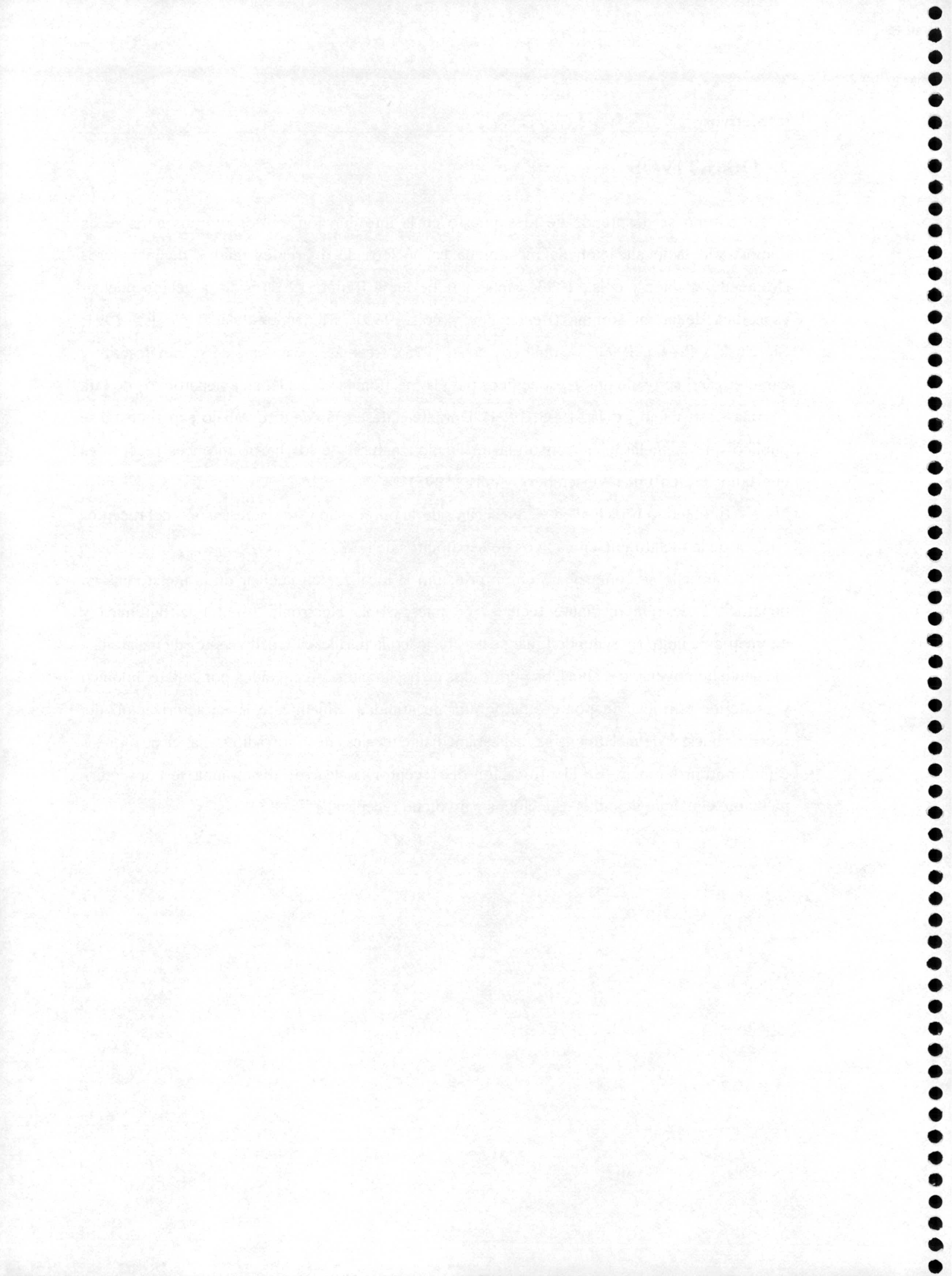


## 2.- OBJETIVOS

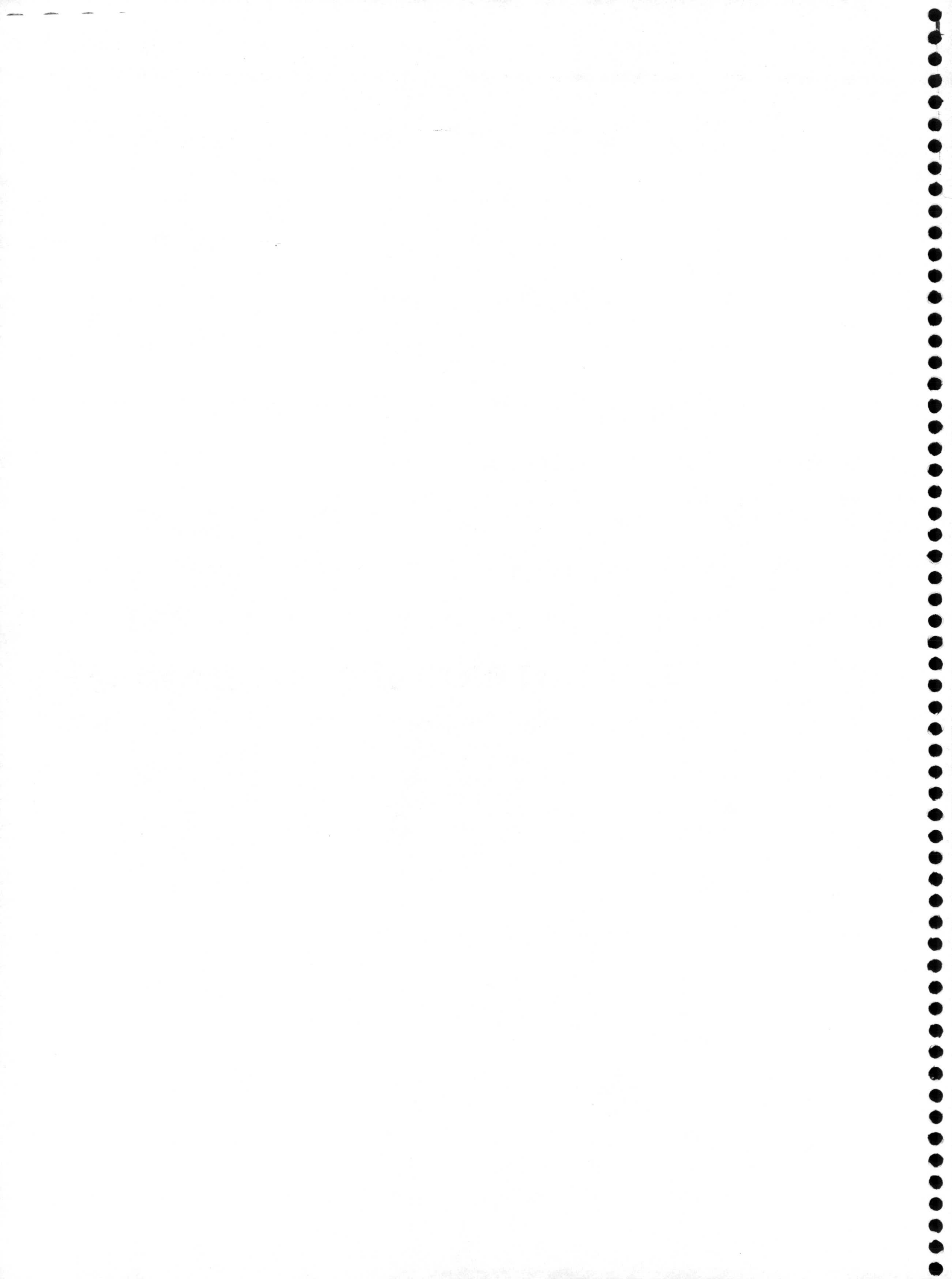
Como se desprende de lo expuesto en la introducción, en los últimos años se ha demostrado la localización de melatonina en núcleos de diferentes tejidos de mamíferos (Menéndez-Peláez y cols., 1993; Menéndez-Peláez y Reiter, 1993) y de la acción nuclear específica de la melatonina (Persengiev y cols., 1991; Menéndez-Peláez y cols., 1991; Slominski y Pruski, 1993; Steinhilber y cols., 1995). Además, recientemente se han descrito y caracterizado sitios de unión específicos para la melatonina en núcleos de hepatocitos de rata (Acuña-Castroviejo y cols., 1993, 1994). Durante el desarrollo de este trabajo experimental se publicó que la melatonina constituía un ligando natural de los hasta entonces receptores huérfanos RZR/ROR (Weisemberg y cols., 1995)

El objetivo principal en esta tesis ha sido la purificación y caracterización del receptor nuclear de la melatonina en núcleos de hepatocitos de rata.

Para ello se comprobará en un principio la localización nuclear de la melatonina en hepatocitos de rata mediante técnicas de microscopía electrónica, inmunocitoquímica y citometría de flujo. En segundo lugar se llevará a cabo la purificación del receptor de melatonina mediante homogenado de núcleos purificados de hepatocitos, precipitados por sulfato amónico y posterior purificación por cromatografía de afinidad. Finalmente la caracterización del receptor nuclear de melatonina se realizará mediante técnicas de autorradiografía, electroforesis e inmunotransferencia. La identificación del receptor nuclear de melatonina se conseguirá mediante el uso de ligandos específicos para dicho receptor



### **3. - MATERIALES Y MÉTODOS**



## I.- Animales de experimentación

En todos los experimentos realizados en este trabajo se han utilizado como animales de experimentación ratas macho Wistar de 200-250 gr de peso, que se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, temperatura ambiente  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y con comida y agua *ad libitum*. Las ratas recién operadas se colocan individualmente en jaulas de plástico transparente durante al menos 7 días siguientes a la cirugía, con el fin de eliminar el estrés quirúrgico.

## II.- Manipulaciones experimentales

### A.- Pinealectomía

Se utilizó la técnica descrita por Hoffman y Reiter (1965) con algunas modificaciones: se anestesia el animal con Equithesin a una dosis de 0.2 ml/100 gr de peso corporal por vía peritoneal. Una vez anestesiado, se le corta el pelo de la zona que recubre la calota y se pincela con povidona iodada. Se realiza una incisión longitudinal en la zona que deja al descubierto fascias y periostio que se eliminan mediante un cuidadoso raspado. Cuando el hueso queda totalmente limpio y al descubierto, se practica una craneotomía circular en la calota cuyo centro es el punto de unión de las suturas laterales con la longitudinal. Abierto el orificio y levantada la tapa de hueso, se observan los senos venosos longitudinal y laterales así como la duramadre. La pineal queda situada bajo la intersección de los tres senos venosos; para su extracción se abre un pequeño ojal en la duramadre por el que se introducen unas pinzas curvas para extraer la glándula. Las ligeras hemorragias que se producen durante todo el proceso se cohibían con Espongostan. Finalizada la operación se colocan unos pequeños trozos de este material sobre el orificio abierto en el cráneo y se procede a suturar la piel y administrar a la rata 0.2 ml de gentamicina por vía intramuscular.

La principal modificación de esta técnica con respecto a Hoffman y Reiter (1965) consiste en que para extraer la pineal seccionan y ligan uno de los senos venosos, para posteriormente levantarlo y extraer la pineal por la zona descubierta, mientras que nosotros mantenemos la integridad de estos vasos.

Como controles se usaron animales con operación simulada. En estos animales se

realiza todo el procedimiento quirúrgico descrito, incluyendo la introducción de las pinzas por el ojal de la duramadre, pero sin llegar a cerrarlas para extirpar la glándula.

### III.-Aislamiento de núcleos de hepatocitos de rata por gradiente de sacarosa.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical (sin anestesia), extrayéndose inmediatamente los hígados. Una vez lavado el tejido en solución salina (ClNa, 0.9%) se congelaron En nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>). Los núcleos se aislaron según la técnica de Blum y cols. (1987), ligeramente modificada (Acuña-Castroviejo y cols., 1994). En síntesis, el tejido una vez descongelado se pesa y se homogeniza en buffer A (sacarosa 0,3M en Tris-ClH 10 mM, pH 7,4) en una proporción de 4 ml/gr de tejido; con un homogenizador de vidrio borosilicato (capacidad máxima 35 ml) y émbolo de teflón (24,5 mm de diámetro) con varilla de acero inoxidable (6 mm de diámetro) adaptable a un motor. Posteriormente el homogenizado se añadió muy lentamente sobre el mismo volumen de buffer B (sacarosa 0,4 M en Tris-ClH 10 mM, pH 7,4) contenido en un tubo de centrifuga, para fabricar de esta manera el gradiente de sacarosa. Inmediatamente después se centrifugó a 2.500 g durante 10 min a 4° C (Varifuge RF.Haraeus Sepatech). El precipitado se lavó varias veces en tampón C (Tris-ClH 50 mM pH 7,4), se resuspendió en 1 ml de este tampón y se congeló rápidamente a -80°C. A esta muestra nos referiremos siempre como **núcleos purificados**. Todos los pasos anteriores se realizaron en el mismo día entre 0 y 4° C, en baño de hielo.

### IV.- Estudio por microscopía electrónica de transmisión

Una alícuota de los **núcleos purificados** se fijó en una solución de glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón cacodilato 0.1M (pH 7,4) durante 4 h. A continuación se retiró la solución de glutaraldehído por decantación, se lavó el precipitado tres veces durante 20 min con el mismo tampón anterior y se fijó con tetróxido de osmio al 2 % (p/v) durante 1 h. Todos los pasos anteriores se realizaron entre 0 y 4° C.

Una vez finalizada la fijación y previo lavado con el último tampón, se realizó una tinción en bloque con acetato de uranilo al 2% (p/v) en agua destilada durante 1 h a 4° C y en



oscuridad. La deshidratación de dicho bloque se realizó en gradiente de etanol (50, 70, 90 y 100%), durante 15 min en cada paso y a temperatura ambiente.

Como agente intermediario se utilizó óxido de propileno, y la infiltración se realizó en resina Epon, guardando una relación óxido de propileno/resina de 1:1, durante 2 h en agitación y a temperatura ambiente. Con posterioridad, se dejó incluyendo en resina durante 24 h a 4° C. Una vez finalizado este tiempo la resina se polimerizó colocando el bloque a 60° C durante el mismo tiempo anterior.

De los bloques de inclusión se obtuvieron cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$  con un Ultramicrotomo Leica Ultracut S; tiñéndose con azul de toluidina para observarlos por microscopía óptica. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos de 50 nm de espesor, que se montaron sobre rejillas de cobre de malla 300 y se contrastaron con acetato de uranilo al 2% en agua destilada durante 10 min y con citrato de plomo durante 5 min (Reynolds, 1963).

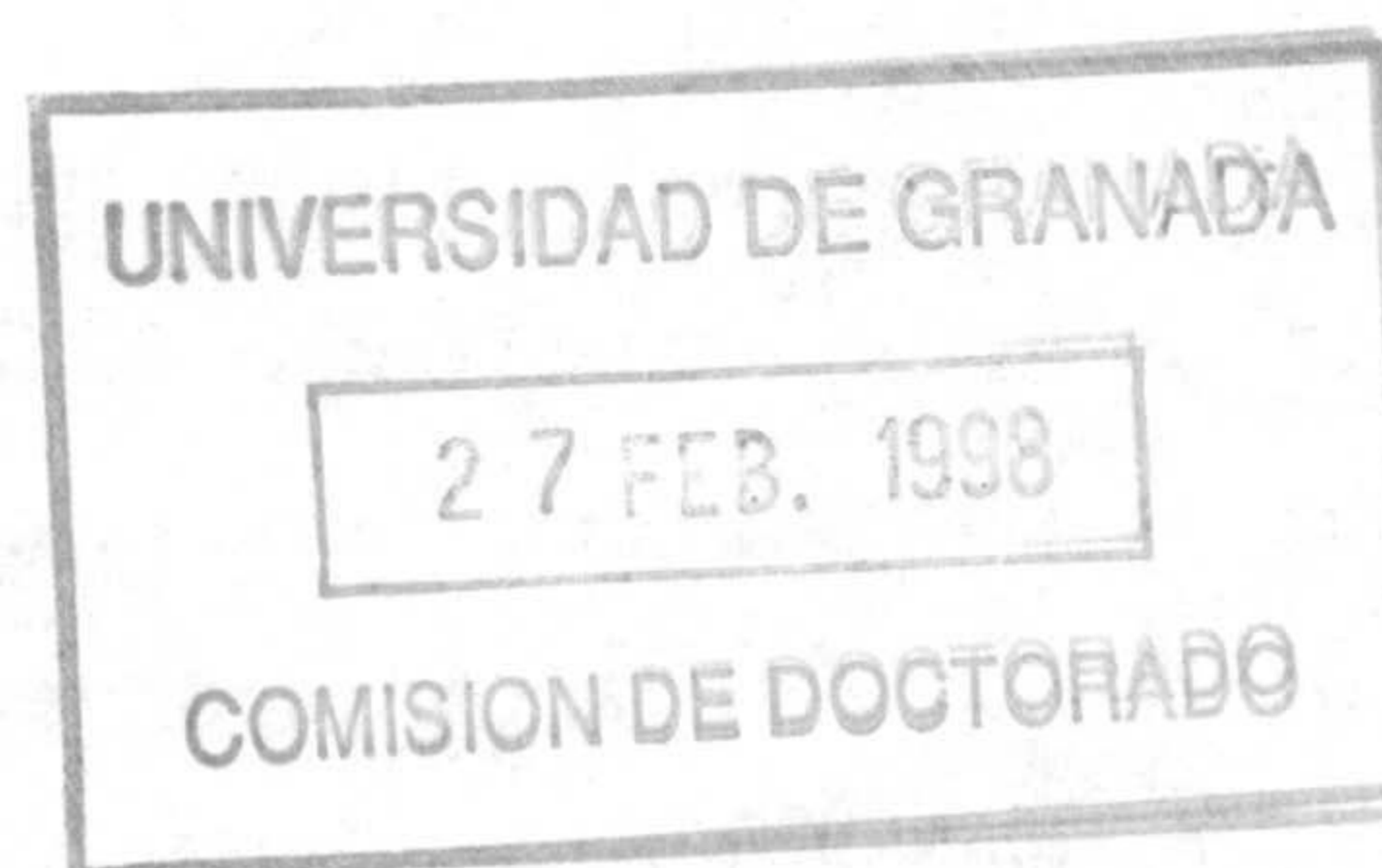
Las rejillas se observaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, utilizando un Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss 902 TEM.

## V.- Estudio por Citometría de Flujo

### A.- Introducción a la citometría de flujo

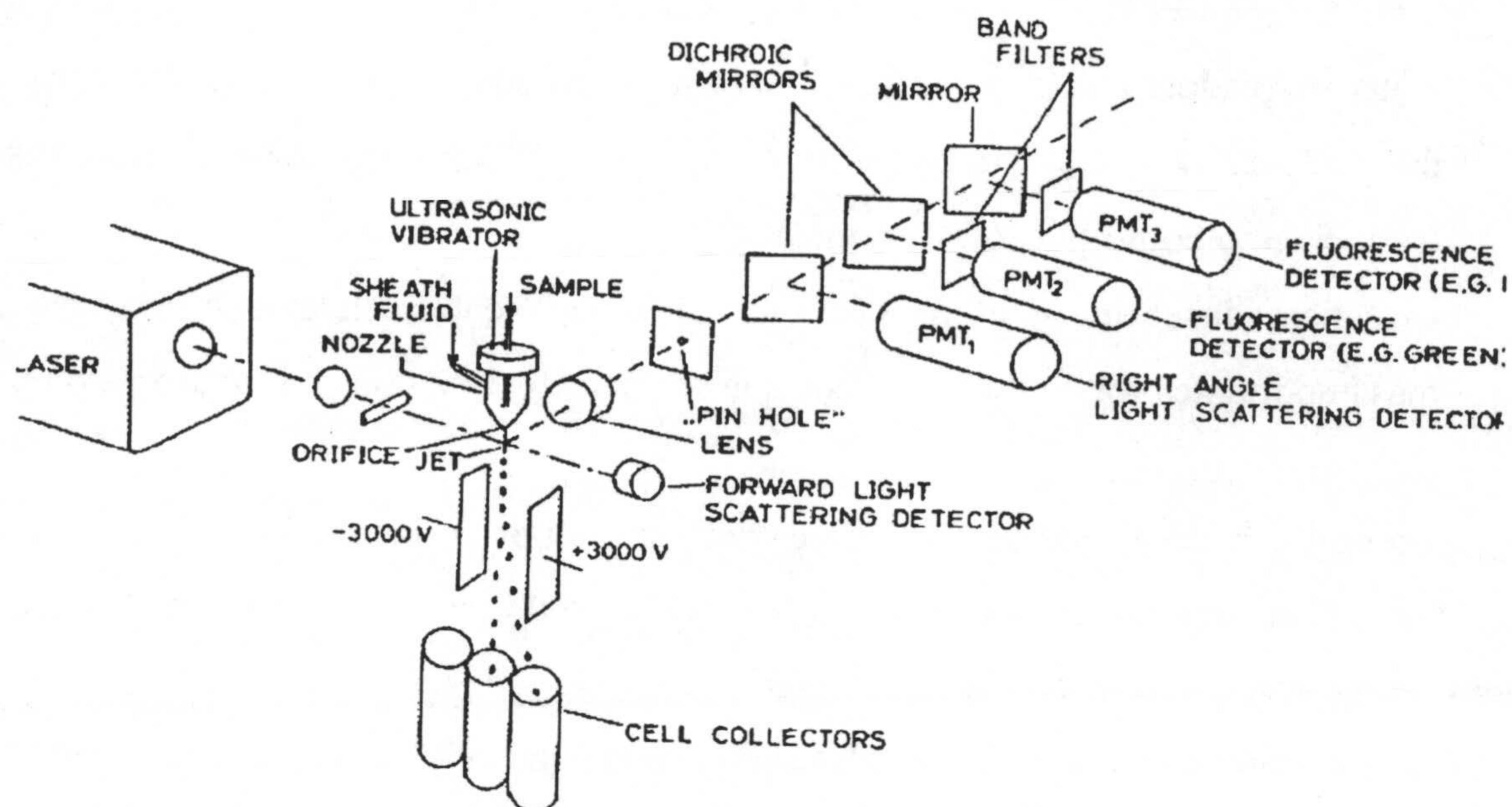
La citometría de flujo nos permite medir partículas (células) de tamaño micro o submicroscópico, con la única condición de que permanezcan en suspensión. Se pueden obtener tres parámetros con cada medida: tamaño relativo, en función de la sombra que proyectan al interceptar una fuente luminosa de tamaño conocido, FSC (dispersión frontal de luz); rugosidad superficial, en función de la dispersión lateral de la luz, SSC (90° C) y por último fenómenos de fluorescencia, FL (autofluorescencia o mediante marcadores fluorescentes).

Las células son transportadas individualmente en suspensión por un flujo hidrodinámico. Se confinan en el centro de la corriente gracias a la acción de un líquido envolvente, que además asegura la correcta individualización de las células. En este sentido, las partículas se introducen a presión por un tubo en una cámara que posee un orificio, que



además es perfundida con el líquido envolvente. Ambas fases abandonan la cámara por una apertura, cuyo tamaño determina el diámetro de la corriente fluida resultante. La cantidad de células que entran en el líquido envolvente puede ajustarse modificando la diferencia de presión entre el líquido y la suspensión celular. Esto, junto con el ajuste en la concentración de la suspensión celular, permite un flujo secuencial de células individualizadas a través de la corriente.

Las células atraviesan un haz de láser. La dispersión provocada por el paso de la célula (o núcleos en nuestro caso), es registrada gracias a detectores dispuestos de la siguiente forma: uno se sitúa perpendicularmente al haz láser, hacia delante, y otro en ángulo recto que sólo recibe luz dispersada por la partícula analizada. El primero permite determinar el tamaño relativo de la partícula y la medida de la dispersión en ángulo recto, nos permite determinar la complejidad y topología superficial de la misma. Aparte de éstos, existen otros detectores de fluorescencia, también situados en ángulo recto (haz dispersado), seleccionándose las señales fluorescentes mediante espejos dicróicos y filtros adecuados. Los detectores producen una señal analógica, proporcional a la señal registrada. Estas son amplificadas y transformadas en digitales, para facilitar el procesado de las mismas. Los datos son representados en forma de histogramas, nubes de puntos ó topogramas. La cantidad de señal fluorescente registrada es proporcional a la cantidad de compuesto fluorescente asociado a los núcleos (que se expresa en una medida arbitraria, denominada canales), por lo que, en el marcaje con anticuerpos conjugados con fluoresceína, corresponde a la cantidad de antígeno existente en el interior de los núcleos. La ventaja fundamental de este aparato sobre los recuentos en microscopio de fluorescencia, reside en la precisión y elevado número de células analizadas en unos minutos (500-1.500 cls/seg).



*Figura 8: Esquema de un citómetro de flujo con detectores para fluorescencia y dispersión luminosa.*

Las muestras se analizaron en el Servicio de Citometría de flujo del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, utilizando un citómetro FACS-Vantage Becton Dickinson (de Becton Dickinson Immunocytometry System, Palo Alto, California), dotado con un láser de argón (dual a 488nm y UV 365 nm) Enterprise de Coherent, Palo Alto California.

Las muestras se analizaron según cada detector, de la siguiente manera:

- en el detector FSC (tamaño relativo), con un filtro BP 488, en escala lineal.
- en los detectores FL1 y FL2 en escala logarítmica, dotado de un filtro BP 530/30 para fluoresceína y 585/35 para yoduro de propidio respectivamente. El láser se reguló a 45 mW siendo la velocidad de adquisición de 500 cls/seg.

## B.- Procedimiento

Los tipos de marcadores fluorescentes utilizados en citometría de flujo se dividen en dos categorías (Ormerod, M.G, 1994):

- los marcadores que se utilizan para marcar covalentemente anticuerpos con fluoresceína ( $\lambda_{\text{excit. max}} = 495 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emis. min.}} = 520 \text{ nm}$ ) sintetizada en forma de isotiocianato como fluoróforo principal.
- los marcadores que se utilizan para marcar componentes celulares directamente, los más importantes son lo fluorocromos que se unen al ADN, como el yoduro de propidio.

En este estudio lo que se pretende es determinar por citometría de flujo el tamaño e integridad de los núcleos mediante el marcaje con yoduro de propidio el ADN de los núcleos, así como la presencia de melatonina en el interior de núcleos de hepatocitos de rata, marcando con yoduro de propidio y con anti-oveja-IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína (anti-IgG-FITC) (Sigma Immunochemicals). Para ello se siguió el siguiente procedimiento, optimizado experimentalmente, para dos tipos de muestras diferentes: núcleos de ratas normales y núcleos de ratas pinealectomizadas 7 días antes sacrificio.

Los núcleos purificados por gradiente de sacarosa se resuspenden en tampón A (0.01M fosfato salino pH: 7,4) con 0.1% Tritón X-100 (Sigma Inmunochemicals), un detergente no iónico que permite disolver parcialmente la membrana nuclear y poder producir suspensiones monodispersas de núcleos aislados (Larson, J.K., 1994). La suspensión de núcleos (0.2 g de tejido/ml tampón) se incubó con distintas diluciones (1/10, 1/40 y 1/60) de anticuerpo frente melatonina obtenido en oveja (G/S/8483 Stockgrand Ltd, U.K.) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación moderada. Posteriormente se lavó 3 veces con el tampón A mediante centrifugación (700 g durante 5 min). A continuación se realizó el marcaje con el anti-IgG-FITC diluido 1/75 en PBS más 0.1% BSA y 0.05% de azida sódica, durante 45-60 min a temperatura ambiente y en oscuridad, lavándose de nuevo 3 veces con el tampón A por centrifugación. Finalmente se añadió el yoduro de propidio (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y se dejó en reposo durante 10 min antes de ser analizado en el citómetro de flujo.

Como control de marcaje inespecífico, se repitió este protocolo, pero omitiendo la incubación con el primer anticuerpo. Como control técnico los núcleos incubados con anti-IgG-FITC se observaron a microscopía óptica de fluorescencia.

## VI.- Métodos de eliminación de sales

### A.- Diálisis

Se utilizaron membranas de diálisis suministradas por Medicell International LTD, con tamaño de poro entre 5 y 8 kDa. La activación de las membranas se realizó siguiendo el método descrito por Schleif y Wensink (1981), que consiste en varios lavados de las mismas con solución EDTA 0,2 M, en agua bidestilada a ebullición. Las membranas se almacenaron a 4° C en una solución al 0,1% de EDTA 0,2 M. La solución que contiene las proteínas se introduce en las membranas de diálisis mediante una pipeta Pasteur, y se dializó frente a un volumen de 2 l de agua destilada durante 72 h, con cambios cada 3 o 6 h y en agitación. Posteriormente el dializado se congeló a -80° C y liofilizó para concentrar la muestra.

### B.- Cromatografía de filtración en gel

Se utilizaron columnas PD-10 de Sephadex G-25 Medium (Pharmacia Biotech), con un rango de separación para proteínas globulares de 1.000 a 5.000 Da y un límite de exclusión aproximado de 5.000 Da. El método consiste en equilibrar el gel con 25 ml del tampón donde está disuelta la muestra. Una vez equilibrado se añadió la muestra en un volumen máximo de 2.5 ml. Se descarta el eluyente donde van los contaminantes de bajo peso molecular y una vez que ha terminado de pasar la muestra por la columna, los componentes de mayor tamaño son eluidos con 3.5 ml de tampón. Posteriormente el eluato se congeló a -80° C y liofilizó para concentrar la muestra.

## VII.- Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración total de proteínas se han utilizado dos métodos el de Lowry (Lowry y cols. 1951) y el de Bradford (Bradford, M., 1976).

### A.- Método de Lowry

La reacción de Lowry para la determinación de proteínas es una modificación del

procedimiento del Biuret (Layne y cols. 1957). El primer paso implica la formación de un complejo de cobre-proteína en una disolución alcalina. La reacción del biuret para la determinación de proteínas fue uno de los primeros métodos desarrollados para el análisis colorimétrico de proteínas, que todavía goza de un extenso uso hoy en día. En los casos en que la cantidad de proteínas a determinar es muy pequeña, se utiliza este método descrito por Findlay y cols. (1986). Este método se basa en la medida del color resultante de la reacción del biuret, de enlaces peptídicos con el cobre en medio alcalino, y de la reducción del reactivo de Folin.

### 1.- Reactivos

- *Solución A*: Carbonato sódico al 2 % (p/v) en hidróxido sódico 0.1 M
- *Solución B*: Sulfato de cobre al 0,95 % (p/v)
- *Solución C*: Tartrato sódico potásico x 4H<sub>2</sub>O al 2,51% (p/v)

Las soluciones A:B:C se mezclan en la proporción 100:1:1 (v/v/v). Esta disolución se puede utilizar durante 12 h.

- *Solución D*: Reactivo de Folin-Ciocalteu comercial diluído 1:2 (v/v) con agua destilada.

### 2.- Procedimiento

Para la determinación de proteínas en una muestra con una concentración menor ó igual a 25 µg/ml, hay que preparar distintas diluciones de una proteína utilizada como estándar (albúmina de suero bovino), entre 1-25 µg/ml para obtener la curva patrón cada vez que se realice el ensayo. A continuación se añade 1 ml de la mezcla de las soluciones A:B:C recién preparada a cada uno de los tubos estándares, se agitan y se dejan incubar a temperatura ambiente. Pasados 10 min se añade a cada tubo 100 µl de reactivo de Folin (solución D), agitando e incubando a temperatura ambiente, durante 30 min. Finalizado este tiempo el color de la reacción se estabiliza, la densidad óptica en un espectrofotómetro Milton Roy (Spectronic

3000) previamente ajustado con los blancos (tubos que contienen todos los reactivos pero no proteínas) a una longitud de onda de 750 nm.

Para el cálculo de la concentración de proteínas, se hace una representación gráfica de los valores de absorbancia de los puntos de la curva estándar frente a sus concentraciones respectivas. Por extrapolación se obtiene el contenido en proteínas de la solución problema. Sin embargo, para estimar de forma rápida la concentración proteica se puede utilizar la siguiente relación descrita por Hudson y Hay, (1989):

$$\text{Concentración proteica (mg/ml)} = 1,55 \times A_{280} - 0,77 \times A_{260}$$

$A_{280}$ : Valor de la absorbancia a 280 nm

$A_{260}$ : Valor de la absorbancia a 260 nm

## **B.- Método de Bradford**

Para determinar la concentración total de proteínas se ha utilizado también el método de Bradford, basado en la diferencia de color de un reactivo respecto a distintas concentraciones de proteínas.

El ensayo consiste en la observación de los cambios de absorbancia máxima desde 465 a 595 nm, que se producen en una solución ácida de Coomassie Blue G-250 cuando se une a proteínas (Reisner, A.H. y cols., 1975) (Rubin y cols., 1977) (Sedmack, 1977).

### **1.- Reactivos**

- Reactivo concentrado de Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad, Alemania), 450 ml : (Coomassie Blue G-250 en etanol 95% y ácido fosfórico 85 %).

## 2.- Procedimiento

Para la determinación de proteínas, con una concentración menor ó igual a 25 µg/ml, hay que preparar distintas diluciones de la proteína utilizada como estándar (albúmina de suero bovino), entre 1-25 µg/ml y obtener la curva patrón cada vez que se realice el ensayo:

- 1.- Se añaden 0,8 ml de las diluciones apropiadas de los estándares y las muestras en tubos limpios y secos. En el tubo usado como blanco se ponen 0,8 ml de tampón donde se encuentre la muestra problema.
- 2.- Se añaden 0,2 ml de reactivo Bio-Rad concentrado.
- 3.- Se agita, invirtiendo varias veces los tubos que contienen las muestras a medir.
- 4.- Después de esperar entre 15 y 30 min se midió la densidad óptica a 595 nm en cubetas de poliestireno en un espectrofotómetro Milton Roy (Spectronic 3000), restando la absorbancia medida para el tubo blanco.
- 5.- Se representa la densidad óptica ( $DO_{595}$ ) frente a la concentración (mg/ml) de los estándares, para obtener la curva patrón. Extrapolando los valores de  $DO_{595}$  de la muestra problema en la recta patrón se obtiene la concentración de las proteínas.
- 6.- Sin embargo para estimar de forma rápida la concentración proteica se puede utilizar la siguiente relación descrita por Hudson y Hay, (1989):

$$\text{Concentración proteica (mg/ml)} = 1,55 \times A_{280} - 0,77 \times A_{260}$$

$A_{280}$ : Valor de la absorbancia a 280 nm

$A_{260}$ : Valor de la absorbancia a 260 nm

## VIII.- Preparación y solubilización de las proteínas nucleares

Una alícuota de los núcleos purificados se resuspendió en 1 ml de Tris-ClH (50 mM pH: 7,4) y se homogenizó en Polytron (punto 4 x 7 s), para obtener lo que denominamos **extracto nuclear**. El tampón de homogenización lleva incluido inhibidores de proteasas de bajo peso molecular: EDTA 5mM, fluoruro de fenilmetasulfonil (PMSF) 0,1mM, leupeptina 20 µM



y pepstatina A 2  $\mu$ M (preparados según Power, J.C. y cols., 1986). A éste tampón se añadió Tritón X-100 ó digitonina (0,01-1 %) para aumentar la solubilización de las proteínas (Helenius, A y cols. 1979) (Hjelmeland, L.M. 1990). Todos los productos citados anteriormente proceden de SIGMA Chemicals Co

El extracto nuclear así obtenido se incubó durante 1 h a 37° C con DNasa (25  $\mu$ g/ml) y RNasa (20  $\mu$ g/ml), preparadas según Maniatics y cols. (1989). Este incubado se centrifugó a 48.000g durante 20 min a 4° C (SORVALL RCSC, rotor SS34), cuyo sobrenadante es lo que denominamos **muestra solubilizada**.

### **IX.- Precipitación de proteínas**

Siguiendo uno de los métodos propuestos por Englard (1990), las muestras solubilizadas obtenidas (según lo descrito en el apartado anterior) se le añadió muy lentamente y en constante agitación concentraciones variables de sulfato amónico ( $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ) (Dawson y cols. 1986). Después de agitar entre 15-60 min en hielo, la mezcla se centrifugó a 48.000 g (SORVALL RCSC, Rotor SS34) durante 20 min a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió suavemente en tampón Tris-ClH (50mM pH 7,4), para a continuación someterlo a uno de los dos métodos de eliminación de sales (diálisis ó cromatografía en gel). Posteriormente el dializado se congeló y liofilizó para concentrar la muestra.

### **X.- Técnicas cromatográficas**

Las proteínas pueden interaccionar con un gran número de fases sólidas, por lo general, de forma selectiva. Por ello el uso de técnicas cromatográficas, permite discriminar entre diferentes tipos de proteínas, y tiene una gran aplicación en la purificación de las mismas. En general, el uso de las técnicas cromatográficas en una etapa de la purificación supone un gran incremento en la pureza de la proteína. Nosotros hemos aplicado diferentes técnicas cromatográficas para purificar proteínas y caracterizarlas.

A continuación pasamos a reseñar brevemente los tipos de cromatografías utilizadas, y la preparación del material cromatográfico, así como algunas características técnicas de interés (Cuatrecasas y Anfisen, 197 y Cuatrecasas, 1972);

## A.- Cromatografía de afinidad

### 1.- Introducción

La base de las técnicas de cromatografía de afinidad es fijar covalentemente las moléculas a reconocer a una matriz sólida inmóvil. Dicha matriz contiene un ligando unido a ella, con alta afinidad para la molécula presente en la muestra que queremos purificar. Una mezcla que contenga la macromolécula deseada se filtra a través de esta matriz. La gran mayoría de las moléculas no tienen afinidad por el ligando unido a dicha matriz, y fluyen a través de ella sin retenerse. La macromolécula deseada no obstante reconoce al ligando uniéndose a él. Después de que todos los componentes no deseados se han eluido de la columna, las condiciones de la disolución de lavado se modifican, para producir la disociación de la macromolécula y el ligando unido. La macromolécula deseada en consecuencia aparece purificada en el eluyente.

Aunque algunas pautas generales son útiles, debe recalcarse que las condiciones necesarias para purificar una determinada macromolécula deben hacerse específicamente en función de sus propiedades biológicas. Para ello, es necesario tener en cuenta:

- El tipo de matriz utilizada.
- La naturaleza del ligando y los medios de unión covalente a la matriz.
- Las condiciones utilizadas para adsorber y eluir la macromolécula deseada.

#### *- Matriz cromatográfica*

Las características deseadas de una matriz para la cromatografía de afinidad se parecen en muchos aspectos a las requeridas por un medio de tamiz molecular:

- Adsorción inespecífica baja.
- Características para mantener un buen flujo.

- Estabilidad química y mecánica en un amplio rango de pH, fuerzas iónicas y concentraciones desnaturizantes.
- Disponibilidad de grupos químicos capaces de ser activados.
- Porosidad alta.

*- Selección del ligando*

La selección del ligando a utilizar en la construcción de una columna requiere una consideración cuidadosa.

- 1.- El ligando debe tener capacidad para ligar de forma específica y reversible la sustancia a purificar.
- 2.- El ligando deberá tener grupos químicamente modificables que queden retenidos en la matriz sin destruir su capacidad unión.
- 3.- El ligando debe tener una constante de disociación comprendida entre  $10^{-4}$  y  $10^{-8}$ M. Envoltentes con constante de disociación superiores a  $10^{-4}$  M, por ejemplo la reacción de unión entre un enzima y un inhibidor pesado, no constituyen base apropiada para una buena cromatografía.

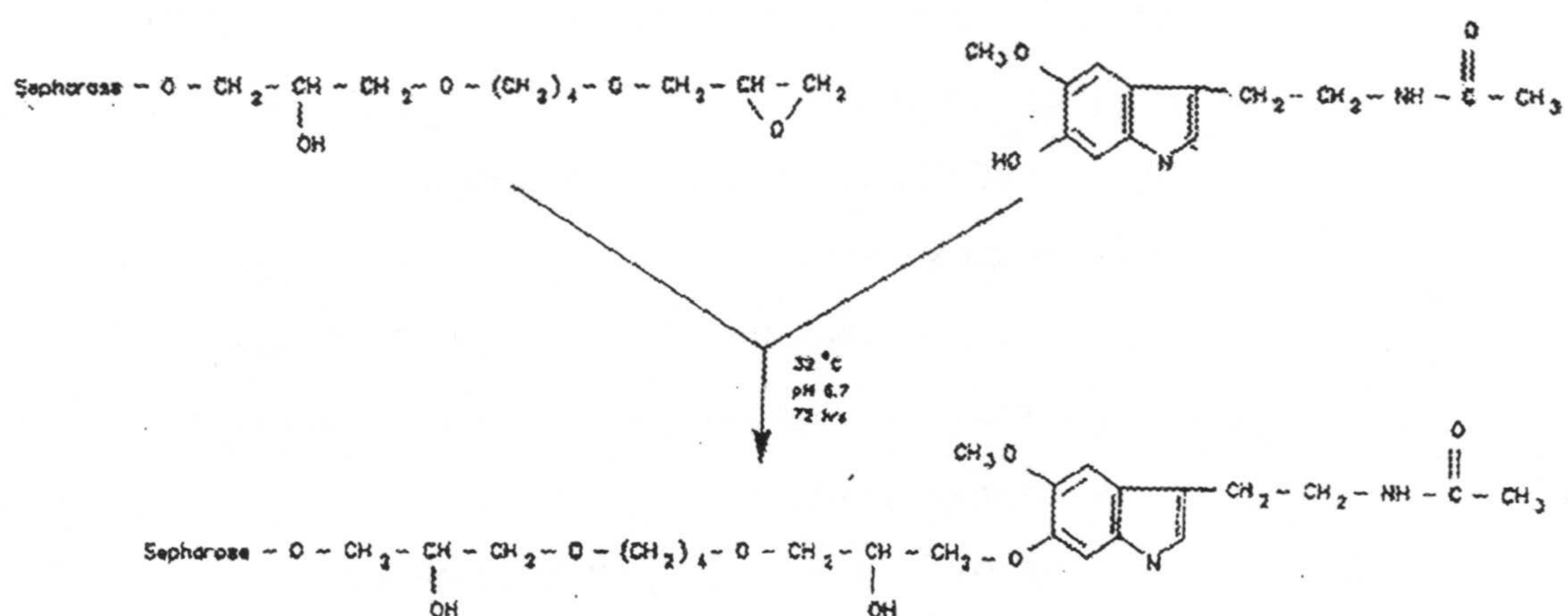
Es importante considerar la región del ligando que se une a la matriz. Si existen varios grupos funcionales, el ligando se deberá acoplar a través del grupo que sea menos probable que intervenga en la interacción específica con la molécula a ser aislada.

*- Montaje de los adsorbentes*

Para unir covalentemente el ligando a la matriz es necesario la activación de los grupos funcionales de dicha matriz. Las reacciones químicas utilizadas para producir la unión deben ser lo suficientemente suaves para que sean bien toleradas, tanto por el ligando como por la matriz. Una vez unida, la matriz soporte debe lavarse exhaustivamente para eliminar cualquier ligando libre, y debe determinarse la cantidad de ligando unido. Esta última medida es más útil expresarla en términos de cantidad por mililitro de matriz de relleno, más que en su peso seco.

## 2.- Preparación de la agarosa- melatonina

Como matriz se utilizó la Epoxy-Sepharose 6B (Pharmacia Biotech. Suecia), un derivado pre-activado que reacciona espontáneamente con ligandos que tienen grupos hidroxilos libres, como la 6-hidroximelatonina (Sigma Chemicals Co.), produciéndose un acoplamiento rápido y fácilmente controlable del ligando a la matriz, mediante enlaces covalentes (Vretblad, 1976). Este acoplamiento forma una resina, denominada agarosa-melatonina (Rivkess y cols., 1990) (Figura 9)



*Figura 9: Síntesis de la agarosa melatonina*

Para la preparación de esta resina se realizaron los siguientes pasos (Sundberg y cols., 1974 y Pharmacia LKB Biotechnology, 1988):

- 1.- Se pesó la cantidad necesaria de Epoxi-Sepharose6B activada, sabiendo que 1g de la misma equivale aproximadamente a 3 ml de gel.
- 2.- Se hinchó y lavó el gel con abundante agua desionizada durante 15 min y agitando suavemente de vez en cuando.
- 3.- Se disolvió la 6-hidroximelatonina en el tampón acoplador preparado fresco, 50% dioxano/50% tampón fosfato sódico a pH: 8,7, a una concentración entre 10-30  $\mu\text{mol/ml}$  gel. Se deben evitar los tampones que contienen amonio o grupos amino (como por ejemplo glicina,

acetato amónico, tris o bicarbonato amónico), porque pueden competir con el ligando. Los tampones de borato o bicarbonato sódico son adecuados.

4.- El gel activado y lavado se mezcló con la solución de ligando en una relación 1:2 (v/v), para crear una suspensión adecuada. Esta mezcla se puso bajo atmósfera de nitrógeno (para evitar su oxidación) y se dejó en oscuridad de 48-72 h a 32°C en un agitador orbicular, quedando unido covalentemente al medio soporte. No es recomendable el uso de agitadores magnéticos.

5.- Para eliminar el ligando no unido a la resina, se lavó ésta con tampón acoplador, seguido de tampones bicarbonato (0.1 M, pH:8,0) y acetato (0.1 M, pH:4,0). Aunque se espera que los grupos activados de la Sepharosa no perduren más de 12 h, es conveniente bloquear con etanolamina 1 M durante 16 h a 30° C y en agitación suave. Esto asegura que cualquier grupo activado superviviente sea bloqueado. Tras ello se efectúa un lavado exhaustivo con agua desionizada, y tampones bicarbonato y acetato que contengan 500 mM de NaCl y 0.05% digitonina (Sigma Chemicals Co). Finalmente la resina fue resuspendida en igual volumen de 0,05% de digitonina y guardada a 4° C.

### **3.- Cromatografía de afinidad de las muestras solubilizadas**

Las muestras solubilizadas (con y sin detergente; antes y después de precipitar con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ) se mezclaron por adsorción en vaso de precipitado o pasando a través de columna con la agarosa-melatonina (Apriletti y cols., 1981).

En el primer caso la muestra solubilizada y la resina (10-20 vol:1vol) se incubaron durante un período mínimo de 16 h a 4° C con agitación suave (100 rpm en orbital circular) (Rivkess y cols., 1990). La resina se centrifugó (1.500 g) y lavó sobre maya de nylon, al menos cuatro veces con 10 vol de tampón de lavado (0.05% digitonina). Posteriormente la resina fue específicamente eluida por incubación del gel con melatonina (10  $\mu\text{M}$ ; 1vol) durante un mínimo de 6 h a 4° C con moderada agitación. Finalizado este tiempo se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores y se recoge el eluido (muestras parcialmente purificadas).

En el segundo caso se utilizó el equipo de Pharmacia Fine Chemicals compuesto por:

- Un monitor de ultravioleta UV-1, que contiene una unidad óptica con una célula de flujo, una longitud de onda de operación de 280 nm y una unidad de control ajustada

a una sensibilidad de 0.1 unidades de absorbancia (UV).

- Un colector de fracciones FRAC-100 programable, acoplado a la unidad de control del monitor.
- Un registrador gráfico acoplado también a la unidad de control.

Una vez montada y conectada la columna, se procede a equilibrar haciendo pasar tampón de lavado (0,05% digitonina) a través de la columna a un flujo de 0.2 ml/min. Tras equilibrar y ajustar la línea base, se procedió a añadir la muestra correspondiente. La fracción no ligada se elimina pasando a través de la columna suficiente tampón de lavado. A continuación se pasa tampón de elución (10  $\mu$ M de melatonina en tampón de lavado) con el mismo flujo anterior para obtener de este modo la fracción reconocida específicamente.

Tanto en el primer como en el segundo caso se elimina el exceso de melatonina en las fracciones eluidas mediante diálisis ó a través de columnas Sephadex G-25 (preequilibradas con 0.05% digitonina). El eluato final se concentra mediante liofilización.

## XI.- Electroforesis

Las técnicas electroforéticas se han convertido en herramientas básicas tanto para la caracterización de macromoléculas como para determinar su pureza. El método se basa en el hecho de que moléculas tales como los ácidos nucleicos y las proteínas poseen una carga eléctrica, siendo capaces de moverse cuando se colocan en un campo eléctrico. No obstante, aquí sólo es significativa la carga neta de la molécula. Si una molécula de carga neta "q" se coloca en un campo eléctrico, se ejerce sobre ella una fuerza "F", que depende de la carga que posee la molécula y de la fuerza del campo en el que se ha colocado. Esto se expresa matemáticamente como:

$$F = \frac{E}{d} q$$

Donde "E" es la diferencia de potencial entre los electrodos y "d" es la distancia entre ellos. Si esta situación ocurre en el vacío, la molécula se aceleraría hacia el electrodo y

finalmente, chocaría con él. Sin embargo, en disoluciones esto no ocurre, porque la fuerza de empuje del campo eléctrico se opone al arrastre o fricción que hay entre la molécula acelerada y la disolución. La extensión del arrastre, descrita por la ecuación de Stokes, depende del tamaño, forma de la molécula y de la viscosidad del medio a través del que se mueve:

$$F = 6\Pi r n v$$

Donde "F" es la fuerza de arrastre ejercida sobre una molécula esférica, "r" es el radio de la molécula, "n" es la viscosidad de la disolución y "v" es la velocidad a que se mueve la molécula.

En definitiva, la velocidad a la que se mueve la molécula es directamente proporcional a la fuerza del campo y carga de la molécula, pero es inversamente proporcional a su tamaño y a la viscosidad de la disolución del gel.

Las primeras aplicaciones de los métodos electroforéticos se efectuaron en disoluciones de sacarosa. Sin embargo, la naturaleza laboriosa de estos métodos y el costoso equipo necesario han limitado mucho su empleo. Fue la llegada de los geles de acrilamida lo que proyectó este método a su actual popularidad, donde la migración de macromoléculas a través del gel está fuertemente influenciada por la propia estructura éste.

Los geles de poliacrilamida están formados por la copolimerización de acrilamida y bis-acrilamida (N,N'- metilenbisacrilamida). La reacción es una vinil- adición - polimerización, iniciada por un sistema generador de radicales libres. La polimerización se inicia por tetrametilendiamina (TEMED) y persulfato amónico, el cual produce un radical libre persulfato que rodea y activa al TEMED, que a su vez actúa como un portador de electrones para activar los monómeros de acrilamida. Los monómeros activados reaccionan con monómeros inactivados para iniciar la elongación de la cadena del polímero, formando bucles cerrados y un complejo polímero "membranoso", con unas características de porosidad que dependen de la polimerización y de la concentración de monómeros. El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente que permite la solubilización de las proteínas, convirtiéndolas en más hidrófilas y en complejos fuertemente negativos. Así, la movilidad de estos complejos en una solución, depende únicamente del tamaño molecular.





## 2.- Composición de los geles

Se utilizaron geles de poliacrilamida homogéneos al 12,5%, 7,5% y en gradiente 8-25% comercializados por Pharmacia (PhastGel Homogeneous 12.5 y 7.5% y PhastGel Gradient 8-25%), en condiciones desnaturalizantes. Estos geles permiten un rango de separación de 14-250 kDa, 30-300 kDa y 6-300 kDa respectivamente. La zona del gel separador tiene una longitud de 32 mm y la del gel almacenador de 13 mm, con 0,45 mm de anchura.

También se utilizaron pastillas de separación, igualmente comercializadas por Pharmacia (PhastGel SDS Buffer Strips), compuestas de tampón de electrodos en un 2% de agarosa, que se colocan en los extremos superior e inferior del gel.

### a.- Reactivos

Composición del gel y de algunas soluciones que fueron utilizadas durante la experiencia.

- *Solución A*: Solución de acrilamida/Bis. 29,1 gr de acrilamida y 0,9 gr de Bis-acrilamida, en 100 ml de agua destilada. Disolver, filtrar y mantener a 4° C en oscuridad (es estable durante 2 semanas).

- *Solución de persulfato de amonio (APS)*: se disuelve 400 mg de persulfato de amonio en 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Estable durante una semana a 4° C.

*Solución B*: Tampón del gel almacenador. 6,06 gr de tris, 0,4 gr SDS y 0,01 gr de azida sódica en 80 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 6,8 con 4 M HCl y se completa hasta 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

- *Solución C*: Tampón del gel separador (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8). 18,18 gr de Tris más 0,4 gr SDS y 0,01 gr de azida sódica en 80 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 8,8 y completar hasta 100 ml con agua destilada.

- *Solución D*: Tampón de electrodos. 3,03 gr de tris, 14,4 gr de glicina, 1 gr SDS y 0,1 gr de azida sódica en 100 ml de agua destilada.

- *Solución E*: Tampón de disolución de la muestra. 10 mM de tris/HCl y 1 mM EDTA a pH 8. Se le añade SDS al 2,5%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,01%.

### b.- Procedimiento de preparación de los geles y de las pastillas

Se prepararon los geles separador y almacenador mezclando volúmenes de las soluciones tal como se especifica en la tabla I.

1.- Para el gel separador a 5 ml se le añadió 6  $\mu$ l de APS, se mezcló y se introdujo en el espacio entre las placas.

2.- Se adicionaron 2  $\mu$ l de APS a 1,5 ml de la solución de gel almacenador, se mezcló y se vertió en la placa. Se dejó polimerizar durante 3 h, aunque es preferible durante toda la noche.

Preparación de pastillas: para 10 pastillas, se necesitan 30 ml de la solución con agarosa al 2%. Pesar 0,6 gr de agarosa en 15 ml de la solución D (Tampón de electrodos). Añadir agua destilada hasta 30 ml, hervir hasta disolver completamente la solución de agarosa, luego enfriar hasta 65° C y verter la solución en las casillas o estuches (PhastGel Buffer Strip case). Almacenar a 4° C.

**Tabla I:** Volúmenes (ml) de las soluciones necesarias para hacer un gel(12.5%) en el sistema discontinuo de Laemmli.

	Solución del gel separador	Solución del gel almacenador
Glicerol	0,5	4
Solución A.	4,16	2
Solución B	-	2,5
Solución C	2,5	-
Agua	2,84	1,5
TEMED	0,005	0,005

### 3.- Preparación y aplicación de las muestras

Las muestras se diluyeron a 1:1 en la solución E (tampón de muestra) dando una

concentración final entre 0,5 ng y 100 ng/ $\mu$ l. Tras ello se agitaron y se llevó a ebullición durante 5 min. Después de colocar el gel y las pastillas de contacto, las muestras se "pincharon" con ayuda de un aplicador (PhastGel Sample Appl. 8/1, Pharmacia). La separación se realizó según las condiciones de la tabla II, que se programan en la unidad de control del aparato (PhastSystem<sup>TM</sup>): Transcurrido el tiempo de corrido, se extrajo el gel y se procedió a su colocación en la unidad de desarrollo para su tinción.

Tabla II

Paso 1	250V	10.0mA	3.0W	15° C	1Vh
Paso 2	250V	1.0mA	3.0W	15° C	1Vh
Paso 3	250V	10.0mA	3.0W	15° C	70Vh

#### 4.- Tinción con azul coomassie

La técnica de tinción con azul coomassie descrita en este apartado, es derivada del método de Wilson (1979), y ha sido optimizada por Pharmacia LKB Biotechnology.

Los procesos de tinción se realizaron de una manera automática, según la programación de la tabla III.

Tabla III

	Tiempo	Temperatura
<b>Soluciones</b>		
Solución de azul coomassie (*)	8 min	50°C
Metanol 30 % y acético 10 %	5 min	50°C
Metanol 30 % y acético 10 %	8 min	50°C
Metanol 30 % y acético 10 %	10 min	50°C
Acético 10%, glicerol X% (**)	5 min	50°C

(\*) Preparación de la solución madre al 0,2 %: disolver una tableta de Phast Gel Blue R (Pharmacia Biotech) en 80 ml de agua destilada y agitar entre 5-10 min. Añadir 120 ml de metanol y agitar entre 2-3 min.

Solución final: mezclar una parte filtrada de la solución madre con una parte de ácido acético 20 % en agua destilada. Esta solución debe prepararse fresca, utilizarse en el mismo día. No deben reciclarse.

(\*\*) La concentración de glicero varia según el tipo de geles: 2,5 % para Phast Gel Homogeneous 7,5% y 5 % para Phast Gel Homogeneous 12,5%.

### 5.- Tinción con nitrato de plata

La técnica de tinción de plata deriva del método de Heukeshoven y Dernick (1985), y ha sido optimizada por Pharmacia LKB Biotechnology. Los procesos de tinción se realizaron de una manera automática, según la programación de la tabla IV.

Tabla IV

Soluciones	Tiempo	Temperatura
Etanol 50%, Ac, acético 10%	2 min	50° C
Glutaraldehido 8.3%6	6 min	50° C
Agua desionizada	2 min	50° C
Agua desionizada	2 min	50° C
Nitrato de plata al 0.25%	13 min	40° C
Agua desionizada	0.5 min	30° C
Agua desionizada	0.5 min	30° C
Solución de desarrollo(***)	0.5 min	30° C
Solución de desarrollo	4 min	30° C
Acido acético 5%	2 min	50° C
Acético 10%, glicerol X% (**)	3 min	50° C

(\*) Las soluciones no deben reciclarse.

(\*\*) La concentración de glicerol varía según el tipo de geles: 2,5% para PhastGel Homogeneous 7,5%, 5% para PhastGel 12,5% y 10% para PhastGel Gradient 8-25%.

(\*\*\*) La solución de desarrollo se preparó disolviendo 25 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 200 ml de agua bidestilada. A continuación se añadieron 800 ml de agua bidestilada y 400  $\mu\text{l}$  de formaldehído al 37%. Esta solución, y también la de nitrato de plata es extemporánea con una duración máxima de 12 h.

## 6.- Cálculo del peso molecular por electroforesis en presencia de SDS-PAGE

El peso molecular de las subunidades de una proteína se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS. La determinación de pesos moleculares de polipéptidos por electroforesis en presencia de SDS en geles de poliacrilamida fue introducida por primera vez, empíricamente por Shapiro y cols., (1967). Se basa en que todos los polipéptidos unen la misma cantidad de SDS por unidad de peso (1,4 gr de SDS por cada gramo de polipéptido), de forma que la relación carga/masa es constante y la estructura resultante es una varilla cuya carga global, (negativa y debida fundamentalmente a la cabeza polar del SDS), es proporcional a la longitud. Cuando las proteínas son sometidas a electroforesis en un gel, que actúa como tamiz, se demuestra empíricamente que existe una relación lineal entre la movilidad relativa ( $R_f$ ) de estos polipéptidos y el logaritmo de su peso molecular.

Este tipo de electroforesis se utiliza para caracterizar las subunidades proteicas en función de sus pesos moleculares. Para ello es necesario construir una recta patrón con proteínas de pesos moleculares conocidos. El cálculo del peso de las subunidades de la proteína problema se lleva a cabo midiendo los  $R_f$  de las bandas que presenta ésta, y a partir de la recta patrón se obtienen los pesos moleculares (Wyckoff y cols., 1977).

El patrón de pesos moleculares se componía de las siguientes proteínas de referencia (LMW Electrophoresis Calibration Kit. Pharmacia Biotech):

- Fosforilasa b.....	94.000	daltons
- Seroalbúmina bovina.....	66.000	“
- Albúmina huevo.....	43.000	“
- Anhidrasa carbónica.....	30.000	“
- Soybean tripsin inhibitor.....	18.400	“
- $\alpha$ -lactoalbúmina.....	14.000	“

### B.- Isoelectroenfoque (IEF)

El IEF es, dentro de las técnicas electroforéticas, una electroforesis en presencia de un gradiente de pH (Andrews, 1986). En este tipo de electroforesis, las macromoléculas se someten a un campo eléctrico, donde emigran en el gradiente de pH mientras presentan una carga neta y cuando alcanzan el punto del gradiente de pH correspondiente a su punto isoeléctrico (donde la carga neta es cero), la migración cesa. El gradiente de pH se obtiene con una serie de sustancias anfotéricas o anfólicas, de bajo peso molecular. Cuando el cátodo de una célula electrolítica se pone sobre una disolución de base fuerte, y el ánodo en un ácido fuerte, y en el espacio entre ambos electrodos tenemos la disolución de anfólicas, éstas adquieren carga neta positiva en el área cercana al ánodo, y carga neta negativa en el área cercana al cátodo. Si se establece una diferencia de potencial entre ambos electrodos, las anfólicas son repelidas por los electrodos, y se moverán a una región central, hasta alcanzar un estado estacionario en el cual el pH del electrolito que rodea a la anfólica determinada, es igual al punto isoeléctrico de la anfólica. De esta forma, las anfólicas más básicas permanecerán cerca de la disolución básica del cátodo y las otras anfólicas se ordenan según su punto isoeléctrico hasta llegar a las anfólicas más ácidas, que se situarán cercanas a la disolución ácida del ánodo.

Estas anfólicas deben cumplir una serie de requisitos para su uso en isoelectroenfoque (Andrews, 1986):

- 1.- Buena capacidad de tamponamiento, de forma que sean ellas las que impongan el pH en su punto isoeléctrico, incluso en presencia de anfólicas de alto peso molecular tales como las proteínas que pueden estar presentes en la misma zona.
- 2.- Buena conductividad en su punto isoeléctrico, con el fin de mantener la conductividad eléctrica en ausencia de otros electrolitos.
- 3.- Bajo peso molecular, para facilitar la separación de las macromoléculas estudiadas.
- 4.- No deben desnaturar a las macromoléculas a separar ni reaccionar con ellas.

Las anfólicas que cubren estos requisitos suelen ser ácidos policarboxílicos o poliaminas, que pueden adquirirse en casas comerciales que la suministran bajo diferentes nombres.

El isoelectroenfoque puede llevarse a cabo en varios tipos de matrices, como geles de poliacrilamida, de agarosa o geles granulados (Sephadex), y su elección depende del propósito para con que se realiza el isoelectroenfoque.

La separación y tinción de las proteínas presentes en el material de estudio se llevaron a cabo en el equipo de electroforesis (PhastSystem™ Pharmacia). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 5%, con un rango de pH entre 3 y 9 (PhastGel IEF 3-9), comercializados por Pharmacia Biotech (Suecia), para determinar el carácter ácido o básico de las proteínas del material purificado.

### 1.- Procedimiento y aplicación de la muestra

Hemos seguido el protocolo descrito por Pharmacia Biotech (PhastSystem™ Separación Technique File No.100). Se colocó el gel en el cámara de separación, e inmediatamente después “pinchamos” las muestras (diluídas adecuadamente en PBS), en un soporte plástico de aplicación (PhastGel, Sample Appl. 8/1), poniendo en un carril proteínas marcadoras de punto isoeléctrico (Isoelectric Focusing Calibración Kit, Pharmacia). Colocamos el soporte con las muestras, en una posición media sobre el gel.

La separación se lleva a cabo bajo las condiciones de la tabla V, que se programan en la unidad de control.

Tabla V

Paso 1	2000V	2.5mA	3.5W	15° C	75Vh
Paso 2	200V	2.5mA	3.5W	15° C	15Vh
Paso 3	2000V	2.5mA	3.5W	15° C	410Vh

El primer paso es un preenfoco de aproximadamente 10 min donde las anfolinas adquieren un estado estacionario creando así el gradiente lineal de pH (Williams y cols., 1979). En el paso 2, se depositan las muestras sobre el gel, a partir del cual se produce la separación de las bandas, según su punto isoeléctrico. Al final del proceso se extrae el gel, y se procede a su desarrollo y tinción, para visualización de las bandas.

## 2.- Tinción con nitrato de plata

La tinción con nitrato de plata detallada en este apartado para los geles de IEF, presenta ciertas modificaciones respecto a la utilizada para teñir los geles de electroforesis (SDS-PAGE), compensando así las diferentes propiedades existentes entre ambos geles.

La tinción se realiza de forma automática, después de programar en la unidad de control los pasos de tinción, según la tabla VI.

Para la determinación de los puntos isoeléctricos (pIs) se construyó una curva patrón con las distancias al cátodo, frente a los pIs de cada proteína marcadora (Isoelectric Focusing Calibration Kit, Pharmacia). Se midió la distancia al cátodo del problema, y se calculó su pI aproximado por extrapolación a la curva.

Tabla VI

Soluciones*	Tiempo	Temperatura
Tricloroacético 20%	5 min	20° C
Etanol 50%, Ac. acético 10%	2 min	50° C
Etanol 10%, Ac. acético 5%	2 min	50° C
Etanol 10%, Ac. acético 5%	4 min	50° C
Glutaraldehído 8.3%	6 min	50° C
Etanol 10%, Ac. acético 5%	3 min	50° C
Etanol 10%, Ac. acético 5%	5 min	50° C
Agua desionizada	2 min	50° C
Agua desionizada	2 min	50° C
Nitrato de plata 0.5%	10 min	40° C
Agua desionizada	0.5 min	30° C
Agua desionizada	0.5 min	30° C
Sol. de desarrollo (**)	0.5 min	30° C
Sol. de desarrollo	4 min	30° C
Acido acético 5%	5 min	50° C

(\*) Las soluciones no deben ser recicladas.

(\*\*) La solución de desarrollo se prepara según la tabla IV.



### 1.- La primera dimensión (IEF)

Se emplearon geles de poliacrilamida al 5% con un rango de pH de 3 a 9.

#### 1.- Preparación y aplicación de la muestra.

##### Tampón de muestra:

- Urea	2,9	g
- Nonidet P-40 10% v/v	0,1	ml
- Anfólitos rango 3-9	0,1	ml
- 2-mercaptoetanol	0,25	ml
- Glicerol	0,1	ml
- Agua bidestilada	5,0	ml

La muestra se diluyó en tampón de muestra, hasta una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se aplica utilizando un soporte de 6 dientes (PhastGel Sample Appl. 6/4) con capacidad de tomar 4  $\mu\text{l}$  de muestra para cada pocillo. Inmediatamente, colocamos el soporte con las muestras en la cámara en una posición media sobre el gel.

El corrido electroforético se realizó según las condiciones siguientes:

Paso 1	200V	2.5mA	3.5W	15°C	30Vh
Paso 2	2000V	2.5mA	3.5W	15°C	770Vh

Para obtener mejores resultados, y de acuerdo con los trabajos de Frey y cols. (1986) no se usó el pre-enfoque en este apartado. Después de la separación se extrajo el gel, se cortó cuidadosamente la tira que contiene la muestra, y se trata con la solución de equilibrado como se detalla en la Figura 10:

#### 2.-Equilibración de las tiras.

a.- Incubó las tiras durante 2,5 min en la solución siguiente: Tris 0,112 M, ácido acético

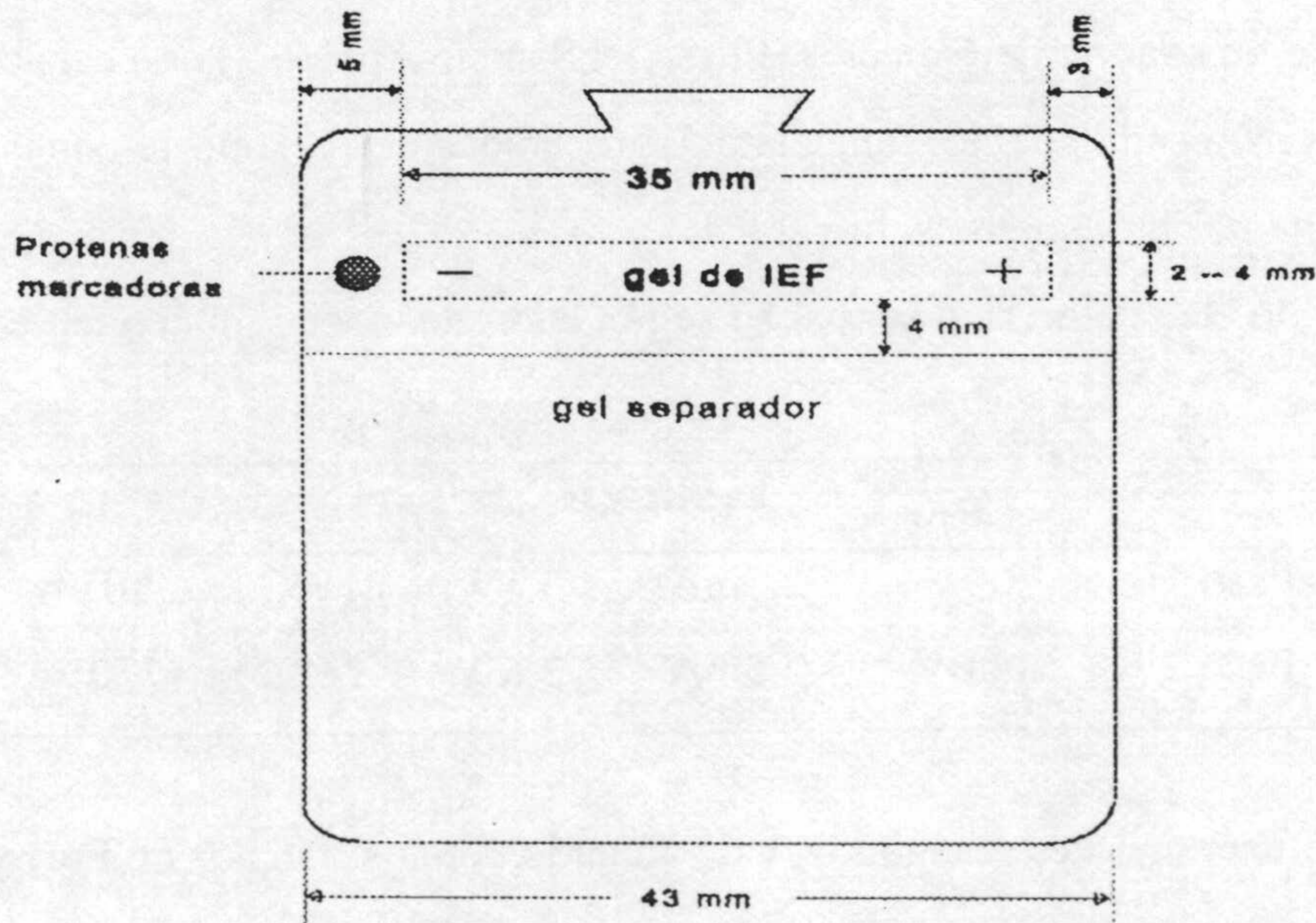
0,112 M, 1% de DTT (Ditiotreitol) ó 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 2,5% de SDS. Esta fase sirve para lavar el gel, eliminar la urea y los anfolitos.

b.- Incubó de nuevo durante 2,5 min en la solución: Tris 0,112 M; ácido acético 0,112 M; 2,5% de SDS; iodo-acetamida 0,26 M y 0,1% de azul de bromofenol. Se ajusta el pH a 6,4.

Una vez equilibradas las tiras se proceden a iniciar la segunda dimensión.

## 2.- Segunda dimensión (SDS-PAGE)

La tira equilibrada se colocó sobre el gel de poliacrilamida al 12,5% en la parte del gel almacenador, dejando un espacio para aplicar las proteínas marcadoras del peso molecular. Los detalles del proceso de colocación, se representan en el esquema siguiente. Al final se extrae el gel y se coloca en la cámara de desarrollo para su tinción.



Una vez colocada la tira, se insertan las pastillas de separación (SDS Buffer Strips, Pharmacia) en la cámara correspondiente. A continuación se procede a la separación aplicando las condiciones de la siguiente tabla.

Tabla VIII

Paso 1	250V	2.5mA	3.0W	15° C	5Vh
Paso 2	250V	5.0mA	3.0W	15° C	5Vh
Paso 3	250V	10.5mA	3.0W	15° C	60Vh

### 3.- Tinción con nitrato de plata

Para obtener mejor resolución en la electroforesis bidimensional, se ha elegido un método de detección con plata distinta a los métodos de tinción desarrollados en los apartados anteriores. Empleamos la metodología descrita por Pharmacia LKB Biotechnology (PhastSystem Technical Note No. 2). Para este propósito se incubó el gel con las soluciones de la tabla IX. Al final se extrajo el gel de la cámara de desarrollo del aparato y se dejó secar.

Tabla IX

Soluciones*	Tiempo (min.)	Temperatura. (°C)
Metanol 40%, ac. acético 10%	5	30
Agua desionizada	5	20
Glutaraldehído 12.5%	7.5	20
Agua desionizada	5	20
Agua desionizada	5	20
Etanol 20%	7.5	20
Solución de plata (**)	7.5	20
Etanol 20%	5	20
Etanol 20%	5	20
Solución de desarrollo (***)	4.5-6	20
Ac. acético 10%, glicerol 5%	5	20

(\*) Las soluciones no deben reciclarse.

(\*\*) La solución de nitrato de plata esta compuesta por: 1 ml de nitrato de plata al 20% + 1 ml de hidróxido amónico al 25% + 5 ml de NaOH + 93 ml de etanol al 20%.

(\*\*\*) La solución de desarrollo se prepara añadiendo a 100 ml de etanol al 20% 100  $\mu$ l de formaldehído al 37% y 25  $\mu$ l de ácido cítrico 2,3 M.

Estas dos últimas soluciones son extemporáneas.

## XII.- Técnicas Autorradiográficas

### A.- Introducción

Aunque la visualización directa de proteínas en geles de SDS-PAGE tiene muchas aplicaciones, la utilidad y la sensibilidad pueden incrementarse por el uso de moléculas marcadas radiactivamente. Esto hace posible convertir esta técnica esencialmente cualitativa en una cuantitativa.

Las imágenes obtenidas por autorradiografía directa sobre una película de rayos-X y en ausencia de intensificadores de pantalla o centelleadores orgánicos son directamente proporcionales a la distribución de radiactividad. La absorbancia de la imagen autorradiográfica aumenta linealmente con el incremento de radiactividad hasta que la película empieza a saturarse (Laskey, R.A., 1975)(Laskey, R.A., 1977). Por tanto, las imágenes obtenidas por autorradiografía directa pueden ser cuantificadas con exactitud.

Los principios de la detección de radioisótopo en película de rayos-X se basan en que las emulsiones fotográficas se componen de cristales de haluro de plata, cada uno de los cuales se comporta independientemente. Para producir una imagen revelable cada cristal requiere varios fotones de luz (aproximadamente cinco de promedio), cada uno de los cuales produce un átomo de plata metálico que catalizan la reducción del cristal entero para el revelado. Un simple golpe de rayos- $\gamma$  puede producir cientos de átomos de plata, así que la autorradiografía directa es un proceso lineal de "simple golpe" en el cual todas las emisiones son grabadas igualmente hasta que la película se satura.

Cuando se usa pantalla reforzadora se incrementa la sensibilidad, pero la respuesta de la película no es lineal, aunque se puede convertir fácilmente por preexposición de la película a un flash o luz (Laskey, 1975 y 1977). Las pantallas reforzadoras incrementan la eficiencia en la detección de  $\gamma$ -emisores tal como el  $^{125}\text{I}$ , atrapando las emisiones a través y más allá de la película y convirtiéndolas en luz, la cual regresa a través de la película superponiéndose una imagen fotográfica sobre la imagen autorradiográfica. La más usada comúnmente como pantalla

reforzadora es la compuesta por tungstato cálcico. Aunque estas pantallas incrementan la eficiencia de detección también disminuye la resolución

**B.- Reactivos y equipo**

- 1.- Geles de poliacrilamida homogéneos al 12,5% y en gradiente 8-25% comercializados por Pharmacia (PhastGel Homogeneous 12.5 y PhastGel Gradient 8-25%)
- 2.- Melatonina marcada radiactivamente: 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina (NEN, Research Products).
  - Actividad específica: 2200 Ci/mmol.
  - Peso molecular: 356.3.
  - Vida media: 120 días.
  - Emisión  $\gamma$  (max) (MeV): 0.035 (+0.027 MeV rayos-X) (+0.030 MeV electrones).
  - Sensibilidad aproximada de detección por autorradiografía directa (sin pantalla reforzadora) del <sup>125</sup>I requerida para detectar una imagen en la película en 24 h (A: 0.02) es de 1600 d.p.m./cm<sup>2</sup>.
- 3.- Melatonina no marcada (Sigma Chemicals Co)
- 4.- Película de R-X. (Film Kodax X-OMAT, 13x18. Sigma) (Agfa Curix, 5x12 cm).
- 5.- Película transparente (Saranwrap).
- 6.- Pantalla reforzadora (Du Pont Cronex 4)

**C.- Procedimiento**

- 1.- La muestra se incubó con 3 nM de 2-[<sup>125</sup>I]melatonina 4° C durante 1 h en ausencia y presencia de melatonina no marcada 1  $\mu$ M (Sigma Chemicals Co).
- 2.- Una vez finalizada la incubación se diluyó en la proporción 1:1 con tampón disolución de la muestra y sometida a electroforesis sobre gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% y teñido con nitrato de plata (según se describe en la pag).
- 3.- Se secó el gel completamente.
- 4.- Cuando el gel se expuso al <sup>125</sup>I se protegió con una película fina de plástico.
- 5.- En una habitación oscura, se colocó la película y el gel (sobre la película) en la placa metálica de rayos-X.

- 6.- Durante la exposición de isótopos tal como el  $^{125}\text{I}$ , hay que impedir colocarla junto a otras placas, para evitar la formación de imágenes fantasmas de muestras adyacentes.
- 7.- Después de la exposición se reveló la película en una habitación oscura. El tiempo de exposición variará de acuerdo con el tipo y cantidad de radiactividad y debe ser determinado empíricamente.
- 8.- Las señales impresionadas en la película correspondientes a las bandas de proteínas se usaron para determinar la presencia de material radiactivo en el gel original (Practical Immunology, 1992a y 1992b).

### XIII.- Técnicas inmunológicas

La gran especificidad, sensibilidad, y resolución de las técnicas inmunoquímicas han llevado a su aplicación en los últimos años a la resolución de problemas en bioquímica y biología molecular, ya que la especificidad de la unión antígeno/anticuerpo, permite considerar a los anticuerpos como herramientas particularmente apropiadas para identificar y discriminar con exactitud cualquier molécula, contra la cual se pueda producir un anticuerpo.

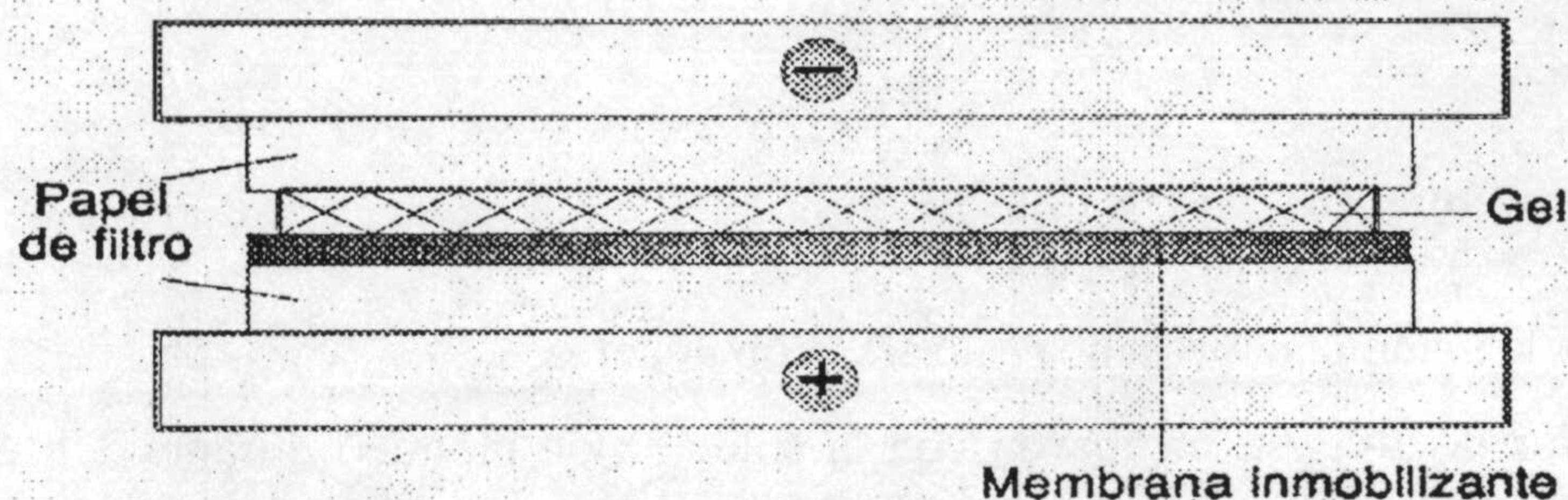
#### A.- Inmunotransferencia (Western-blotting)

La inmunotransferencia de proteínas fue introducida como una combinación de dos de las técnicas analíticas más importantes en los últimos 30 años; la electroforesis en gel y el inmunoensayo. El método combina la capacidad analítica de la electroforesis con la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1979 por varios grupos, y especialmente por Towbin y cols., (1979).

La determinación del número, sensibilidad y especificidad de las proteínas purificadas reconocidas por la melatonina, se llevó a cabo mediante la inmunotransferencia. Esta técnica consiste en la transferencia (blotting) de las proteínas separadas por una electroforesis en gel de poliacrilamida, a una membrana (nitrocelulosa, nylon o PVDF) capaz de ligar proteínas.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% y 7,5% (PhastGel™, homogenous 12,5 y 7,5) (PhastSystem, Pharmacia LKB Biotechnology). Tras la electroforesis

se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Se equilibraron el gel y la membrana durante 15 minutos en tampón de transferencia, (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20 % de pH 8,3 ), y a continuación se preparó un sandwich con la membrana de nitrocelulosa y el gel, como se representa en el esquema siguiente.



El sandwich completo para la transferencia

El sandwich se introdujo en la cubeta de transferencia (Pharmacia LKB PhastTransfer), con el lado del gel situado en el cátodo (-). El proceso se realizó en las condiciones siguientes: 20 V, 25 mA, 1 W, 15° C, 5 Vh. Se comprobó la transferencia cortando una tira del papel de nitrocelulosa y tiñéndola con Negro Amida. A continuación se procedió a la detección con los anticuerpos según se expone en los apartados siguientes.

#### 1.- Reactivos.

- 1.- Tampón fosfato salino (PBS) 0,15 M: NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , KCl, pH 7,4
- 2.- Tampón de bloqueo (PBSTG): PBS con Tween 20 al 0,2 % y gelatina al 0,4%.
- 3.- Tampón de incubación y lavado (PBST): PBS con Tween al 0,1%
- 4.- Antígenos utilizados:
  - a.- Melatonina (Sigma Chemicals Co)
  - b.- Agonista del receptor nuclear de melatonina CGP-52608 (Wiesenberg y cols., 1995)
- 5.- Anticuerpos utilizados:
  - a.- Anticuerpo de oveja frente a melatonina, G/S/704-8483 (Stockgrand Ltd.).
  - b.- Anticuerpo frente a histonas (proporcionado por el Dr. Carlos Alonso, Centro Biología Molecular. Madrid.)

6.- Inmunoconjugados utilizados:

a.- Anticuerpo anti-IgG oveja marcado con peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals).

7.- Sustrato de peroxidasa: 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) produce un producto insoluble, apropiado para utilizarlo como sustrato en las técnicas de inmunotransferencia, ELISA, etc., (Rose, 1986). Preparar 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 conteniendo 0,5 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorídrica y 1:5.000 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 2.- Procedimiento

- 1.- Toda la manipulación debe realizarse con guantes.
- 2.- Todas las tiras se incubaron con la solución de bloqueo durante 3 h en agitación y a temperatura ambiente.
- 3.- Después de efectuar varios lavados, se incubaron unas tiras con los diferentes antígenos a una concentración 10  $\mu$ M en PBST, durante 1 h en agitación y a 4°C.
- 4.- Se lavaron las tiras tres veces durante 5 min con PBST.
- 5.- Se incubó con los distintos anticuerpos descritos en los reactivos a una dilución de 1:800, durante 2 h en agitación a temperatura ambiente.
- 6.- Se lavaron las tiras tres veces durante 5 min con PBST.
- 7.- Se incubó con el inmunoconjugado a una dilución 1:800, durante 2 h en agitación a temperatura ambiente.
- 8.- Se lavó como en el paso 3.
- 9.- Se incubó con el sustrato de 15 a 30 min a 37°C. Tras ello, se extrajeron las tiras de papel de la mezcla de incubación, se lavaron con agua y se secaron.

## 3.- Determinación de los pesos moleculares

La movilidad de las proteínas durante la electroforesis está en función de los logaritmos de sus pesos moleculares. En cada desarrollo electroforético se introdujo un patrón de pesos moleculares ("Calibration kits for molecular weight determination using electrophoresis". Pharmacia Biotech), de igual forma se transfirió a la nitrocelulosa determinando la distancia relativa recorrida por cada proteína ( $R_f$ ). Este valor se representó frente al logaritmo del peso



molecular de las proteínas, obteniéndose de esta forma una recta patrón. A continuación se midió la distancia relativa recorrida para cada banda proteica del antígeno, pudiendo determinar el peso molecular tomando como referencia la recta patrón.

## **B.- Ensayo Inmuno-oro**

### **1.- Oro coloidal**

Fue introducido por Faulk y Taylor en 1971 y es un excelente trazados inmunocitoquímico para microscopía electrónica de transmisión (Haven y cols., 1984). Las partículas de oro se obtienen por reducción química del cloruro de oro en solución (ácido cloroaúrico); por variaciones del método de reducción se pueden obtener partículas homogéneas de diverso tamaños (entre 5 y 40 nm). Las partículas de oro obtenidas forman un coloide inestable que tiene gran capacidad para adsorber proteínas en su superficie que estabilizan la solución coloidal. La adsorción de proteínas por parte del oro coloidal esta influenciada por diversos factores como el tamaño de las partículas, la concentración de iones (que debe mantenerse lo más baja posible), el pH y la concentración de proteína. El pH es uno de los factores más importantes y debe ajustarse a un nivel ligeramente básico respecto al de la proteína que se desee acoplar. La solución de oro coloidal acoplada a la proteína (generalmente anticuerpos, lectina o proteína A), presenta cierta inestabilidad y tiene tendencia a producir agregados que entorpecen su uso inmunoquímico o histoquímico; por ello se recomienda adicionar agentes estabilizantes como el polietilenglicol de pm 20 kDa.

### **2.- Preparación de oro coloidal de 10-20 nm**

Según Knetch y colaboradores (1986 y 1991):

- 1.- Se prepararon 100 ml de una solución de ácido tetracloroaúrico (Sigma Chemicals Co) al 0,01%.
- 2).- La solución se calentó hasta ebullición, en un matraz Erlemeyer, agitando continuamente.
- 3).- Se añadieron rápidamente 3-6 ml, (el tamaño de la partícula será menor cuanto mayor sea la cantidad añadida) de citrato trisódico al 1% en solución acuosa. La solución adquirirá un color azul que virará a rojo, tras unos cinco minutos, indicando el fin del proceso de

reducción.

4.- Se dejó enfriar la solución en un baño de agua-hielo.

5.- Se ajustó el pH a 9,0 (emplear tiras de papel indicador), añadiendo al resto de la solución de oro coloidal unas gotas de 0.2 M  $K_2CO_3$  o 0.1 N HCl. Se conserva a 4°C.

Para la determinación del pH óptimo en la preparación del oro coloidal hay que tener en cuenta el punto isoelectrico de la proteína utilizada. La determinación del pI del anticuerpo usado se llevó a cabo mediante IEF e inmunotransferencia. El pI del anticuerpo frente a melatonina varía entre 7 y 9

### 3.- Preparación del complejo anticuerpo melatonina-oro coloidal

1.- Se calculó la cantidad de anticuerpo necesario para estabilizar el coloide según la tabla X

**Tabla X:** volúmenes en  $\mu$ l

Nº Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Sol. oro coloidal	500	500	500	500	500	500	500
H <sub>2</sub> O	-	10	20	30	40	45	50
Anticuerpo frente a melatonina	50	40	30	20	10	5	-
<b>Agitar y esperar 5 min</b>							
NaCl 10%	500	500	500	500	500	500	500
<b>Agitar y esperar 10 min</b>							
Color:	?	?	?	?	?	?	Azul

La estabilidad del coloide se mantiene por repulsión electrostática entre las partículas  $AuCl_2$  y la adición de electrolitos, como el NaCl, produce la floculación de las mismas en agregados. Esta floculación conlleva un cambio de color (de rojo a azul), que puede evitarse estabilizando el coloide por adsorción de sustancias hidrofóbicas como proteínas, al oro coloidal. Un cambio de color en la solución de oro coloidal de rojo a azul indica la existencia de floculación. Para determinar el cambio de color (caso de que no fuera visible a simple vista),

se puede leer la absorción a 520 nm en un espectrofotómetro. La floculación produce un descenso en ese valor, y un incremento en la absorción a las longitudes de ondas más largas.

2.- Se calculó el volumen de anticuerpo necesario a partir del volumen menor que estabiliza al oro coloidal en el ensayo descrito, (tubo anterior al primer tubo que da color azul, excluyendo lógicamente al número 7), e incrementarla en un 10% para compensar pequeños errores y garantizar así la total estabilización del complejo.

3.- Se tomó 1 ml de solución de oro coloidal en un tubo de ensayo, y se añade el volumen de anticuerpo calculado en 2. Se esperó 5 min a 20° C.

4.- Se verifica que se ha producido la estabilización del oro coloidal mediante el ensayo descrito en 1.

5.- Se añadieron 100 µl de solución al 1% de polietilenglicol 20.000, se agita durante 2 min, verificando que si se ha producido la estabilización del oro coloidal, añadiendo ClNa.

6.- Se centrifugó la preparación a 12.000 rpm durante 40 min a 4° C. La centrifugación produce un precipitado de color rojo del complejo de anticuerpo-oro coloidal en el fondo del tubo, y otro precipitado más oscuro adherido a la pared del tubo que corresponde a agregados de partículas de oro no estabilizadas.

7.- Se eliminó con cuidado el sobrenadante, que contenía anticuerpo libre, y se resuspendió el concentrado del fondo del tubo en PBS, 0,15 M a pH7,4, conteniendo 0.1% polietilenglicol-20.000, 20% de glicerol como estabilizante y 20 mM de azida sódica como preservante, en un volumen correspondiente a 25 veces más concentrado, respecto al volumen inicial de la solución del oro coloidal, el inmunoconjugado se almacenó a 4° C hasta su utilización. La preparación es estable durante varios meses.

### **C.- Inmunomarcado directo con oro coloidal (método post-inclusión)**

Las técnicas inmunocitoquímicas realizadas en la fase de postinclusión, implicó llevar a cabo la reacción inmune sobre secciones de núcleos aislados, siguiendo un procedimiento análogo al descrito en la pag , y omitiendo algunos pasos para asegurar la adecuada antigenicidad y mejor visualización del marcaje.

Una alícuota de los núcleos purificados por gradiente de sacarosa se fijó con glutaraldehído al 0.5% en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7,4 durante 2 h 4° C;. No se llevó a

cabo la postfijación con tetróxido de osmio y ferrocianuro potásico, ni tampoco la tinción en bloque con acetato de uranilo. Una vez incluida la muestra en la resina Epon-812, se realizaron cortes ultrafinos de 50 nm de espesor y se montaron sobre rejillas de níquel de 300 de malla y no de cobre, ya que las prolongadas incubaciones oxidarían las rejillas y producirían precipitados densos a los electrones. Posteriormente las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo al 2 % en etanol al 50 % durante 2 min.

Una vez obtenidas las rejillas con los cortes, se diseñaron varios protocolos de incubación para determinar qué concentración de anticuerpo y tiempo de incubación fueron los más adecuados para la visualización del marcaje.

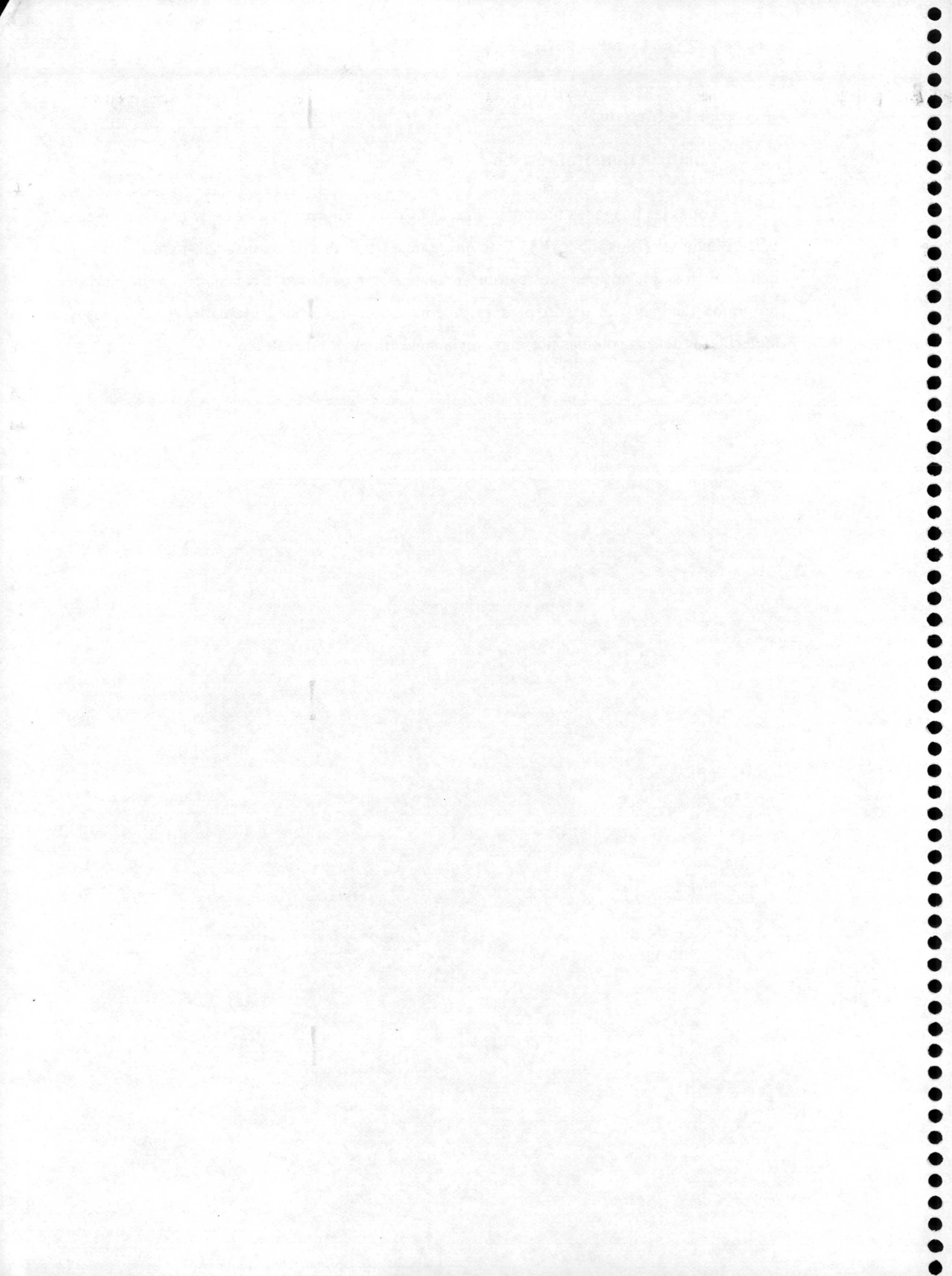
En primer lugar, se bloquearon los puntos presentes en la muestra que determinan la aparición de marcaje inespecífico. Para ello, las rejillas permanecieron durante 5 h a 4° C en contacto con una solución de leche en polvo al 0.4% (p/v) en agua ultrapura. Las rejillas se colocaron con la cara donde se encuentran los cortes hacia abajo, flotando sobre una pequeña gota de la solución de bloqueo. Una vez concluido este tiempo, las rejillas se lavaron 3 veces durante 5 min cada vez, con agua ultrapura. Posteriormente se realizó la incubación con distintas diluciones del complejo anticuerpo melatonina oro coloidal, a partir de la disolución óptima recomendada en el ensayo inmuno oro descrito anteriormente. Las rejillas marcadas y lavadas con agua ultrapura, se contrastaron con acetato de uranilo al 2% en etanol de 50% durante 2 minutos. La observación y el fotografiado de los cortes se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión 10C de Zeiss a 100kV.

Para el buen desarrollo del procedimiento se han de considerar los siguientes aspectos generales:

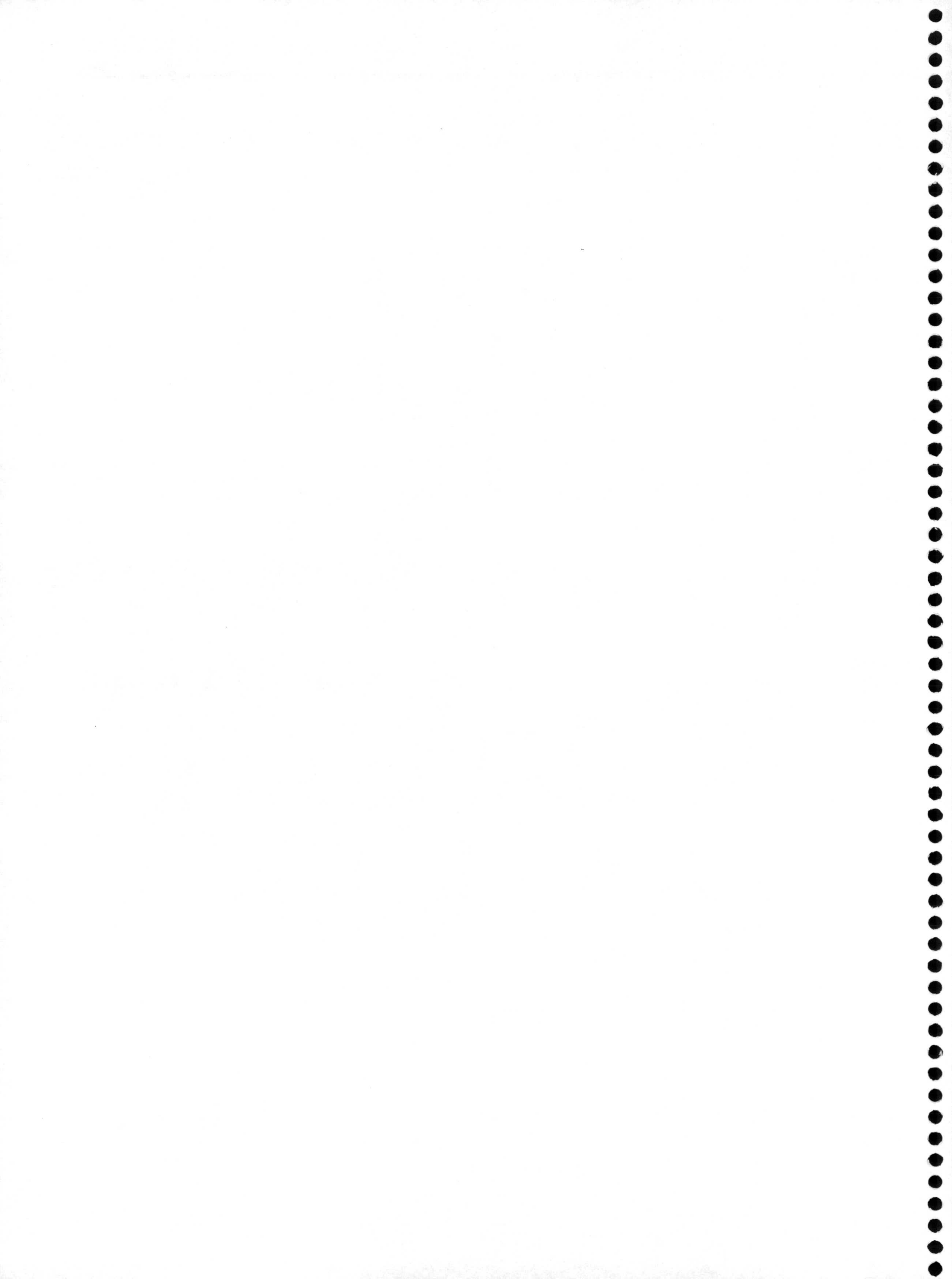
- 1.- hay que filtrar todos los tampones y soluciones de lavado con filtros de 0,45 µm de poro.
- 2.- es conveniente realizar los lavados acoplado una jeringuilla a un sistema de microfiltro, sujetando las rejillas con unas pinzas y dejarlas caer sobre la soluciones.
- 3.- Debe evitarse que las rejillas se sequen durante el proceso de inmunotinción, especialmente en la incubación con los diferentes anticuerpos.

#### **XIV.- Análisis densitométrico**

Todas las imágenes fueron analizadas mediante el programa de software QuantiScan para Windows (Biosoft. U.K). Este programa tiene una funcionalidad parecida a los densitómetros, que nos permite determinar con una gran exactitud la cantidad de proteína. Este programa también fue usado para la determinación de forma automática de los pesos moleculares de las proteínas presentes en la muestra objeto de estudio.



## 4.- RESULTADOS





## I.- Purificación de núcleos de hepatocitos de rata

### A.- Estudio por microscopía electrónica de transmisión

En la Figura 10 se visualizan los **núcleos purificados** de hepatocitos de rata, si bien se observan algunos restos de mitocondrias y retículo endoplasmático

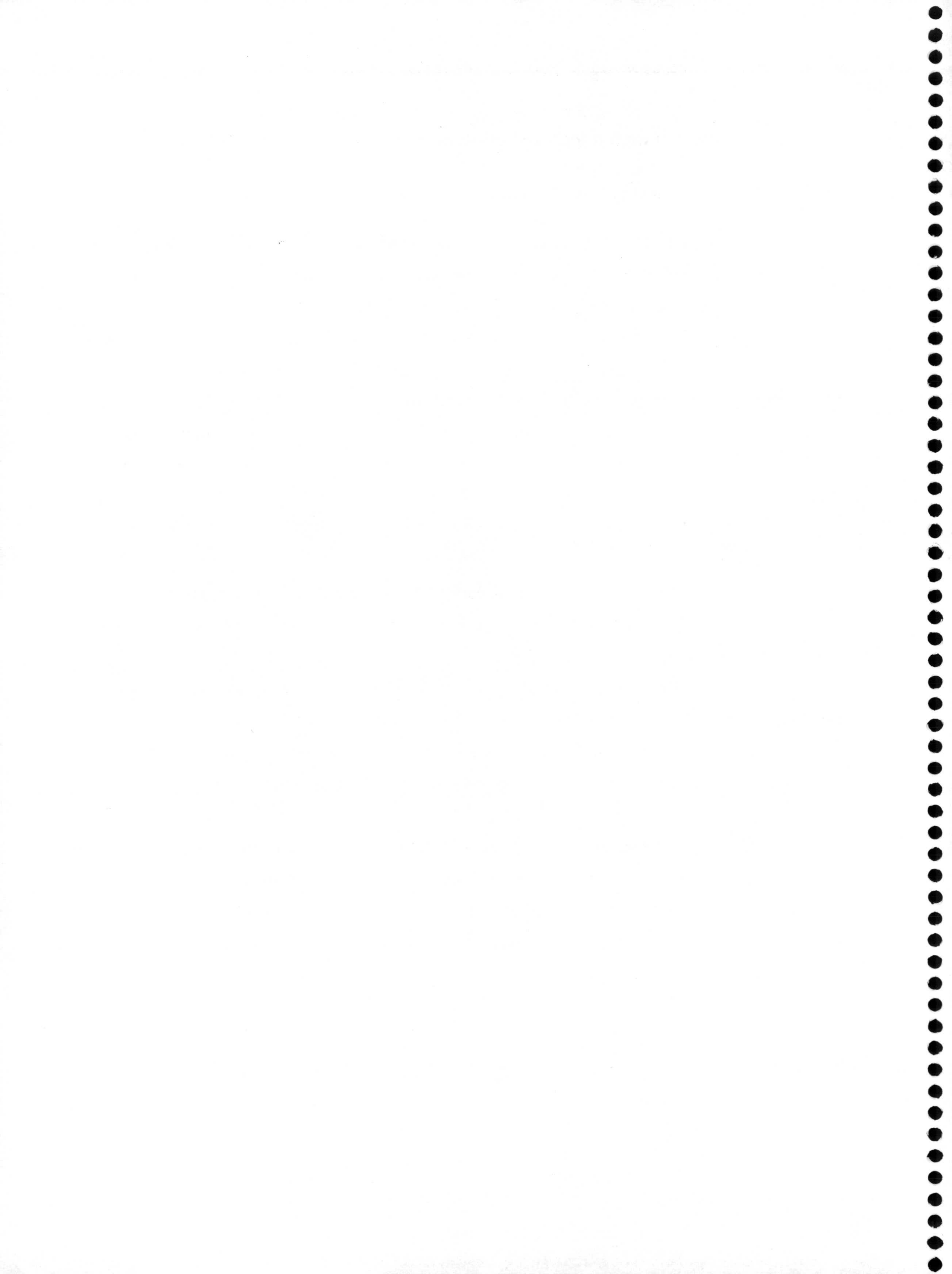
Los núcleos son, en general, esféricos ligeramente ovalados y rodeados por una doble membrana (observándose en algunos la envoltura nuclear parcialmente rota). Su tamaño oscila de 4 a 8  $\mu\text{m}$  y con uno ó más nucléolos (Figura 11), de aspecto esponjiforme que están compuestos por materiales de baja y alta densidad, suspendidos libremente dentro del nucleoplasma (zona clara). Se observa en la periferia una gran cantidad de cromatina (zonas más densas). De estos resultados se desprende el alto grado de pureza de los núcleos aislados.

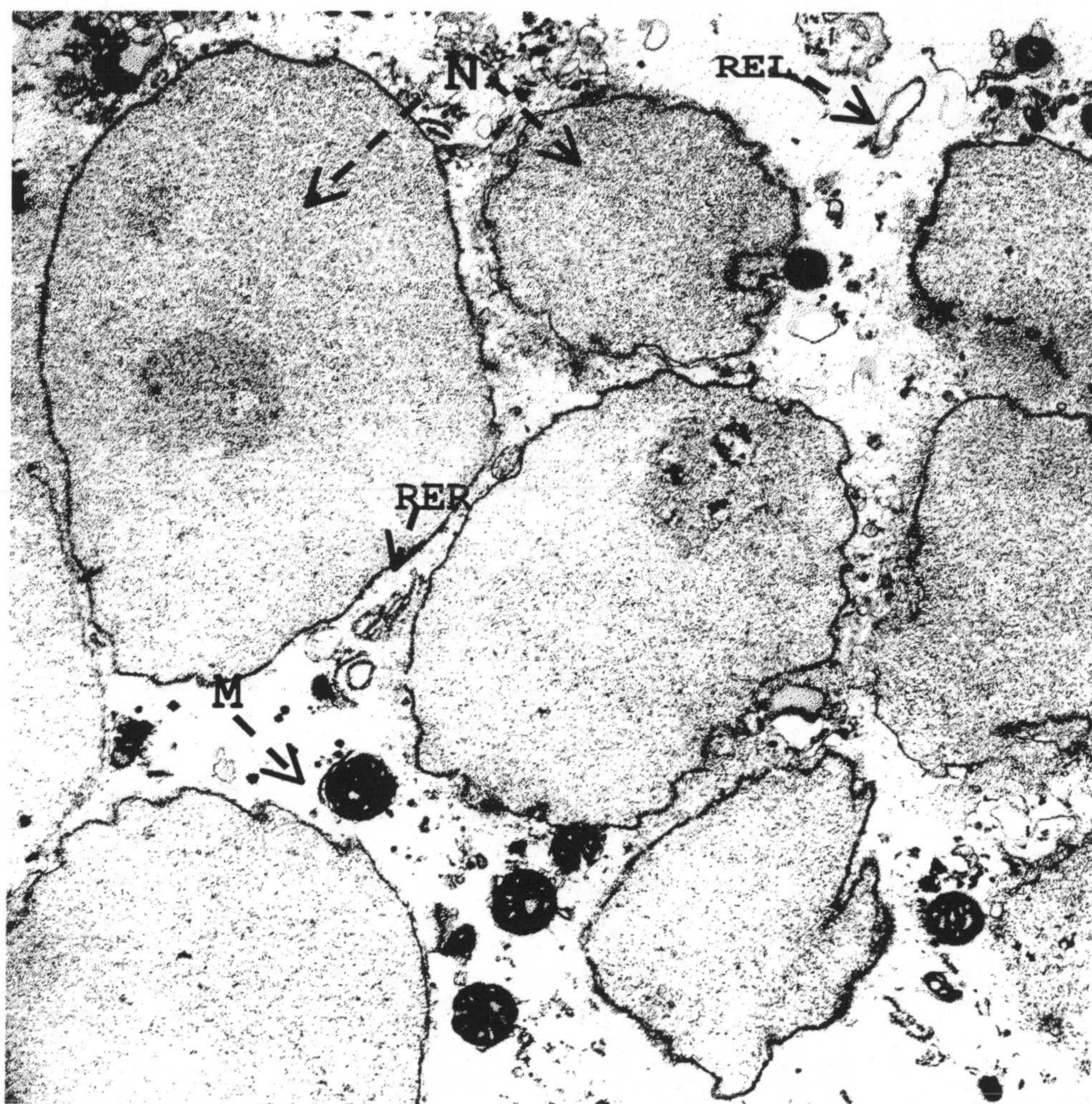
### B.- Estudio por citometría de flujo

Al objeto de comprobar la integridad y pureza de los **núcleos purificados** de hepatocitos de rata, éstos se tiñeron con yoduro de propidio (IP) para ser estudiados por citometría de flujo.

Como observamos en la Figura 12A, en el eje de abcisas (FSC) donde se representa el tamaño medio de las partículas, la gráfica corresponde a las partículas entre 2 y 8  $\mu\text{m}$  (que coincide con el tamaño de los núcleos medidos por microscopía electrónica). El porcentaje medio de partículas entre 2 y 8  $\mu\text{m}$  fue del  $73,35 \pm 2,56 \%$ , del total de partículas medidas. Este porcentaje fue extrapolado al canal FL2 que representa el marcaje de partículas con IP (Fig 12B), donde existe una zona a partir de 200, que corresponde a partículas que fluorescen positivamente a IP, es decir, estructuras que contienen ADN (núcleos), cuyo porcentaje medio fue del  $66,8 \pm 3,20 \%$ , del total extrapolado.

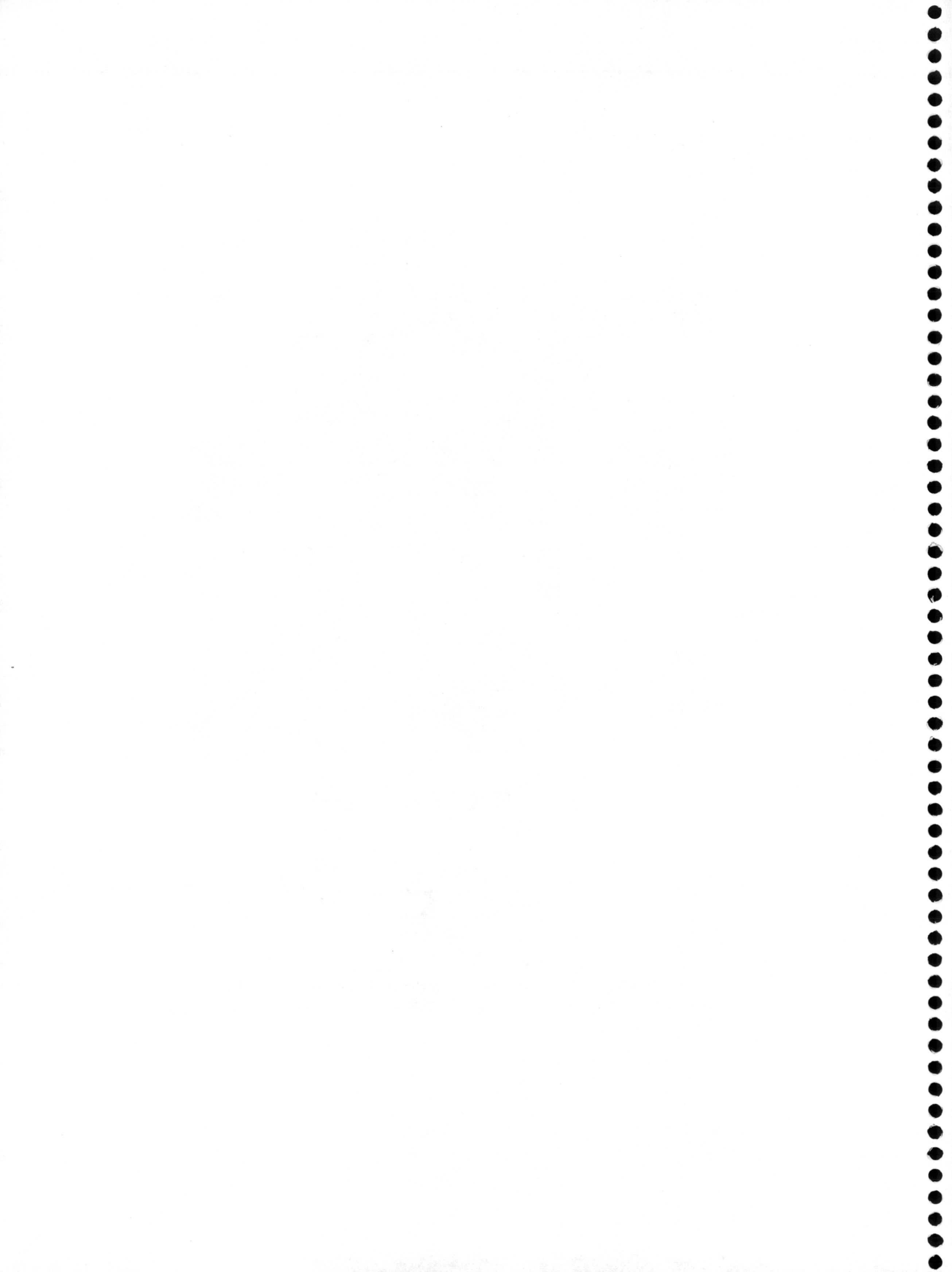
Como consecuencia el porcentaje medio real de partículas medidas correspondientes a núcleos fue del  $45,55 \pm 6,67 \%$ .

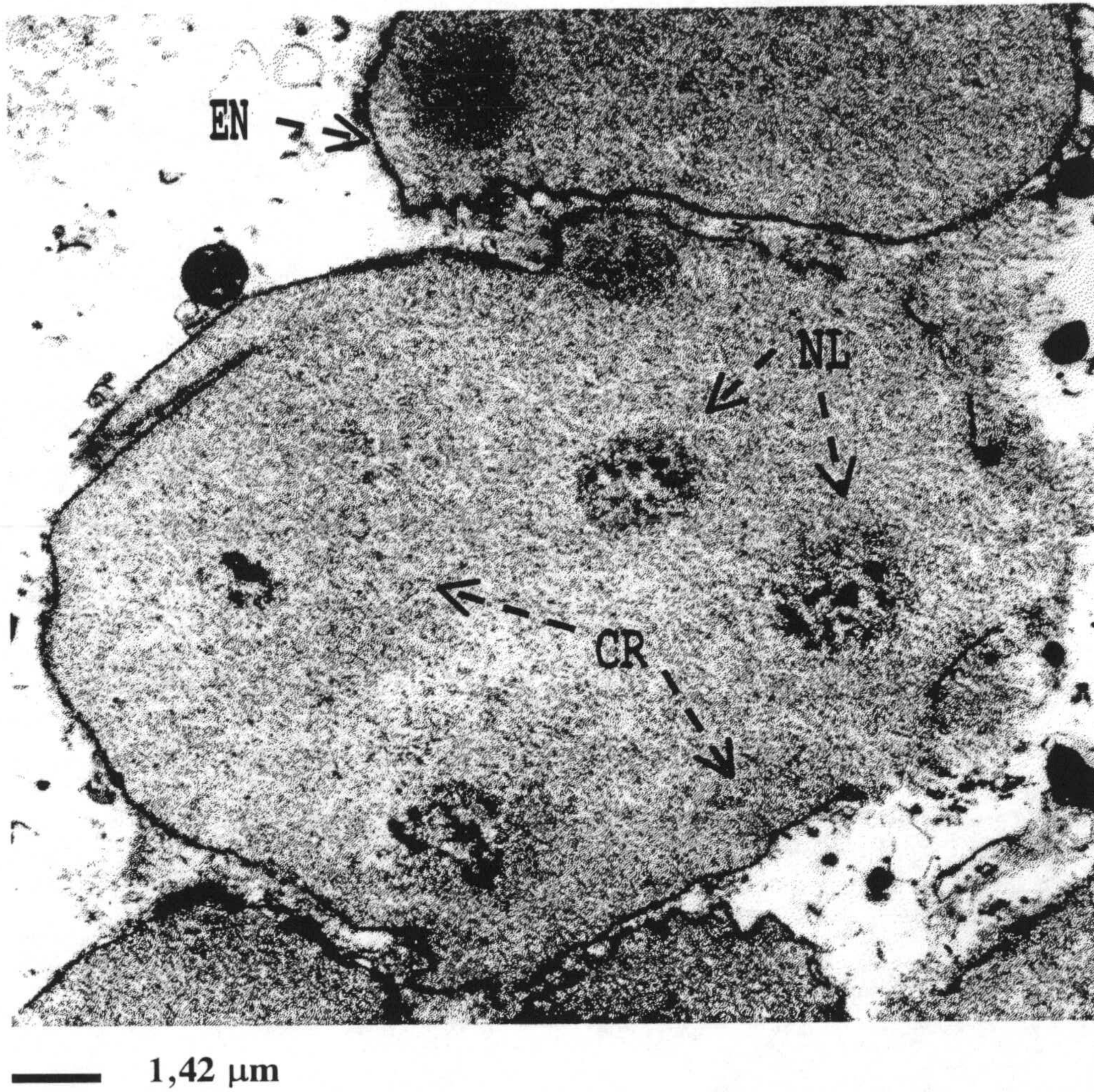




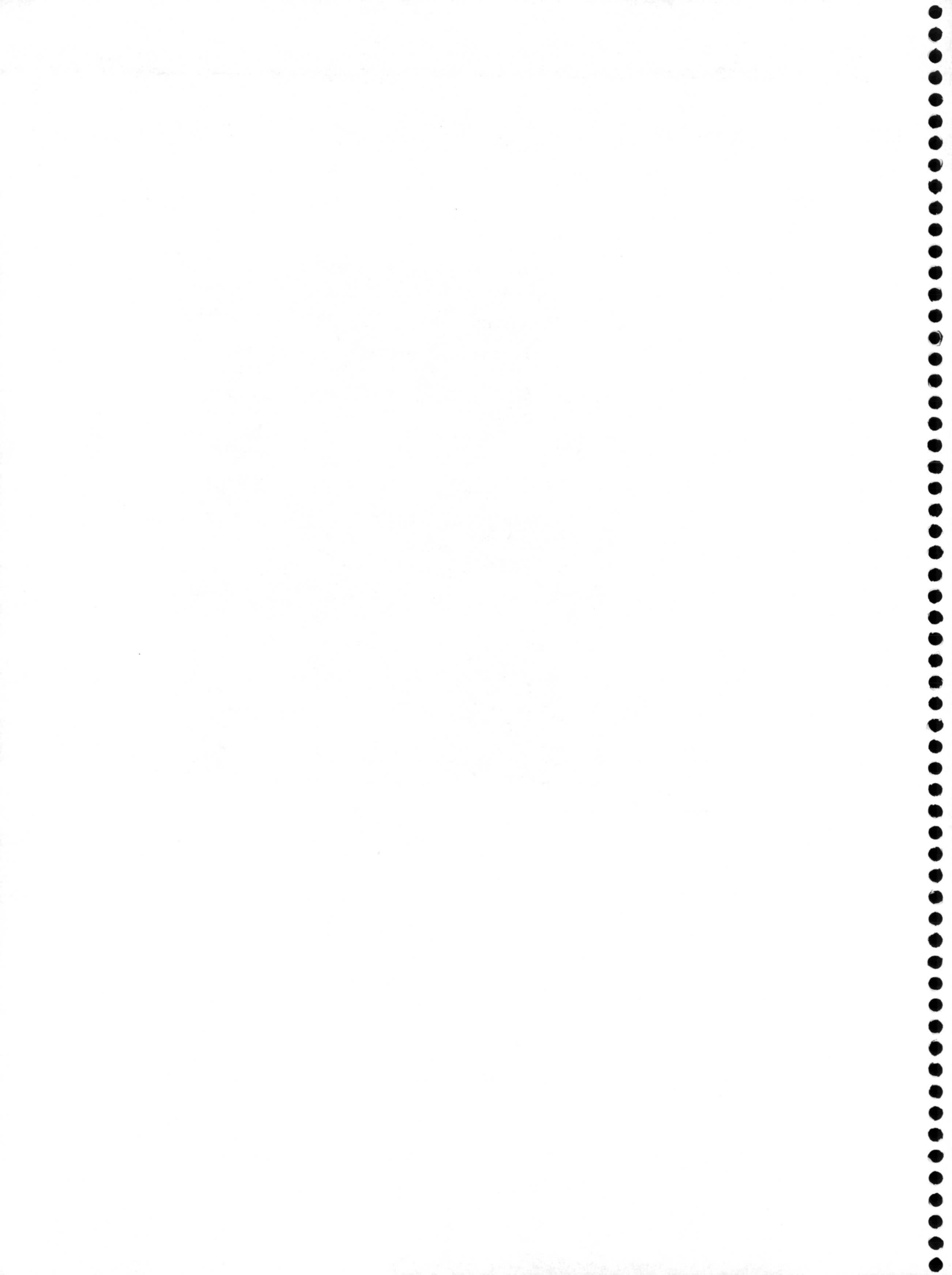
— 1,66  $\mu\text{m}$

**Figura 10:** *Micrografía electrónica en la que se observan núcleos (N), ligeramente contaminados por algunas mitocondrias (M), retículo endoplasmático rugoso (RER) y liso (REL).*

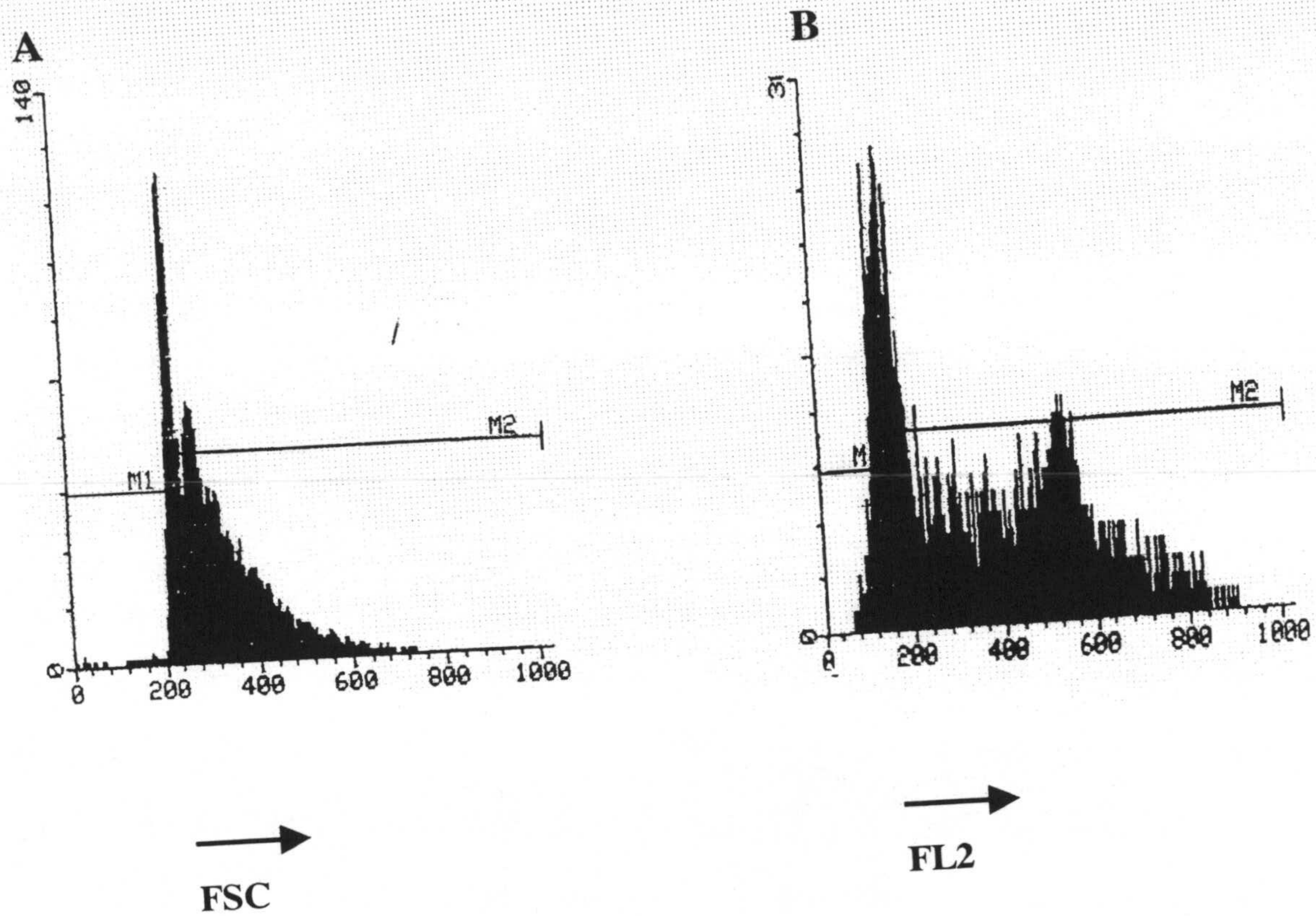




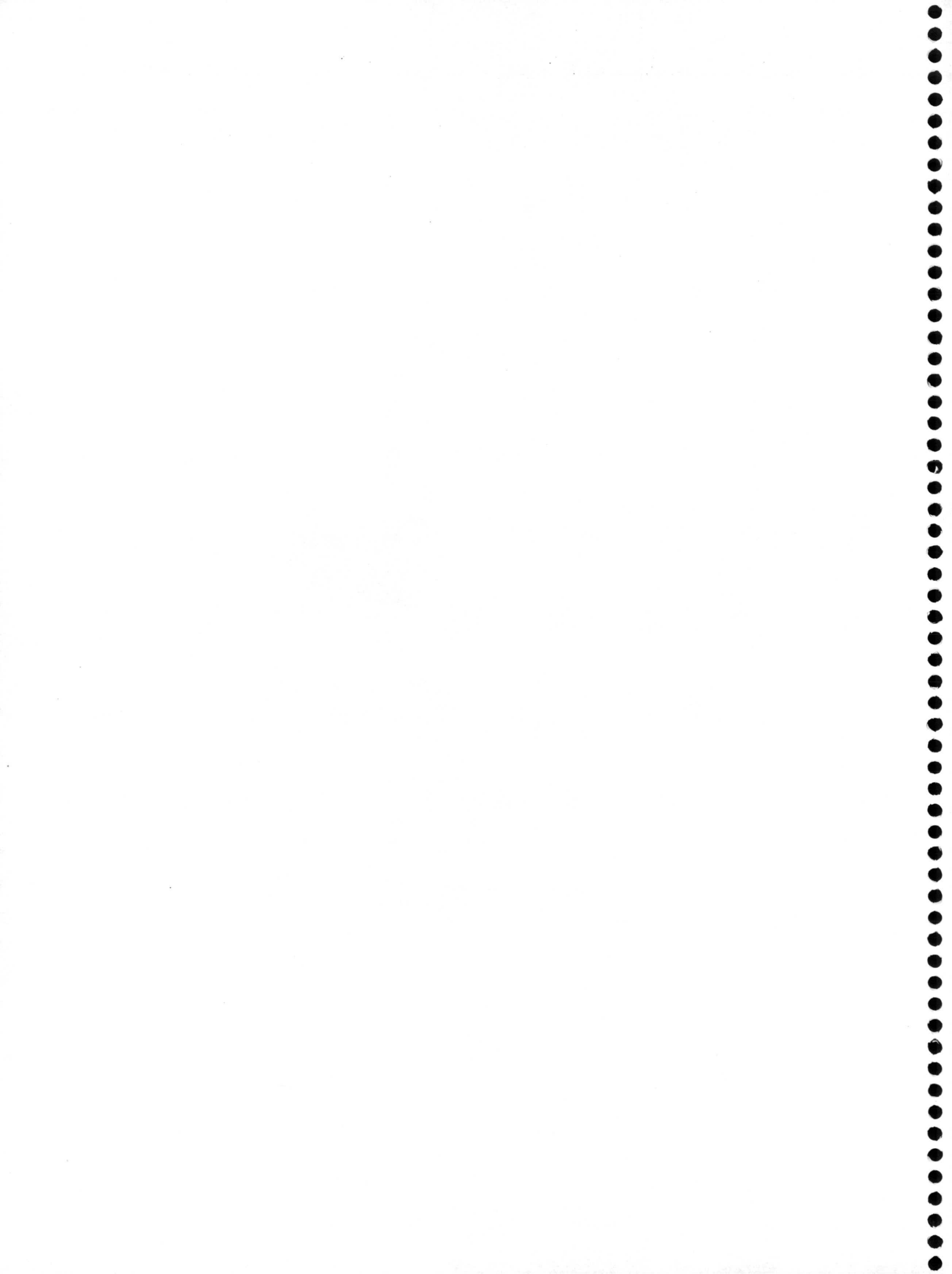
*Figura 11: Micrografía electrónica en la que se observa un núcleo con varios nucléolos (NL), envoltura nuclear (EN) y cromatina (CR).*



## Resultados



*Figura 12: Histograma de distribución de tamaño (eje FSC) medido por citometría de flujo de núcleos de ratas normales. En la figura A la zona marcada ( $M_2$ ) correspondiente a partículas cuyo tamaño medio oscila entre  $2-8\mu\text{m}$ , se extrapola al canal FL2 (ioduro de propidio) en la figura B, donde la zona marcada ( $M_2$ ) corresponde a partículas entre  $2-8\mu\text{m}$  teñidas con ioduro de propidio.*





## II.- Estudio de la presencia de melatonina en núcleos de hepatocitos de rata

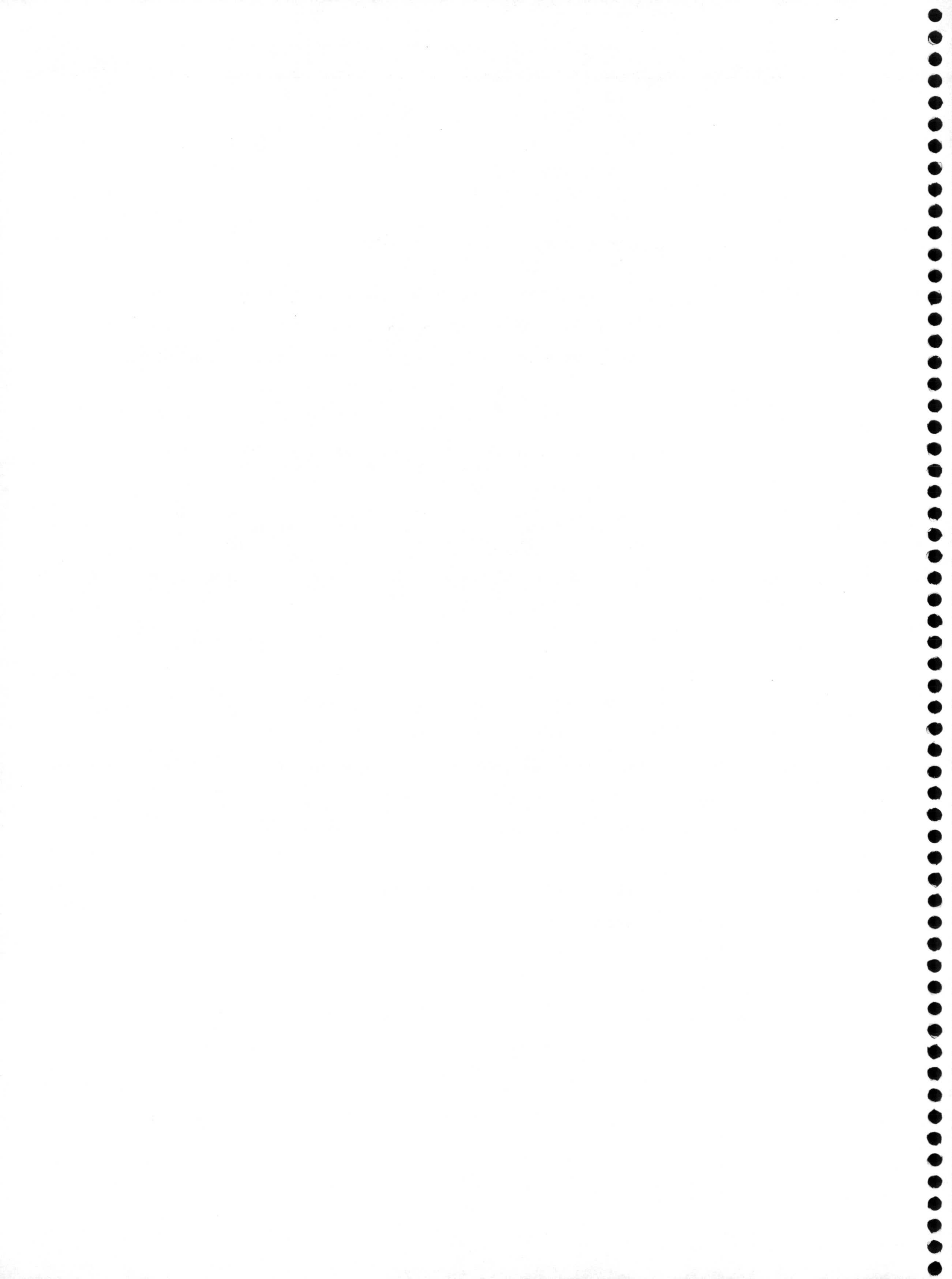
### A.- Estudio por inmunocitoquímica (con oro coloidal)

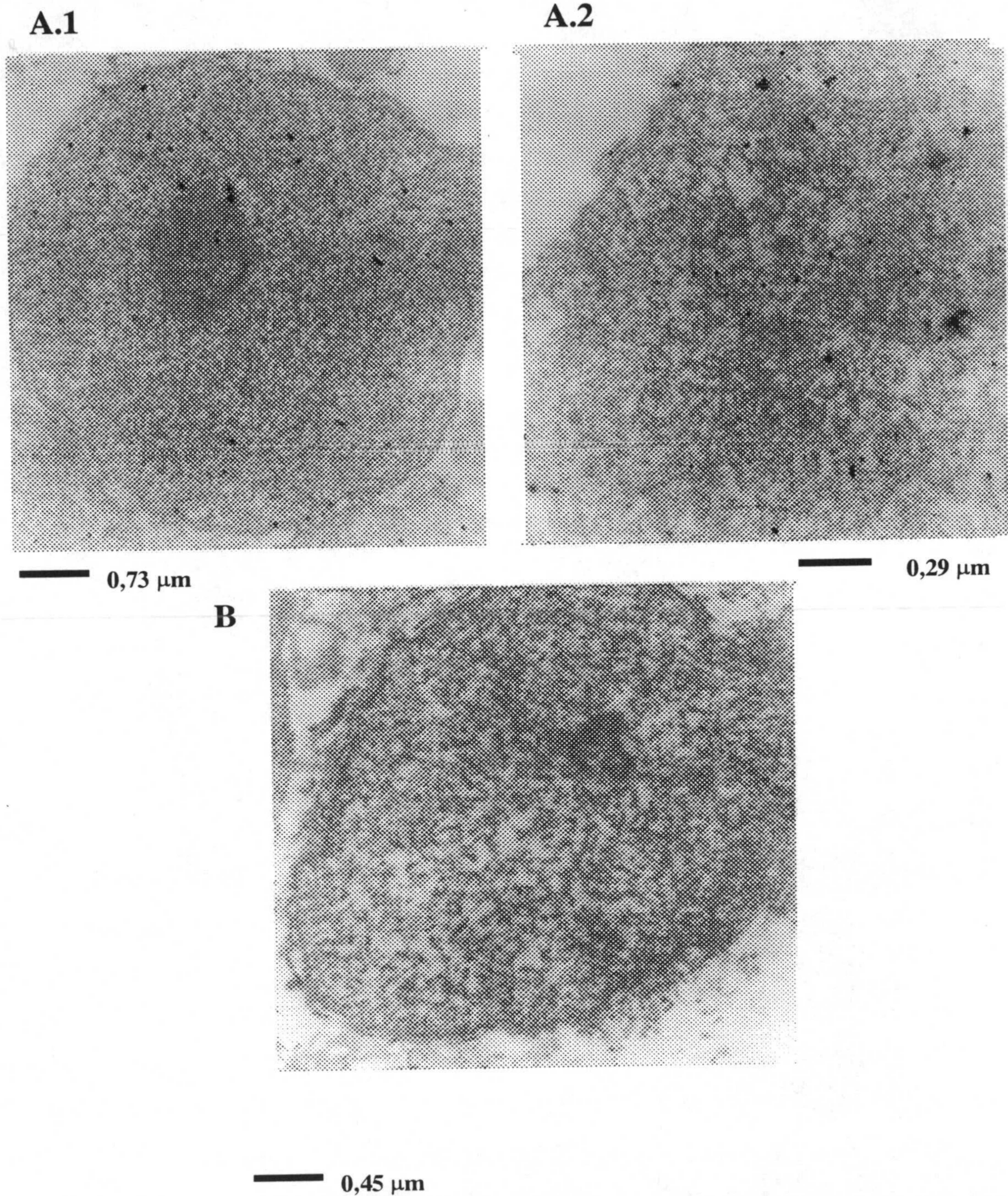
En la Figura 13 se observa un marcaje positivo frente al complejo conjugado (obtenido según se describe en la página) en núcleos de hepatocitos de ratas normales, que demuestra la presencia de melatonina en el núcleo. Sin embargo dicho marcaje desaparece prácticamente en núcleos de ratas pinealectomizadas 7 días antes de su sacrificio (Figura. 13B).

La dilución inicial de anticuerpo frente a melatonina (G/S/704-8483) usada en la formación del complejo conjugado es de 1:350, la cual, se sometió a las diluciones siguientes: 1:3.500, 1:7.000, 1:14.000 y 1:21.000, en solución de bloqueo. Cada una de las diluciones se incubó a diferentes tiempos de incubación (1, 1.5 y 2 h) con las rejillas de las distintas muestras de núcleos purificados. La relación dilución / tiempo que mejor resultado dio fue la de 1:14.000 durante 1.5 h a temperatura ambiente.

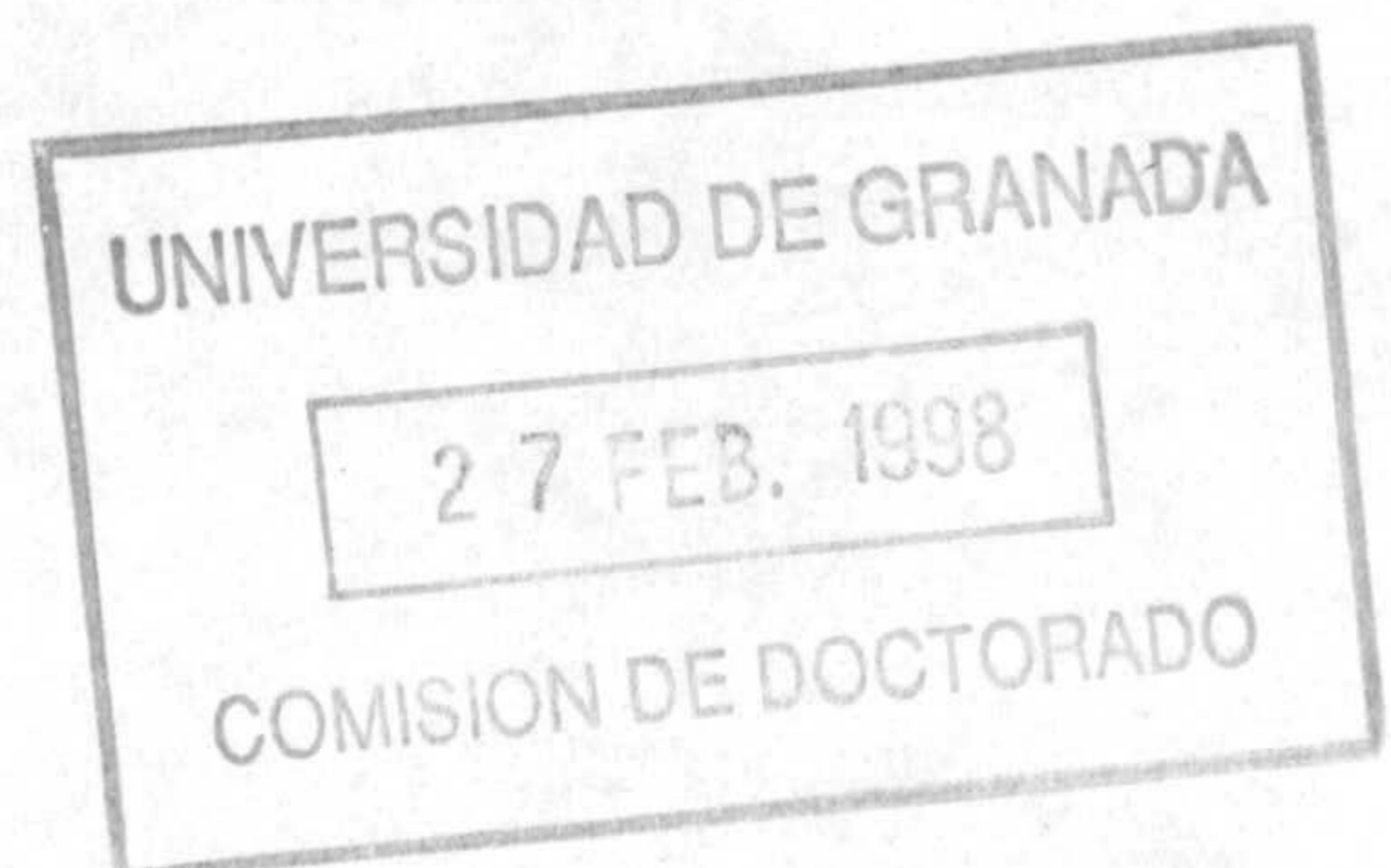
A la dilución 1:14.000 durante 1.5 h los núcleos de hepatocitos de ratas normales presentan un marcaje positivo (denso a los electrones) a microscopía electrónica. Este marcaje se distribuye uniformemente en todo el núcleo (Figura 13). En la Figura 14 se observa como disminuyendo la concentración del anticuerpo frente a melatonina (dilución 1:21.000), éstas áreas marcadas se localizan principalmente asociadas a la membrana interna nuclear. Sin embargo si aumentamos la concentración del anticuerpo (dilución 1:3.500,) el marcaje se hace mucho más intenso y con una distribución más amplia en el interior del núcleo (Figura. 15).

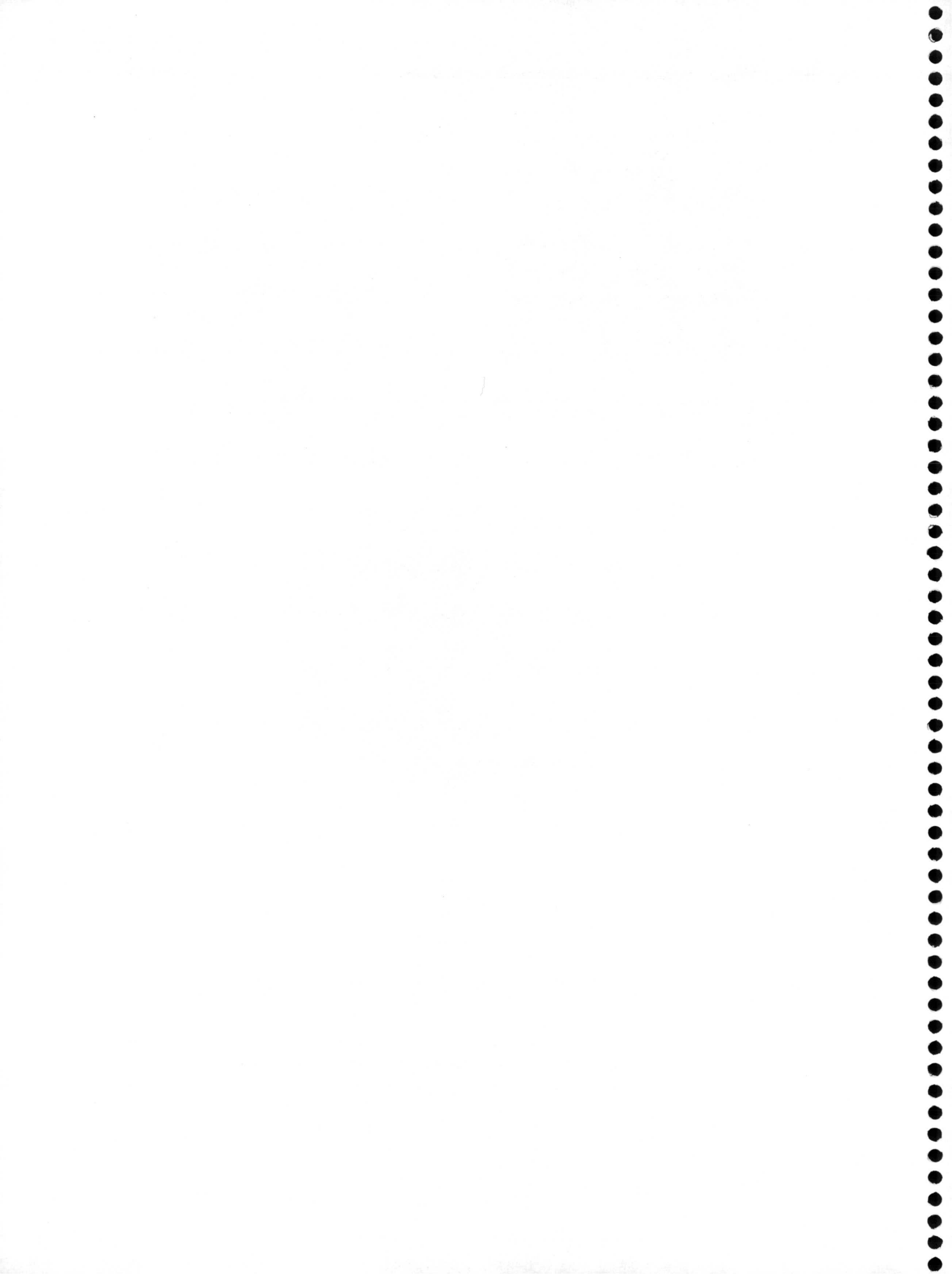
Dichos resultados se lograron tras bloquear los grupos más inespecíficos con leche en polvo al 0.4%. Este procedimiento fue el óptimo para que los cortes ultrafinos se visualizaran con claridad a microscopía electrónica y con el menor ruido de fondo posible. Asimismo tuvimos que eliminar el uso de albúmina de suero bovino (no sólo en las soluciones bloqueadoras, sino también en las soluciones utilizadas para diluir el complejo conjugado), al reaccionar ésta con el anticuerpo frente a melatonina, como se muestran en los resultados referentes a "Western blotting".

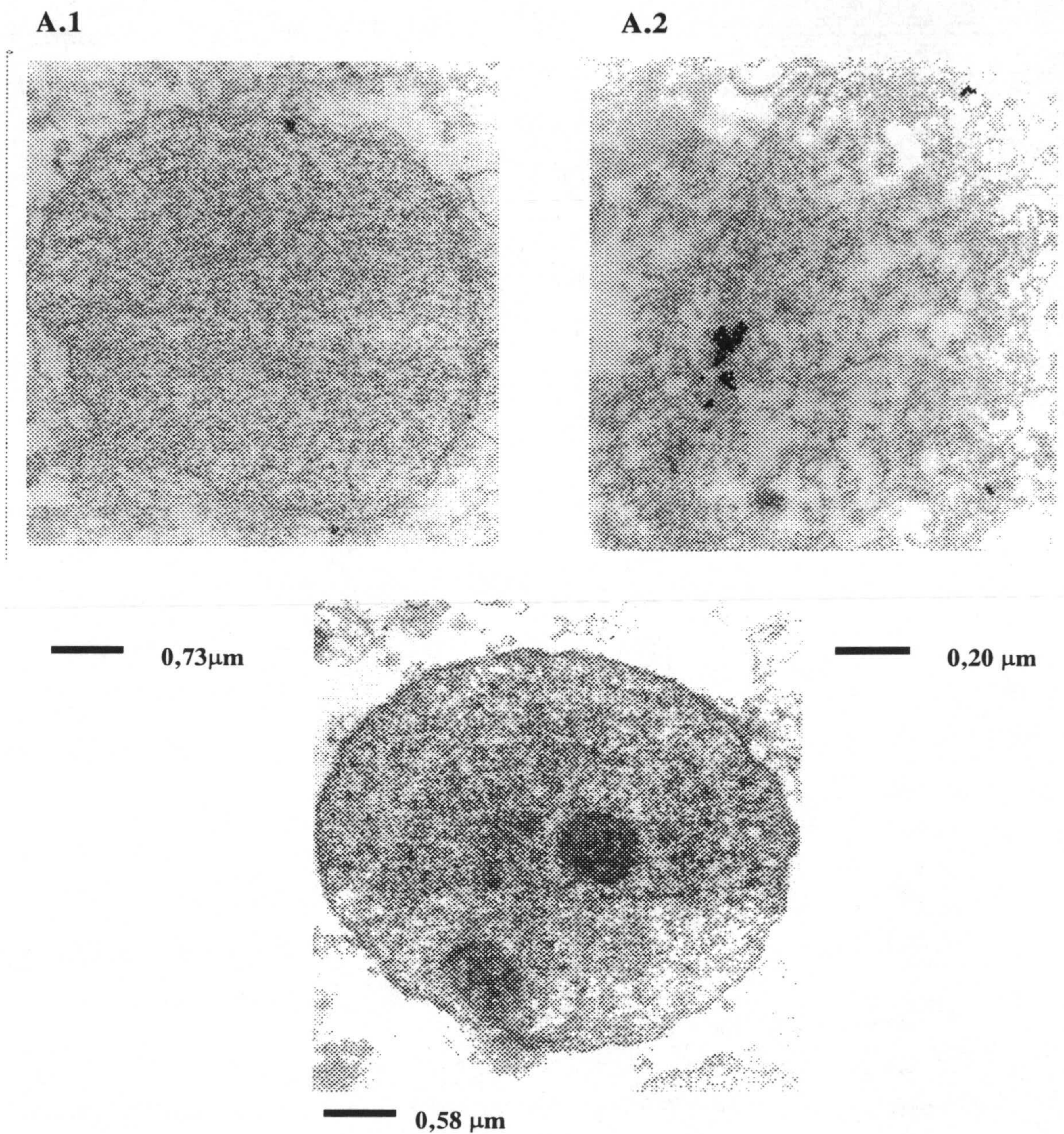




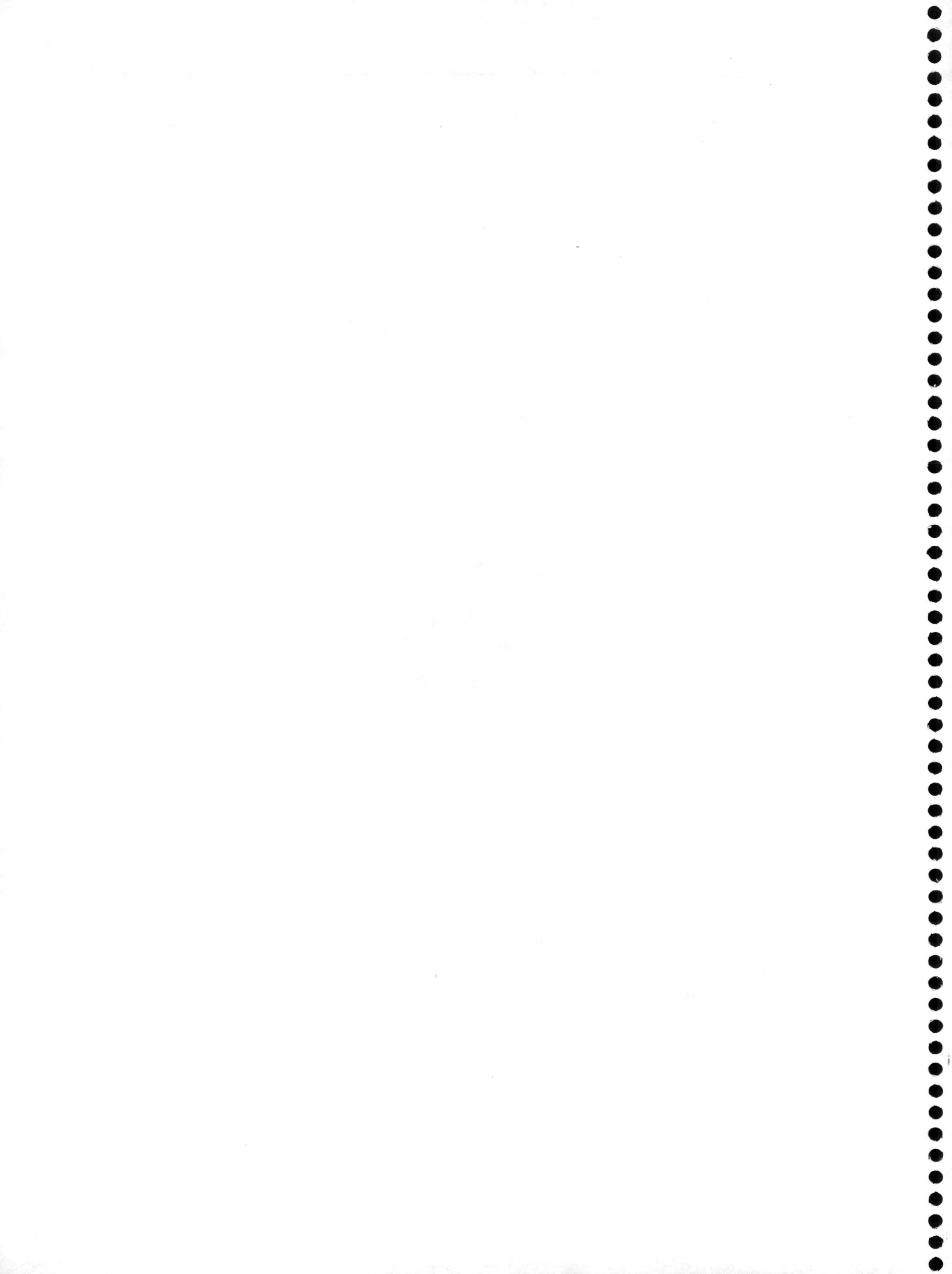
**Figura 13:** Micrografías electrónicas tratada por inmunocitoquímica de secciones ultrafinas de:  
A.- Núcleos de hepatocitos de rata tratados con una dilución 1:40 del complejo conjugado (anticuerpo frente a melatonina marcado con oro coloidal). A.1) x13750. A.2) x34375.  
B.- Núcleos de hepatocitos de rata pinealectomizada tratados con una dilución 1:40 del complejo conjugado (anticuerpo frente a melatonina marcado con oro coloidal). x22000

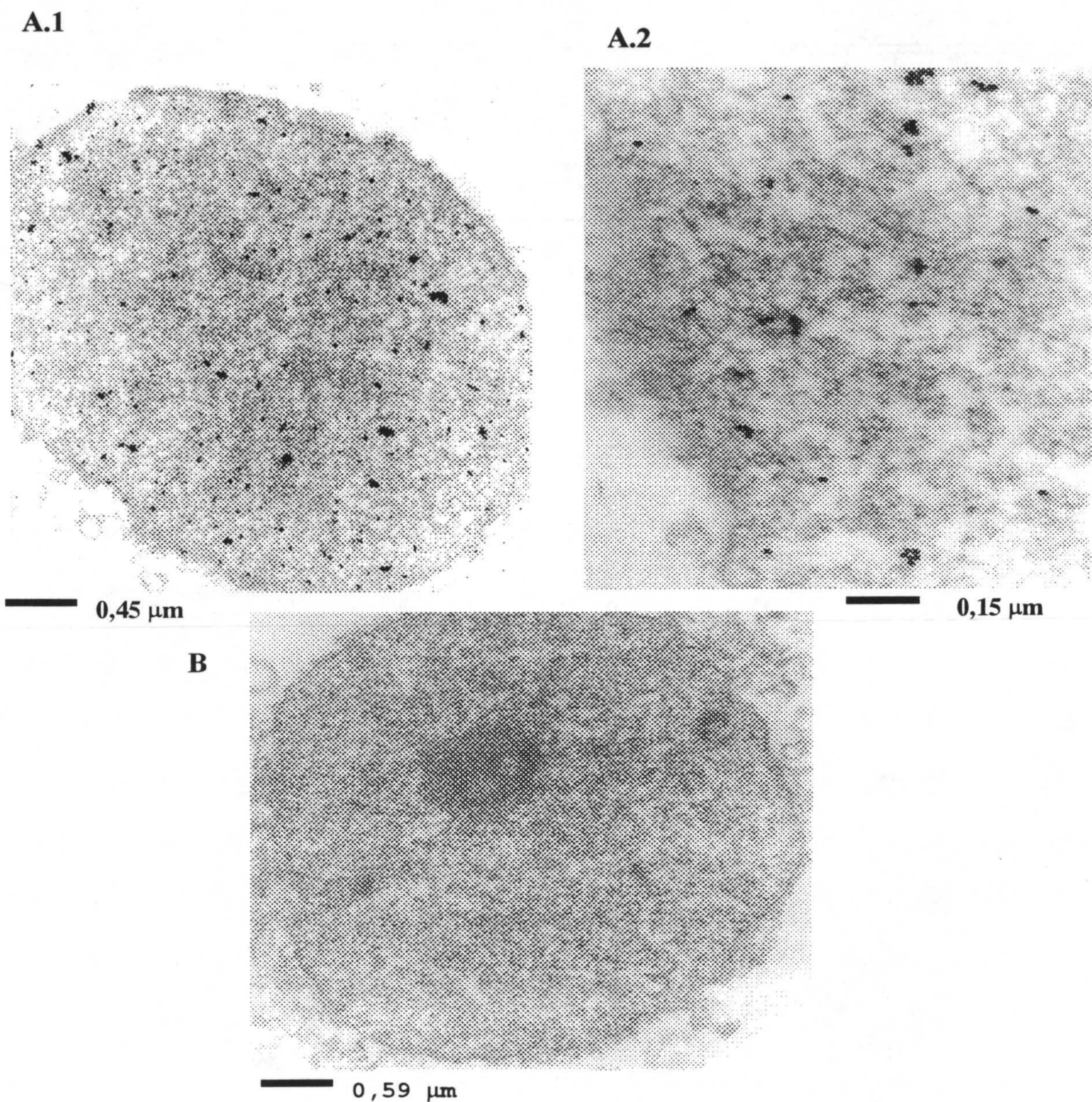




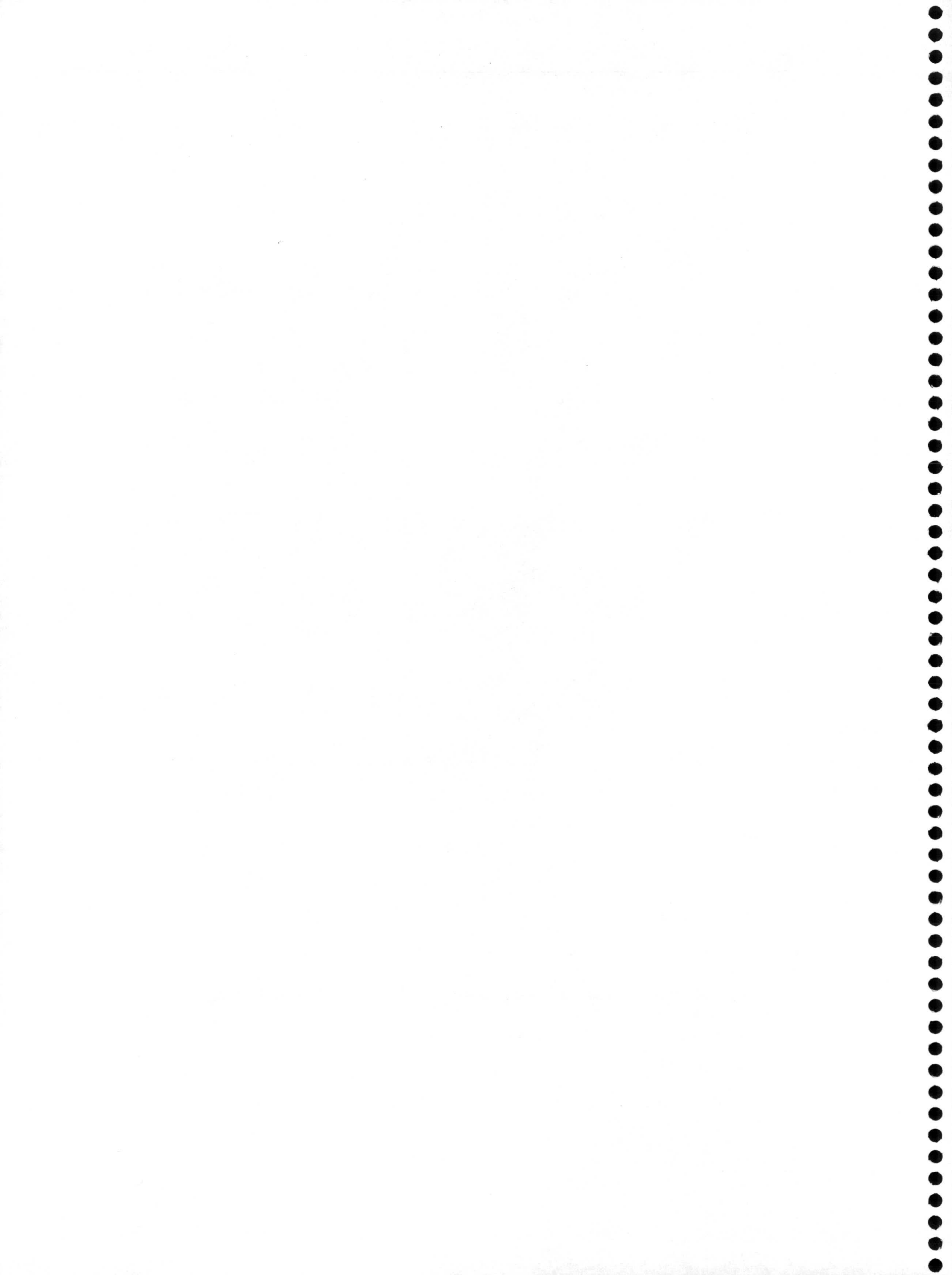


**Figura 14:** Micrografías electrónicas tratada por inmunocitoquímica de secciones ultrafinas de:  
**A.-** Núcleos de hepatocitos de rata tratados con una dilución 1:60 del complejo conjugado (anticuerpo frente a melatonina marcado con oro coloidal). A.1) x13750. A.2) x50000.  
**B.-** Núcleos de hepatocitos de rata pinealectomizada tratados con una dilución 1:60 del complejo conjugado (anticuerpo frente a melatonina marcado con oro coloidal). X17100.





**Figura 15:** Micrografías electrónicas tratadas por inmunocitoquímica de secciones ultrafinas:  
*A.- Núcleos de hepatocitos de ratas tratadas con una dilución 1:20 del complejo conjugado (anticuerpo frente a melatonina marcado con oro coloidal): A.1) x22000. A.2) x68750.*  
*B.- Núcleos de hepatocitos de ratas pinealectomizadas tratadas con una dilución 1:20 del complejo conjugado (anticuerpo frente a melatonina marcado con oro coloidal). x17000.*





### B.- Estudio por citometría de flujo

Otro método utilizado para determinar la presencia de melatonina nuclear consistió en medir por citometría de flujo los **núcleos purificados** de ratas normales y pinealectomizadas incubados con yoduro de propidio (IP) y anti-IgG-FITC.

El primer marcaje (IP) se realizó con el fin de reconocer las partículas que contenían ADN (núcleos) y poder extrapolar este valor al canal FL1 (fluoresceína). De esta manera determinamos el porcentaje de núcleos positivos a la melatonina, en función del aumento de fluorescencia (Figura 16).

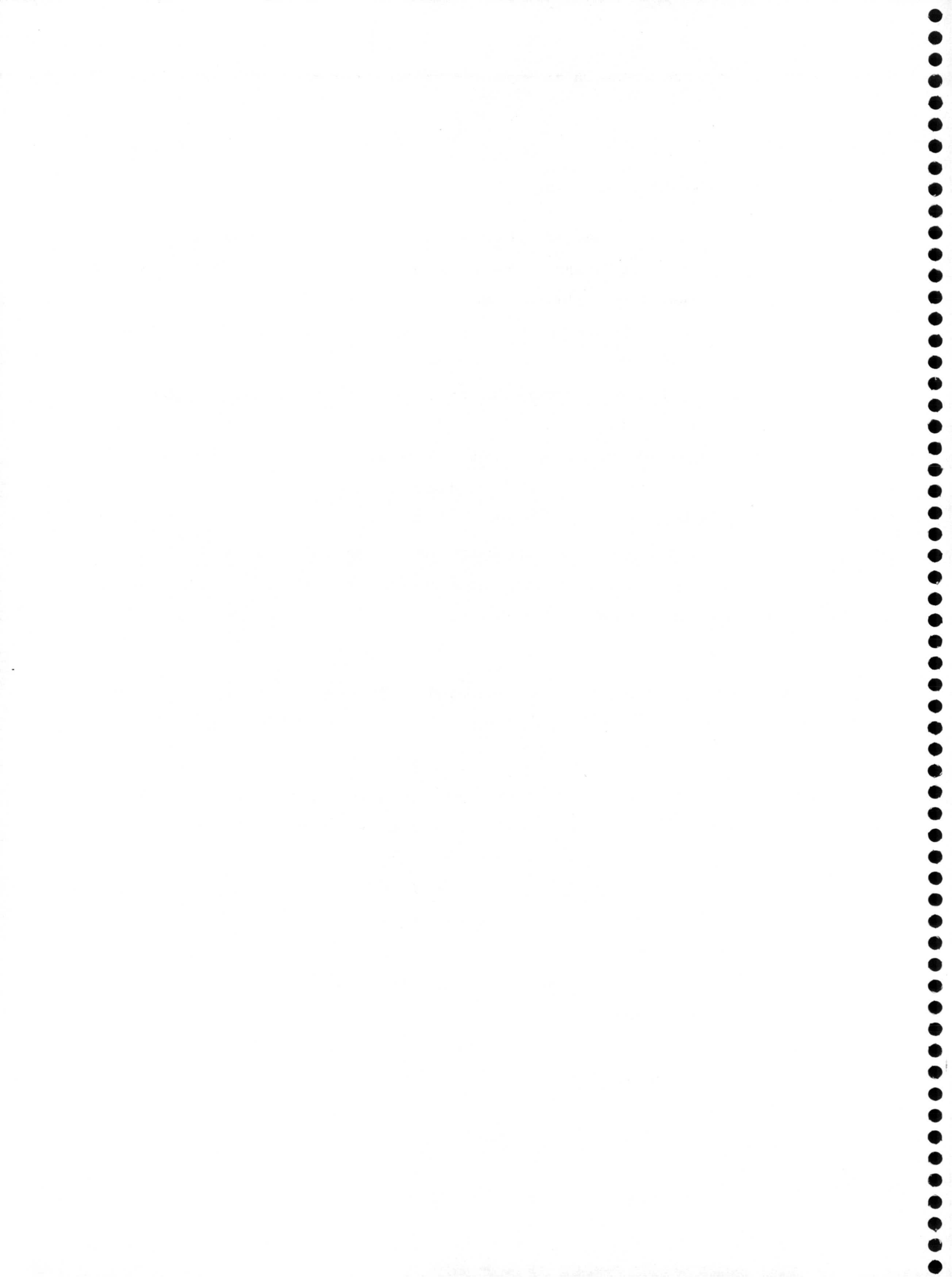
Observando los resultados de núcleos de ratas normales y pinealectomizadas de la Figura 17, el punto donde la mayoría de la población alcanza su fluorescencia máxima ("peak channel") fue de  $300 \pm 10\%$  y  $100 \pm 14\%$ .

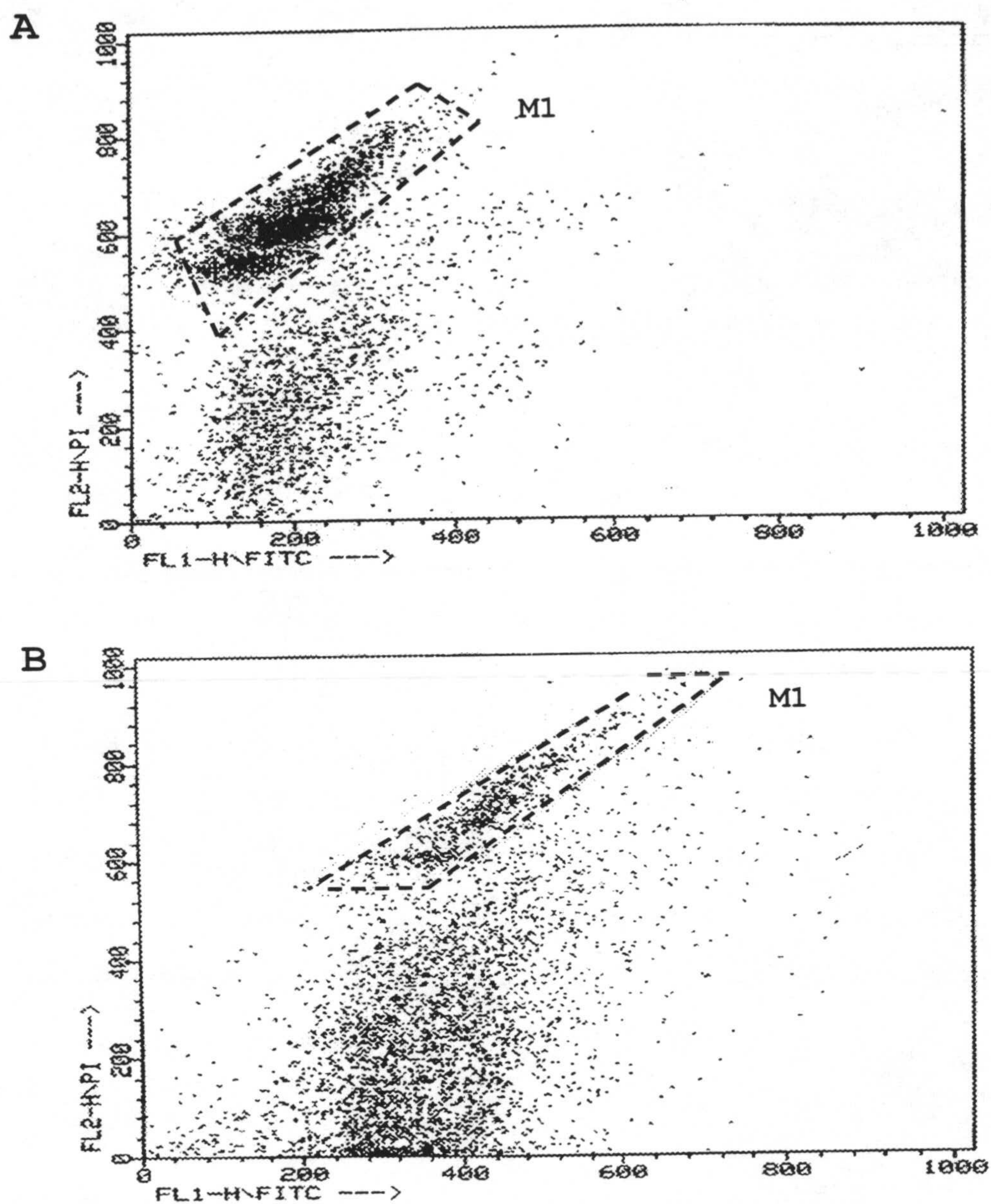
La determinación del marcaje inespecífico se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras anteriores, evitando la incubación con el primer anticuerpo frente a melatonina.

## III.- Purificación del receptor nuclear de melatonina en hepatocitos de rata

### A.-Solubilización de las proteínas nucleares

El **extracto nuclear** obtenido tras la hormogenización de los **núcleos purificados** fue sometido al tratamiento con distintos inhibidores de proteasas de bajo peso molecular (EDTA, leupeptin, pepstatin A y PMSF), que evitan la acción de las enzimas proteolíticas liberadas durante la homogenización. Para una mayor solubilización de las proteínas presentes en la muestra, el **extracto nuclear** se resuspendió en Tritón X-100 al 1 % para disolver parcialmente la membrana nuclear y liberar las proteínas asociadas a ésta, sin alterar su estructura. También se añadieron distintas concentraciones de nucleasas (DNasa y RNasa), para hidrolizar los restos de ácidos nucleicos libres que quedan en el extracto por la homogenización. La casi total eliminación de estos restos se consiguió incubando con concentraciones máximas de



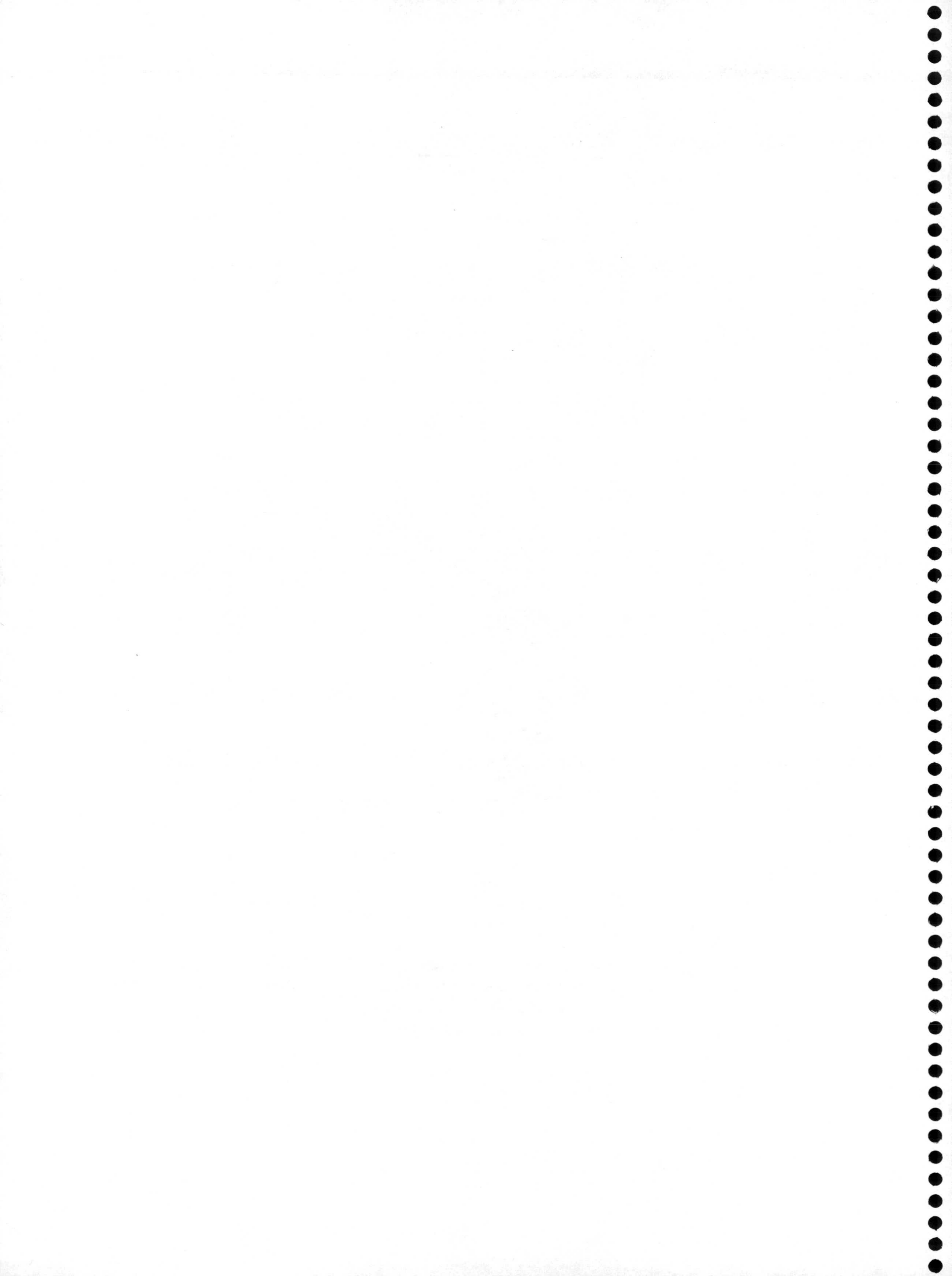


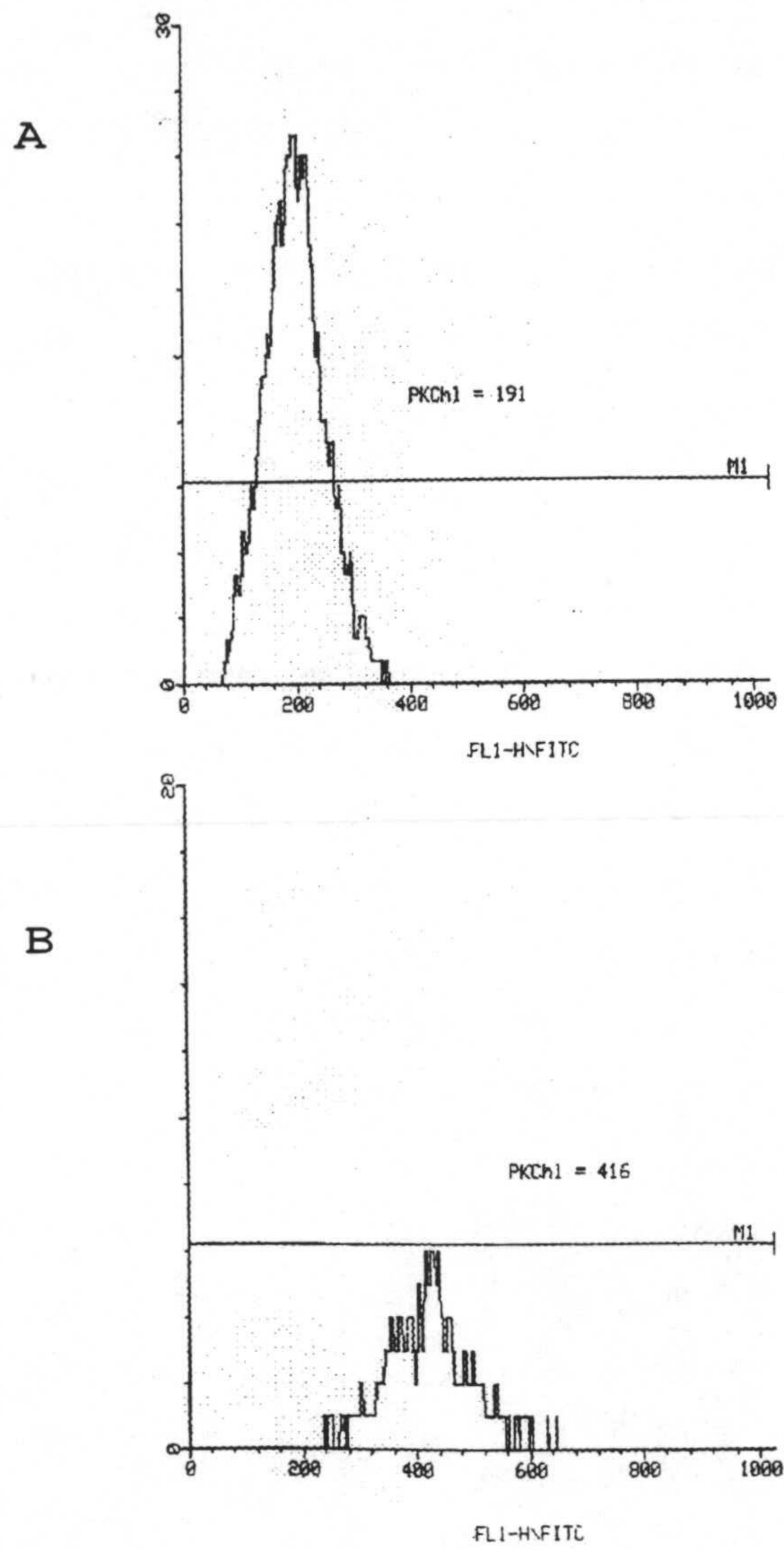
**Figura 16:** Diagrama de puntos medido por citometría de flujo de:

A.- Núcleos de hepatocitos de ratas sin glándula pineal.

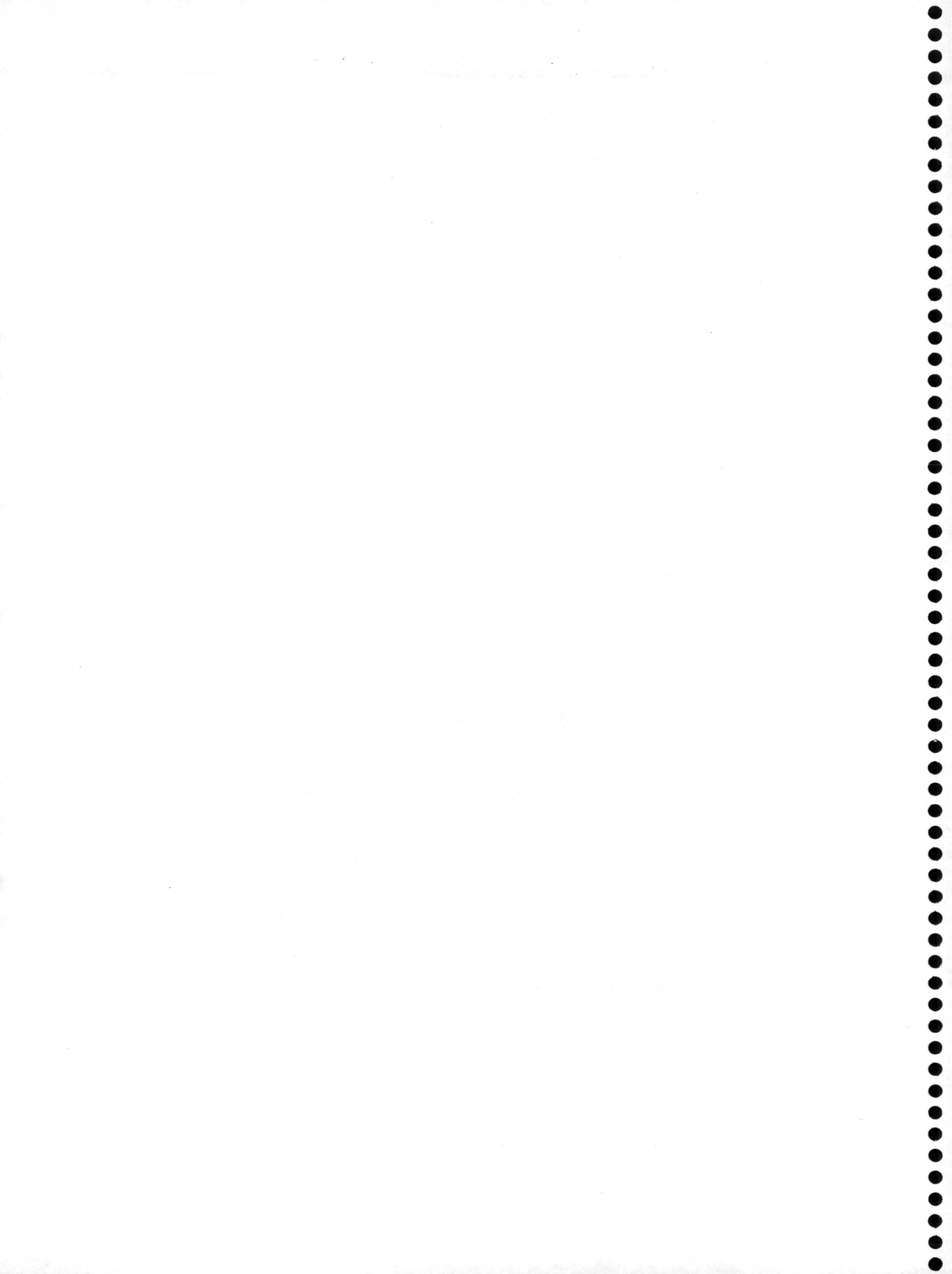
B.- Núcleos de hepatocitos de ratas normales.

Incubadas con yoduro de propidio (FL2) y anti-IgG-FITC (FL1), se observa como la zona marcada (M1) en la figura A está menos desplazada con respecto a la zona M1 de la figura B, esto indica menor intensidad de fluorescencia y por lo tanto menor cantidad de melatonina en núcleos de ratas sin glándula pineal.





*Figura 17: Histograma de distribución de fluorescencia (FL1) de núcleos de hepatocitos de ratas pinealectomizadas (A) y normales (B). El rango que nos determina la zona marcada (M1) en ambas figuras, nos permite calcular el punto donde la mayoría de la población fluoresce con más intensidad (PkCh1).*



Un paso previo a la purificación por cromatografía de afinidad, se consiguió tratando las **muestras solubilizadas** tras su incubación con DNasa y RNasa con distintas concentraciones de sulfato amónico (0-25%, 25-45% y 45-65%), separando y concentrando

### **B.- Afinidad de las muestras solubilizadas**

La purificación del receptor nuclear de la melatonina se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad, mezclando las distintas **muestras solubilizadas** con la agarosa-melatonina. De este modo se recuperaron todas aquellas proteínas que específicamente se unieron a la 6-hidroximelatonina acoplada a la resina.

El mejor rendimiento en la purificación por cromatografía de afinidad se obtuvo mezclando (por adsorción en vaso de precipitado) 50-100 ml de la **muestra solubilizada** (40-70 g de tejido) con 5 ml de agarosa-melatonina, durante 24-36 h a 4° C en agitación moderada. Una vez transcurrido este tiempo la resina se lavó hasta que no se detectaron proteínas en las soluciones de lavado (donde se quedaron más del 70% de las proteínas existentes en la muestra). Después del lavado, la elución de la mayoría de las proteínas unidas a la resina se consiguió incubando con 14 ml de melatonina 10  $\mu$ M (en digitonina 0,05%), entre 6 y 12 h a 4° C en agitación suave.

El acoplamiento a través de columna (según se describe en la pag) se utilizó para volúmenes de resina superiores a 5 ml, donde se obtuvo un rendimiento muy parecido al procedimiento anterior.

### **C.- Determinación de la cantidad de proteínas en las diferentes etapas del proceso de purificación del receptor nuclear de la melatonina**

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante un método de unión al colorante Coomassie Blue G-250 (Bradford, 1976) utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. La sensibilidad del método se ve afectado por el uso de detergentes (sobre todo SDS) y la presencia de reactivos fuertemente alcalinos. Para ello, antes de determinar la concentración de proteínas, las muestras fueron dializadas y centrifugadas a baja velocidad, para eliminar restos de partículas insolubles que pudieran interferir en la medida. Con el método de Bradford se ha podido medir cantidades de proteínas del orden de microgramos en tampón de electroforesis (Tris-SDS-mercaptoetanol) (Rubin, R. y cols., 1977).

Se compararon los cambios de color producido por distintas preparaciones de material purificado, BSA y  $\gamma$ -globulina bovina, utilizando los métodos de micro-Bradford y micro-Lowry (según lo descrito en la pag.). Fue la BSA la que produjo mayor cambio de color con respecto a la  $\gamma$ -globulina en el método de Bradford. Los resultados con BSA coinciden en ambos métodos, sin embargo no ocurre lo mismo con la  $\gamma$ -globulina. Además el rendimiento del reactivo usado como colorante en el método de Bradford para las preparaciones del material purificado fue mejor para la BSA que para la  $\gamma$ -globulina (Ichikawa, K. y cols., 1990).

En la Tabla XI se observan los valores de la cantidad de proteínas (expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido) purificadas a través de uno ciclo de cromatografía de afinidad, con respecto a la cantidad inicial de cada una de las **muestras solubilizadas del extracto nuclear**. Comparando estos resultados se observa un mayor rendimiento en las **muestras solubilizadas** con Tritón X-100 al 1% y precipitadas con concentraciones de entre 25-45% y 45-65% de sulfato amónico, en relación no solo al resto de fracciones, sino también a las muestras que no fueron tratadas ni con detergente, ni con sulfato amónico. En el caso del **extracto nuclear** observamos un mayor rendimiento cuando el eluato del primer ciclo de cromatografía de afinidad se somete a un segundo ciclo de cromatografía de afinidad.

#### IV.- Caracterización del receptor nuclear de melatonina

##### A.- Isoelectroforesis (IEF) del extracto nuclear purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad

En la Figura 18A se observan los puntos isoelectricos (pIs) de las proteínas mayoritarias presentes en el **extracto nuclear** crudo purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad, analizados mediante IEF 3-9. Usando el revelado con plata se aprecia que la mayor parte de los polipéptidos poseen pI ácido: 6,76; 6,61; 6,46; 6,28; 6,04; 5,78; 5,60; 5,39; 5,22; 4,96; 4,83 y 4,68.

La determinación exacta de los puntos isoelectricos se llevó a cabo a través del estudio de los perfiles de cada una de las bandas reveladas con plata, tal y como se observa en la figura 18B.



**Tabla XI:** Datos de la cantidad de proteínas expresada en  $\mu\text{g/g}$  tejido, medidas en las distintas muestras solubilizadas del extracto nuclear purificado por uno o dos ciclos de cromatografía de afinidad

Preparaciones	Proteínas iniciales ( $\mu\text{g/g}$ tejido)	Primer ciclo de cromatografía de afinidad ( $\mu\text{g/g}$ tejido - %)	Segundo ciclo de cromatografía de afinidad ( $\mu\text{g/g}$ tejido - %)
Extracto nuclear Crudo	6.000-8.000	10 - 0,13%	0,2..-

Sin Tritón X-100

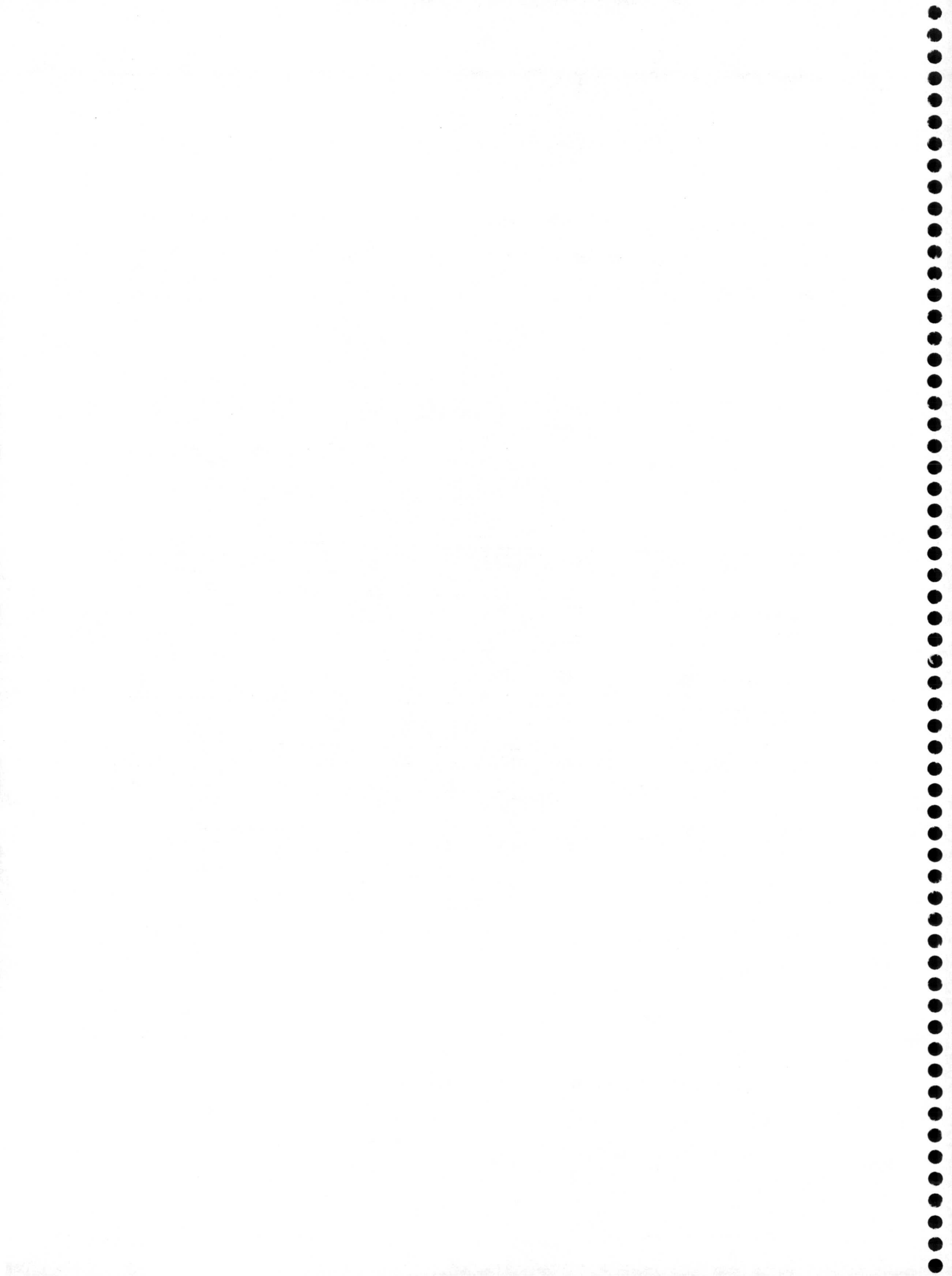
Precipitado (Pp)	4.000 - 5.000	10 - 0,22%	-- --
Sobrenadante (Sb)	2.000 - 3.000	5 - 0,20%	-- --

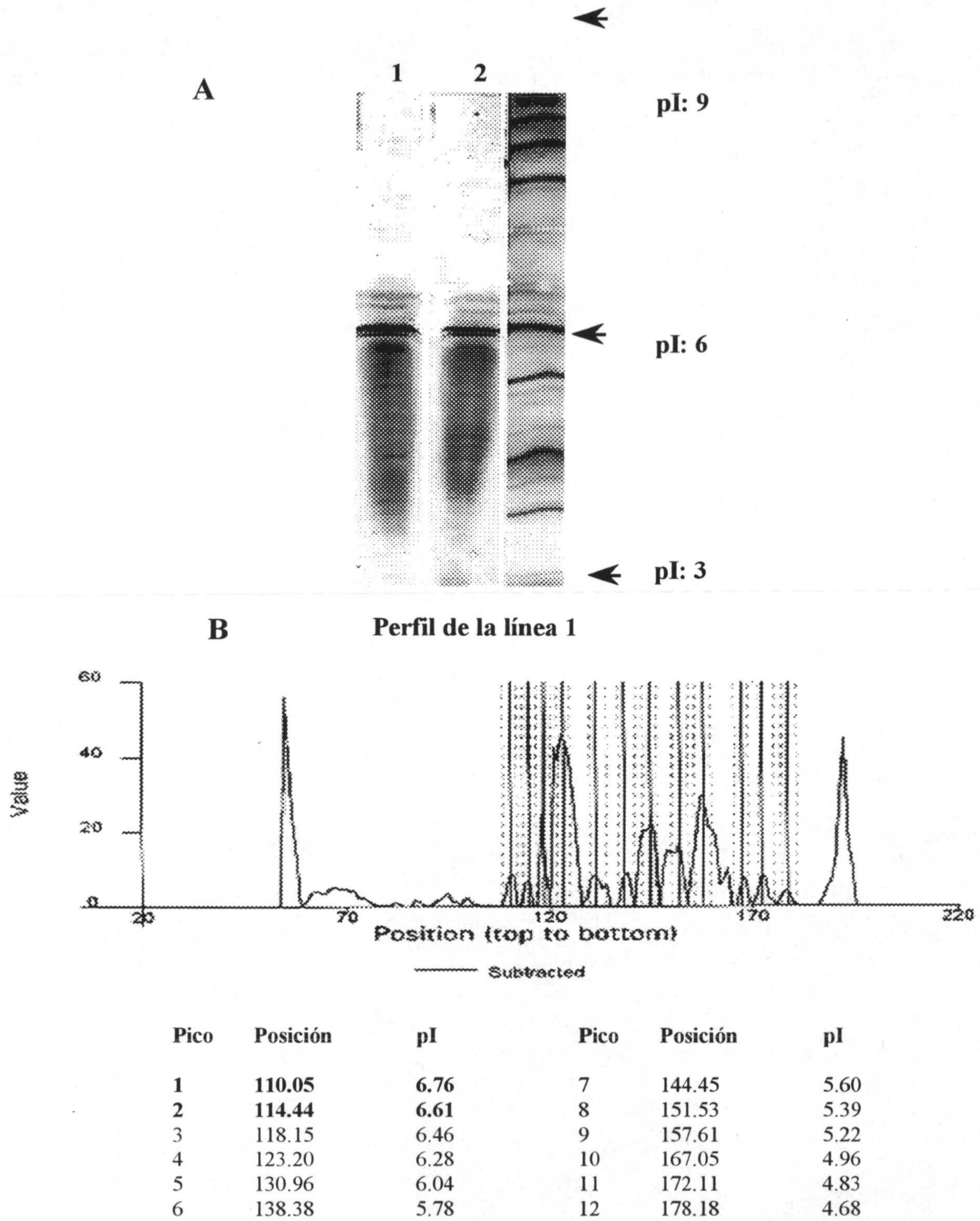
Con Tritón X-100

Precipitado (Pp)	2.500 - 3.500	5,0 - 0,17%	-- -
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0-25 % saturación	900 - 1.200	2,5 - 0,24%	-- --
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 25-45 % saturación	800 - 900	2,9 - 0,34%	-- --
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 45-65 % saturación	600 - 800	3,1 - 0,45%	-- --
Sobrenadante	400 - 500	1,1 - 0,22%	-- --

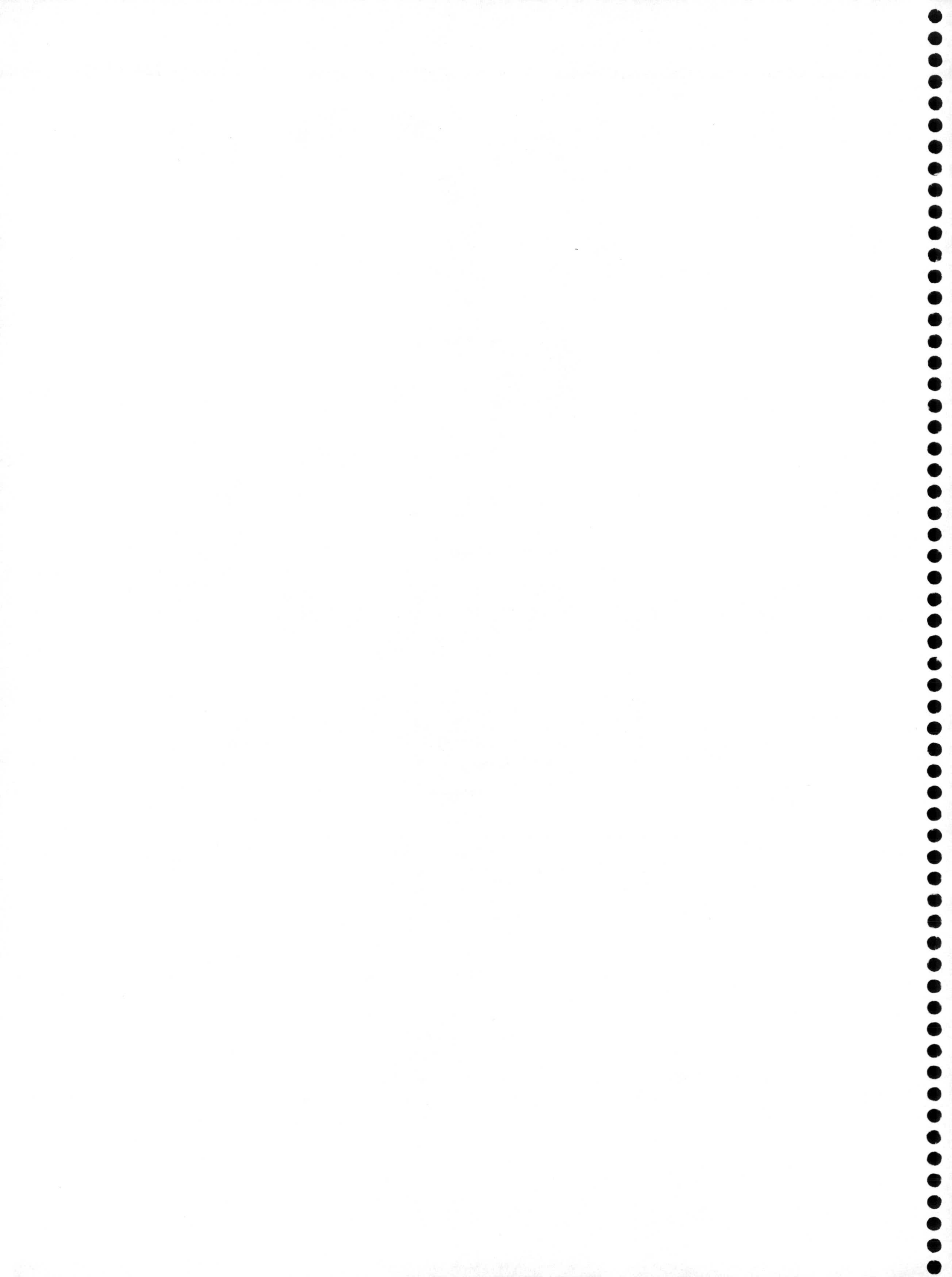
#### B.- Autorradiografía del extracto nuclear purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad

Para determinar el peso molecular (pM) del receptor nuclear de melatonina el extracto nuclear purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad (donde la cantidad de ligando utilizada en la preparación de la resina fue de entre 5 y 10  $\mu\text{mol/ml}$  gel y un tiempo de elución con 10  $\mu\text{M}$  de melatonina de 6 h) fue separado por SDS-PAGE 12,5% y analizado por autorradiografía. Como se observa en la figura 19, fue la proteína correspondiente a un





**Figura 18:** A) Isoelectroforesis en gel de poliacrilamida del extracto nuclear por cromatografía de afinidad y teñido con nitrato de plata (líneas 1 y 2). Línea Mr: proteínas marcadoras de punto isoeléctrico (pI) conocido. B) Perfil de la línea 1 que nos determina los puntos isoeléctricos de cada una de las bandas teñidas con plata.



peso molecular de 64 kDa la que se unió covalentemente a la 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina. Los tiempos de exposición a los que se sometió el gel una vez teñido con nitrato de plata fueron de 7 y 14 días. Cuando se empleó el revelado con plata (Figura 19) los polipéptidos mayoritarios correspondían a los siguientes pesos moleculares: 138, 89, 80, 64, 53, 49, 45, 36, 33 y 22 kDa.

La determinación exacta de los pesos moleculares se llevó a cabo a través del estudio de los perfiles de cada una de las bandas reveladas, tal como se observa en la Figura 20. La cantidad de proteína correspondiente a cada banda se calculó comparando las intensidades de dichas bandas con las correspondientes a las proteínas marcadoras de concentración conocida.

### **C.- Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) e inmunotransferencia del extracto nuclear purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad.**

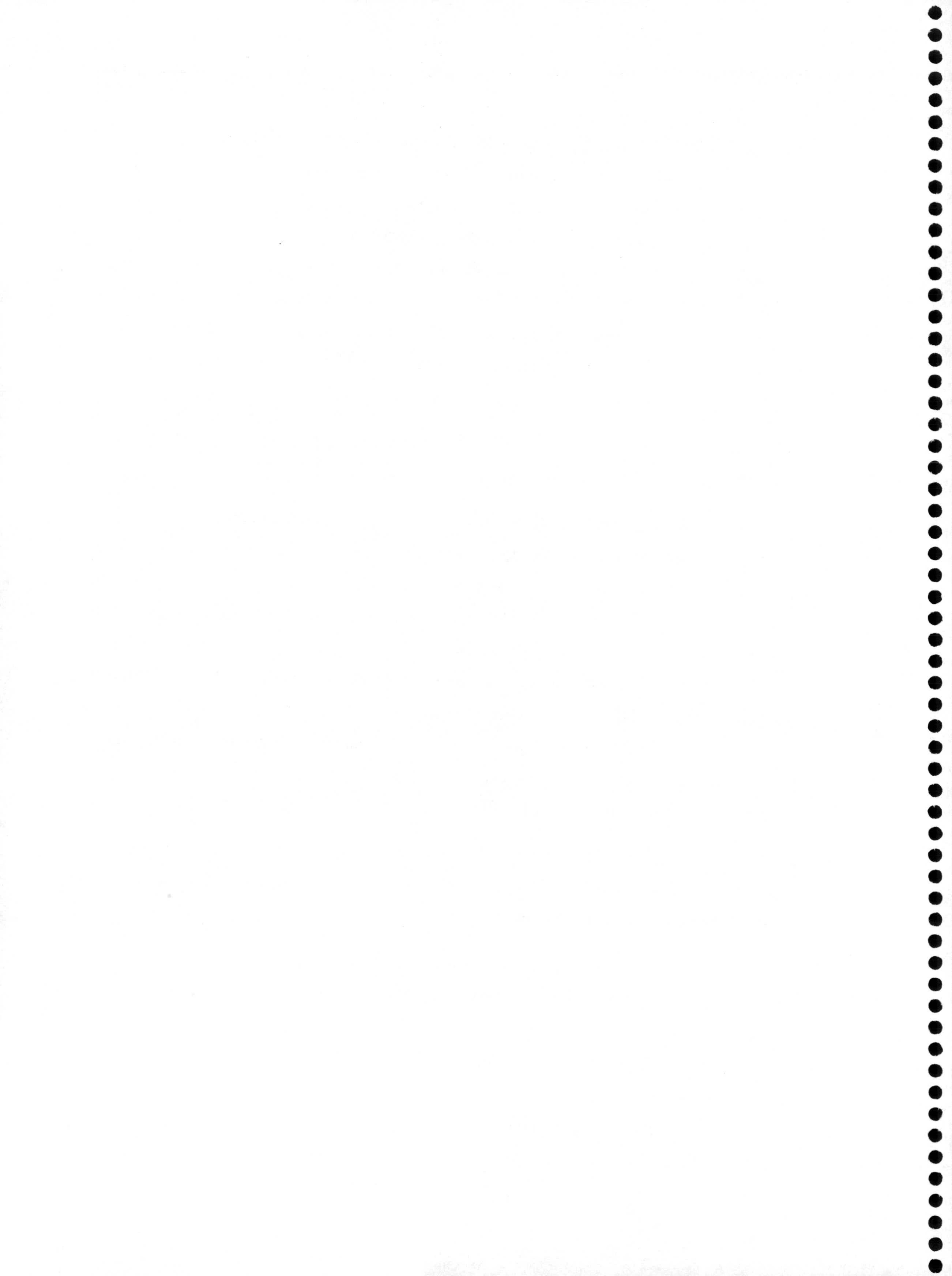
La electroforesis bidimensional (Figura 21A) y posterior inmunotransferencia (Figura 21B) del **extracto nuclear** purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad (donde la cantidad de ligando utilizada en la preparación de la resina oscilaba entre 5 y 10  $\mu\text{mol/ml}$  gel, y un tiempo de elución con melatonina de 6 h) revelaron la presencia de dos proteínas con un peso molecular de 64 kDa y puntos isoelectricos de 6,76 y 6,62 respectivamente, que fueron reconocidas específicamente por el anticuerpo frente a melatonina (dilución 1:800), cuando se preincubó con 10  $\mu\text{M}$  de melatonina durante 1 h a 4° C en agitación.

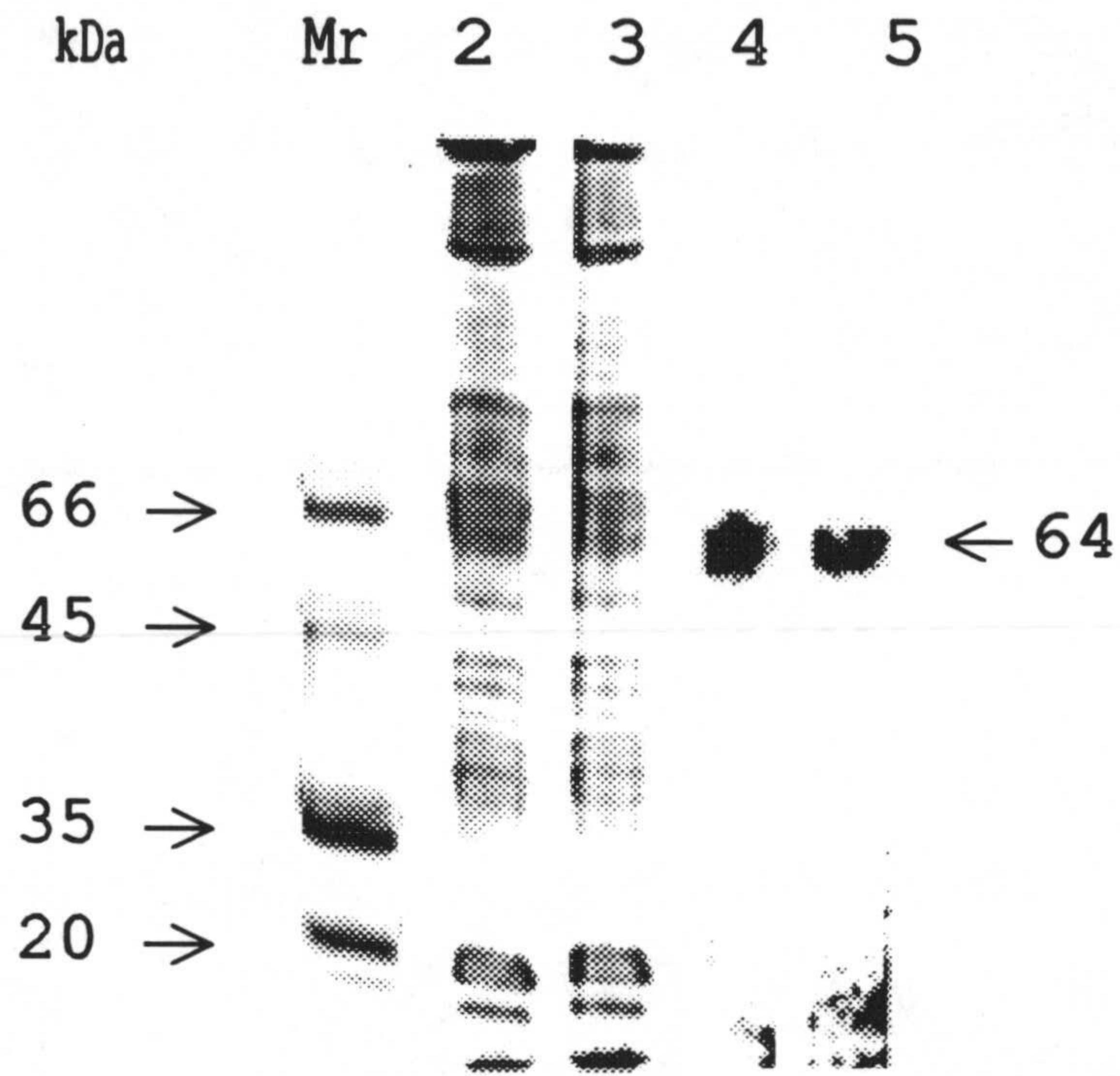
En la Figura 22 se observan los perfiles de los puntos presentes en la muestra de la Figura 21A que nos permite calcular con exactitud los pesos moleculares y puntos isoelectricos de los polipéptidos mayoritarios.

### **D.- Electroforesis en SDS-PAGE (7,5 %) del extracto nuclear purificado por uno y dos ciclos de cromatografía de afinidad**

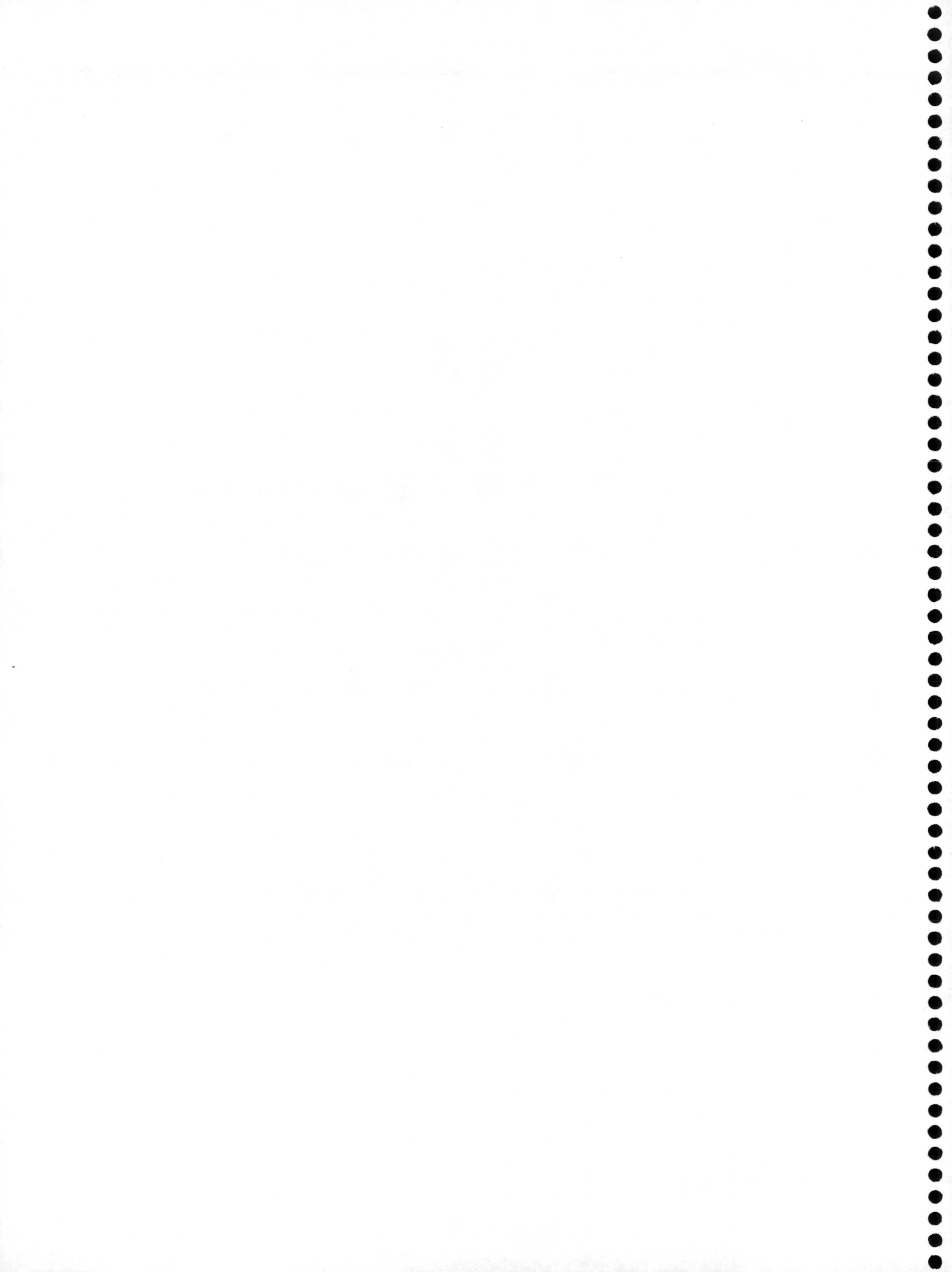
En la Figura 23 se observa una reducción en el número de bandas cuando el **extracto nuclear** separado en SDS-PAGE (7,5%) y teñido con nitrato de plata, fue previamente sometido a dos ciclos de cromatografía de afinidad (donde la cantidad de ligando utilizada en la preparación de la resina oscilaba entre 10 y 30  $\mu\text{mol/ml}$  gel, y el tiempo de elución con melatonina fue de 12 h).

En la figura 23B se observa que en el extracto nuclear (purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad) los polipéptidos mayoritarios separados en SDS-PAGE (7,5 %) y



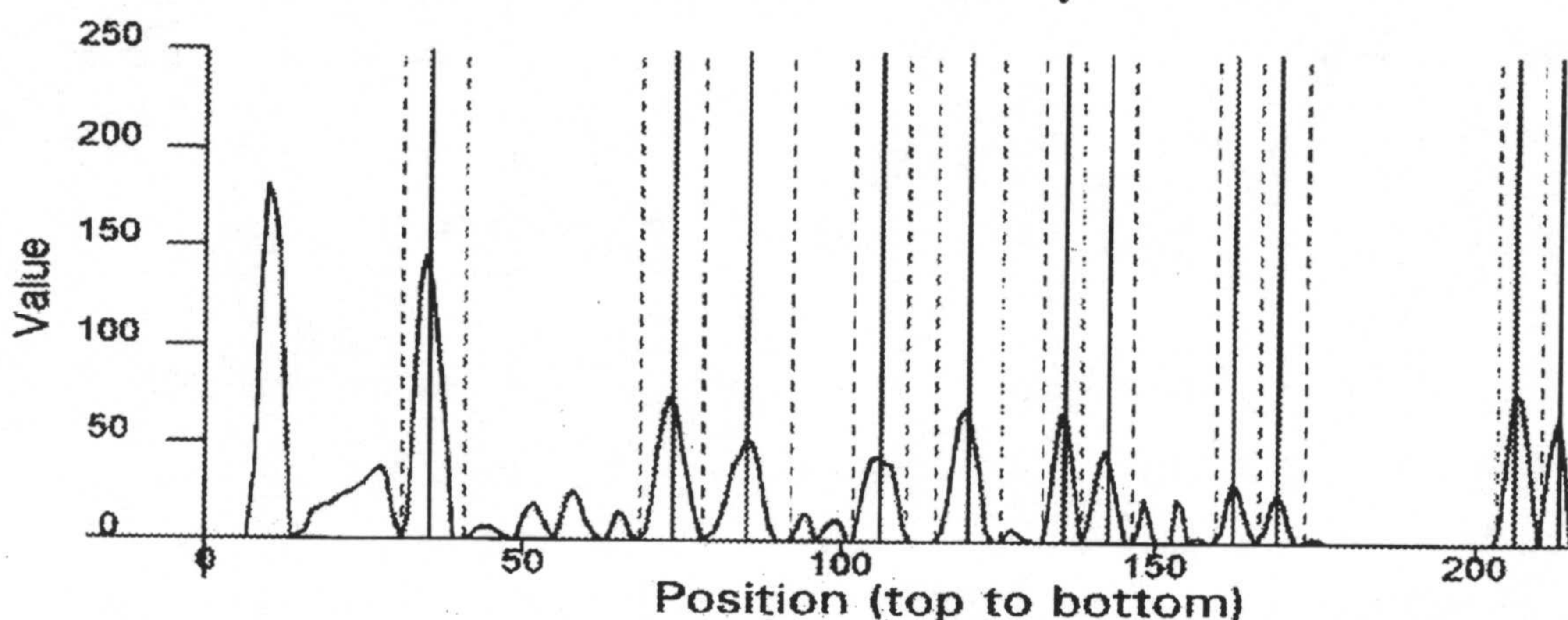


**Figura 19:** Electroforesis en SDS-PAGE (12,5%) del extracto nuclear purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad: teñido con nitrato de plata (**líneas 2 y 3**) y autorradiografiado de (**líneas 4 y 5**). Tiempo de exposición fue de 7 días (línea 4) y 14 días (línea 5). **Línea Mr:** proteínas marcadoras de peso molecular y concentración conocida. La cantidad de proteínas aplicada fue de  $\mu\text{g}$  para las líneas 2-3 y  $\mu\text{g}$  para las líneas 4-5



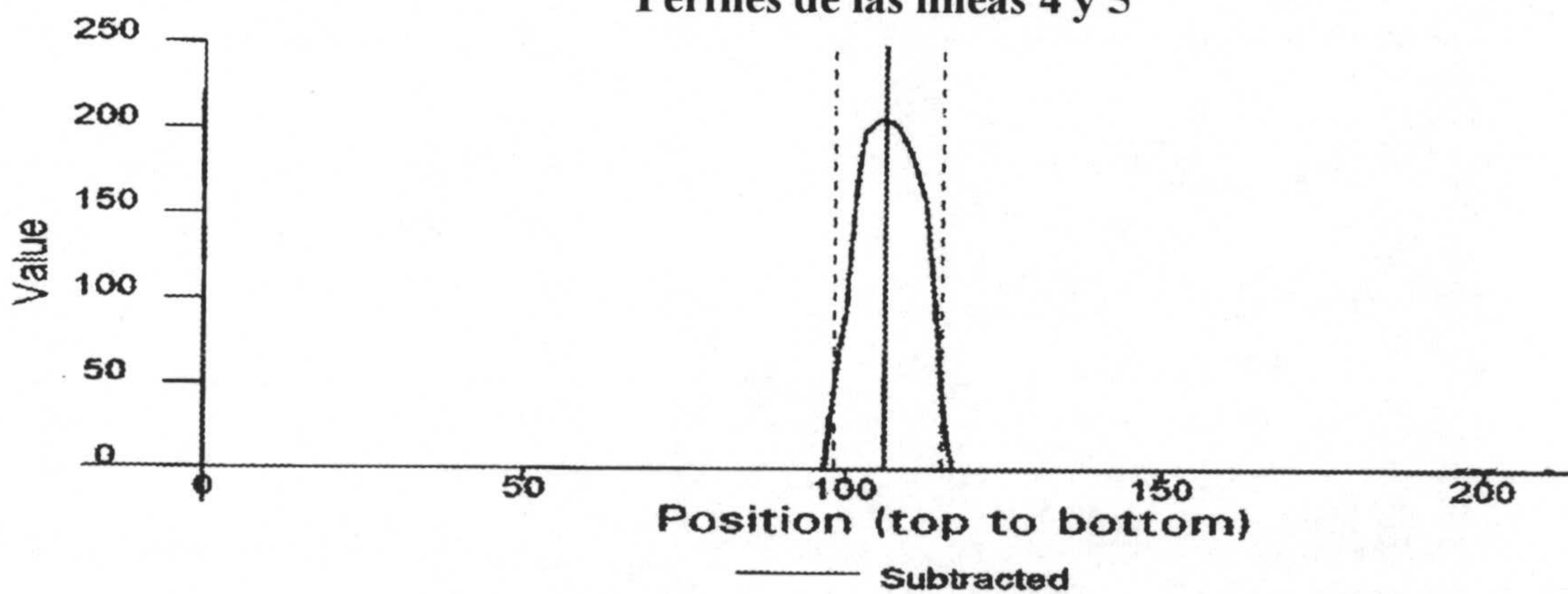


Perfiles de las líneas 2 y 3



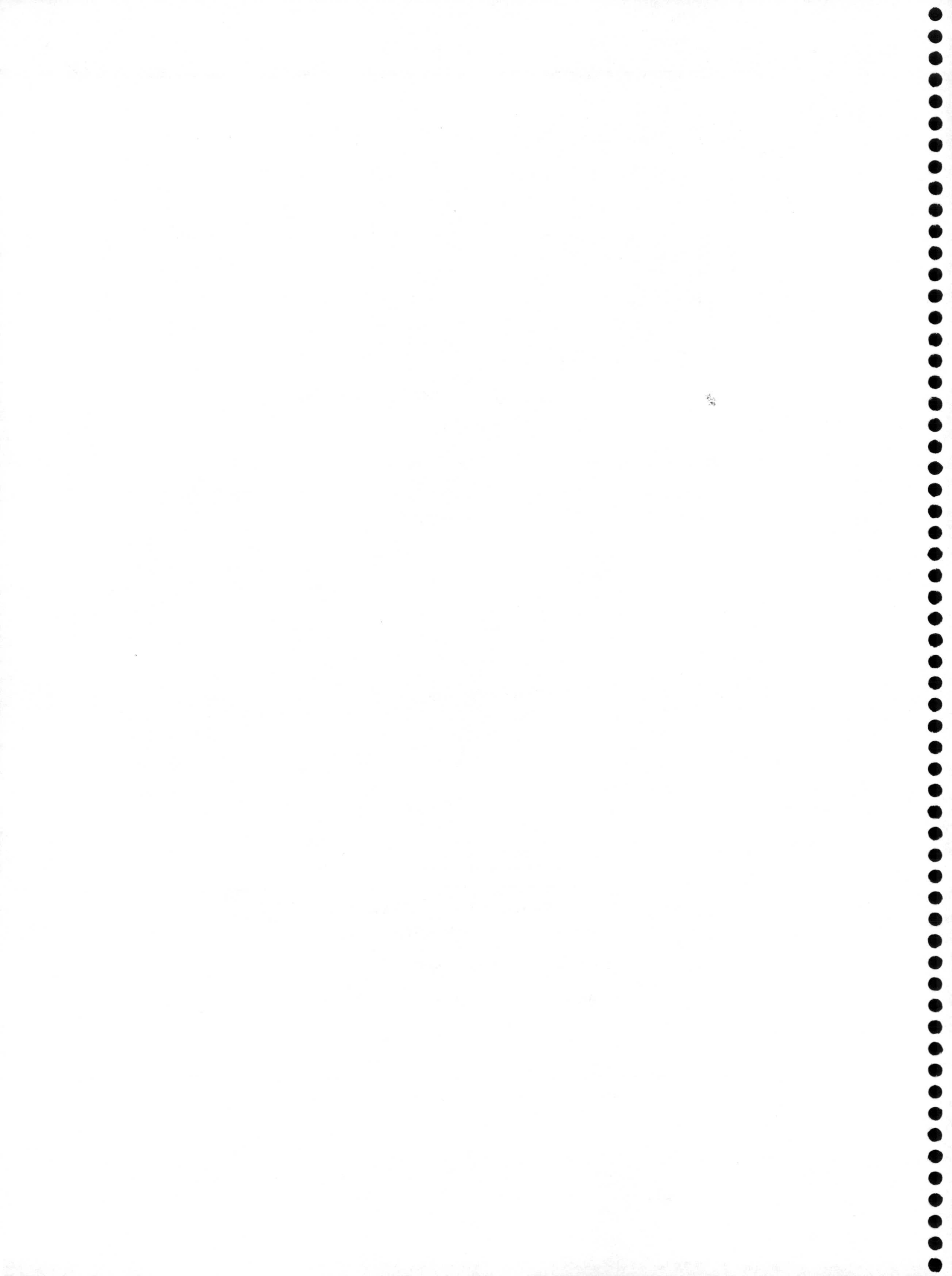
Pico	Posición	Peso Molecular (kDa)	Altura
1	35.00	138	145.75
2	73.00	89	73.29
3	85.00	80	51.81
4	<b>106.00</b>	<b>64</b>	<b>43.59</b>
5	120.00	53	69.10
6	135.00	49	66.18
7	142.00	45	48.05
8	162.00	36	31.67
9	169.00	33	24.97
10	206.00	22	78.07

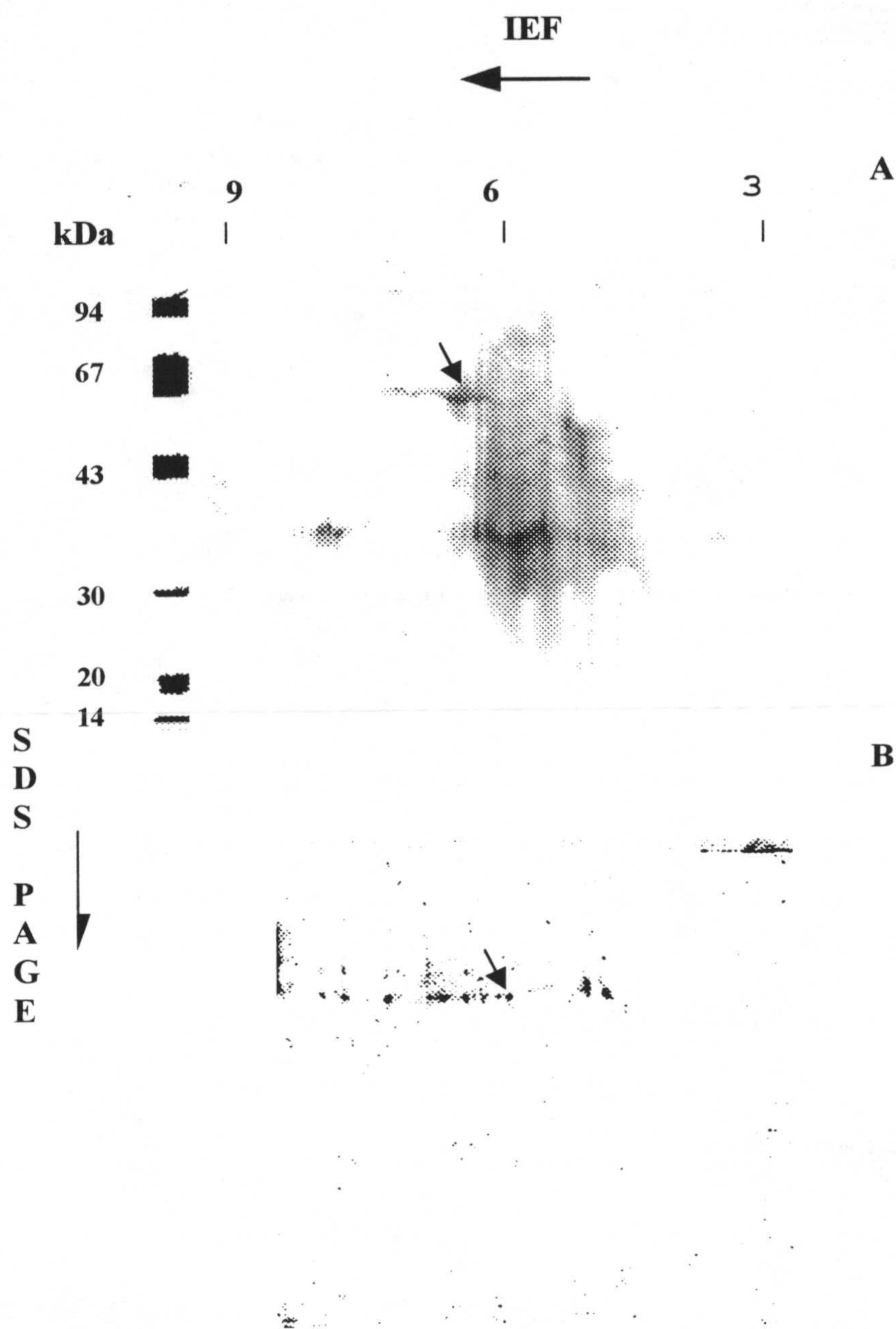
Perfiles de las líneas 4 y 5



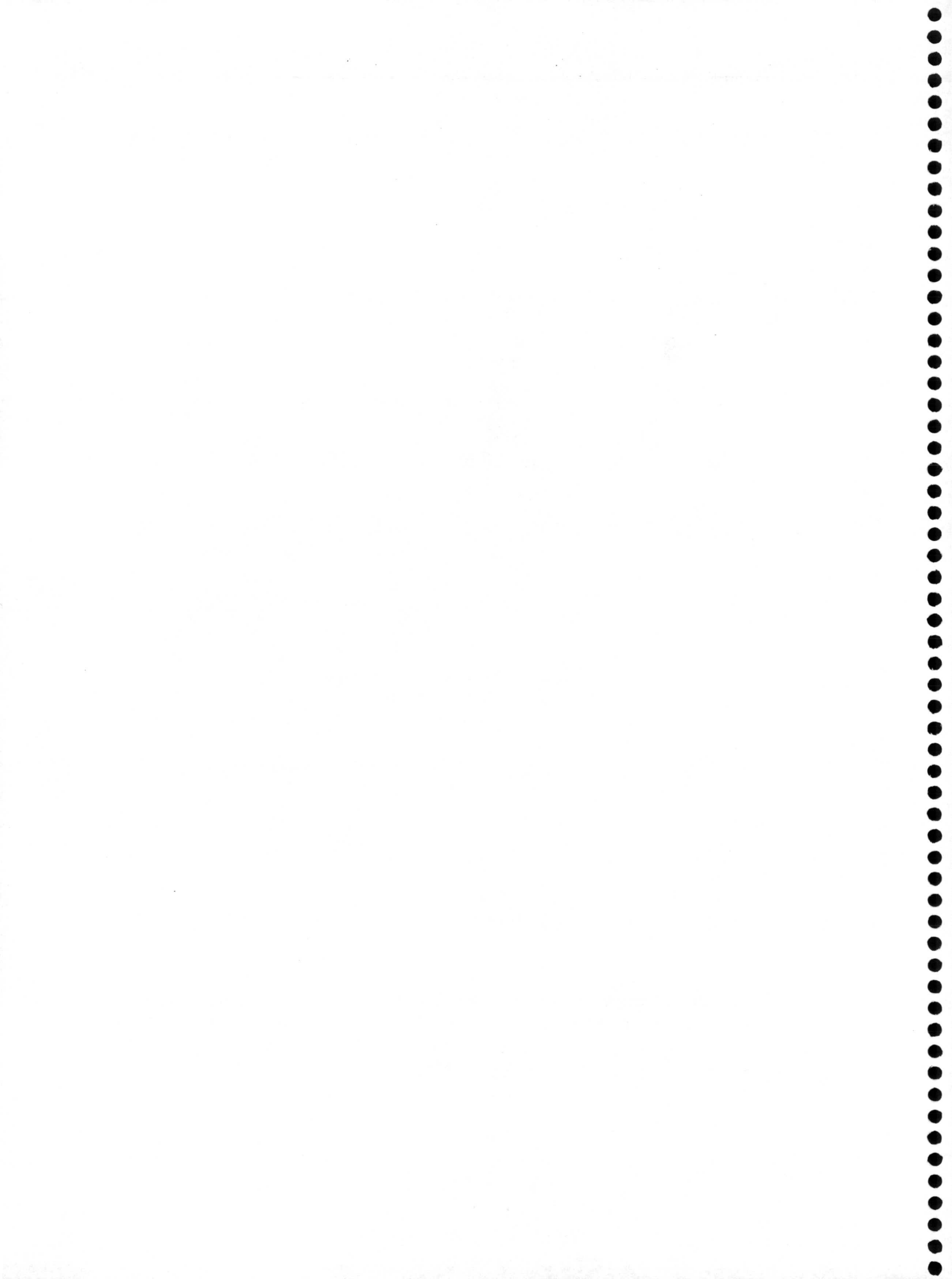
Peak	Position	Peso molecular	Altura
1	106.00	64	206.40

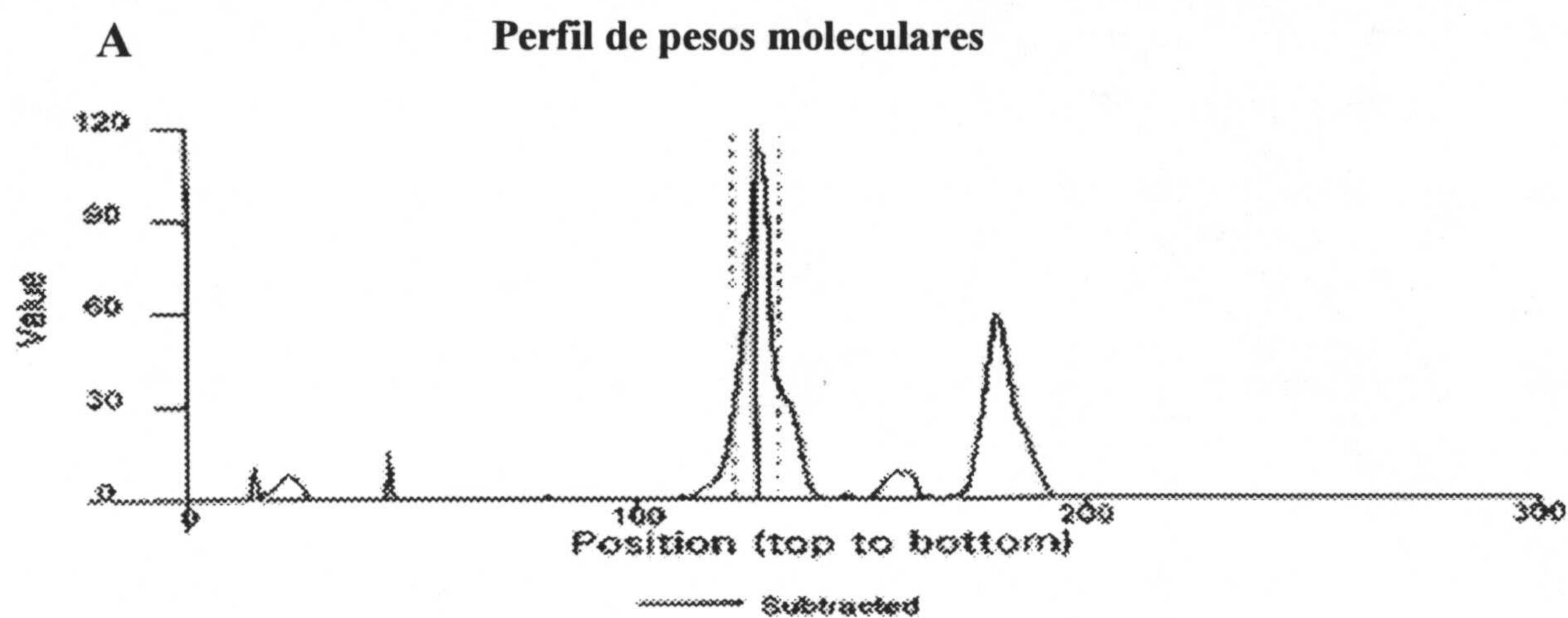
Figura 20: Perfiles de las líneas 2,3,4 y 5 de la figura 11, que nos determina los pesos moleculares de los polipéptidos mayoritarios.





**Figura 21:** Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) del extracto nuclear purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad, teñido con nitrato de plata (A) y transferido a membrana de nitrocelulosa (Western-Blotting) e incubando con una dilución 1:800 de anticuerpo frente a melatonina (B).

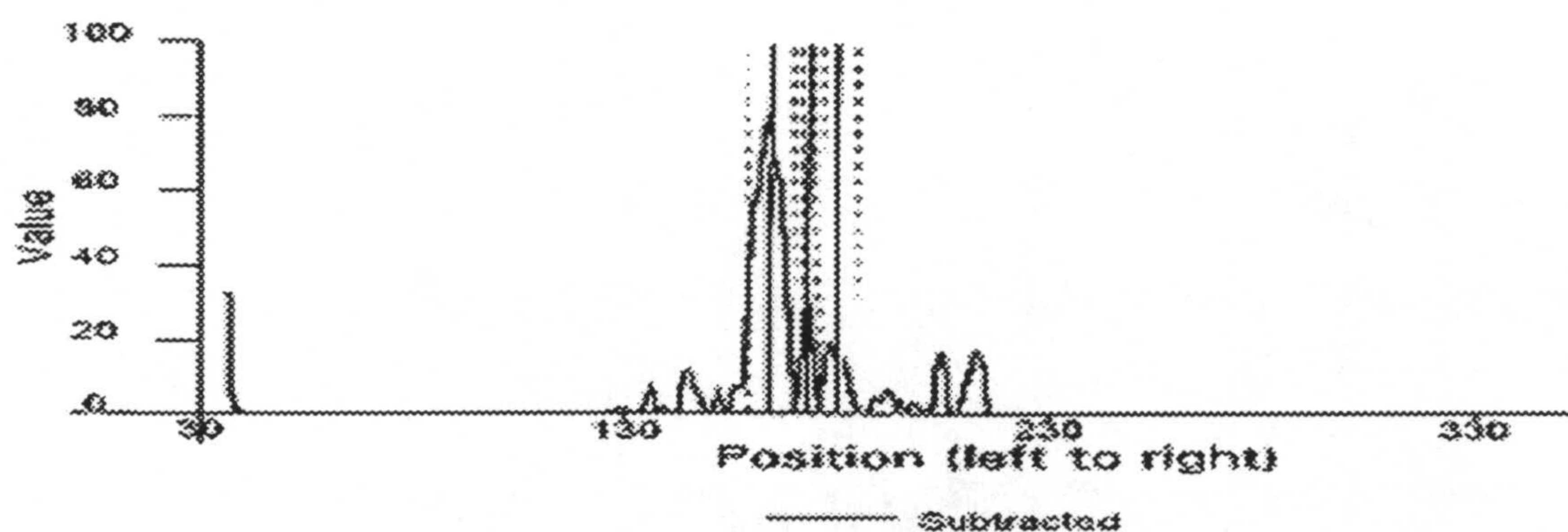




Pico	Posición	peso molecular (kDa)
1	126,13	64

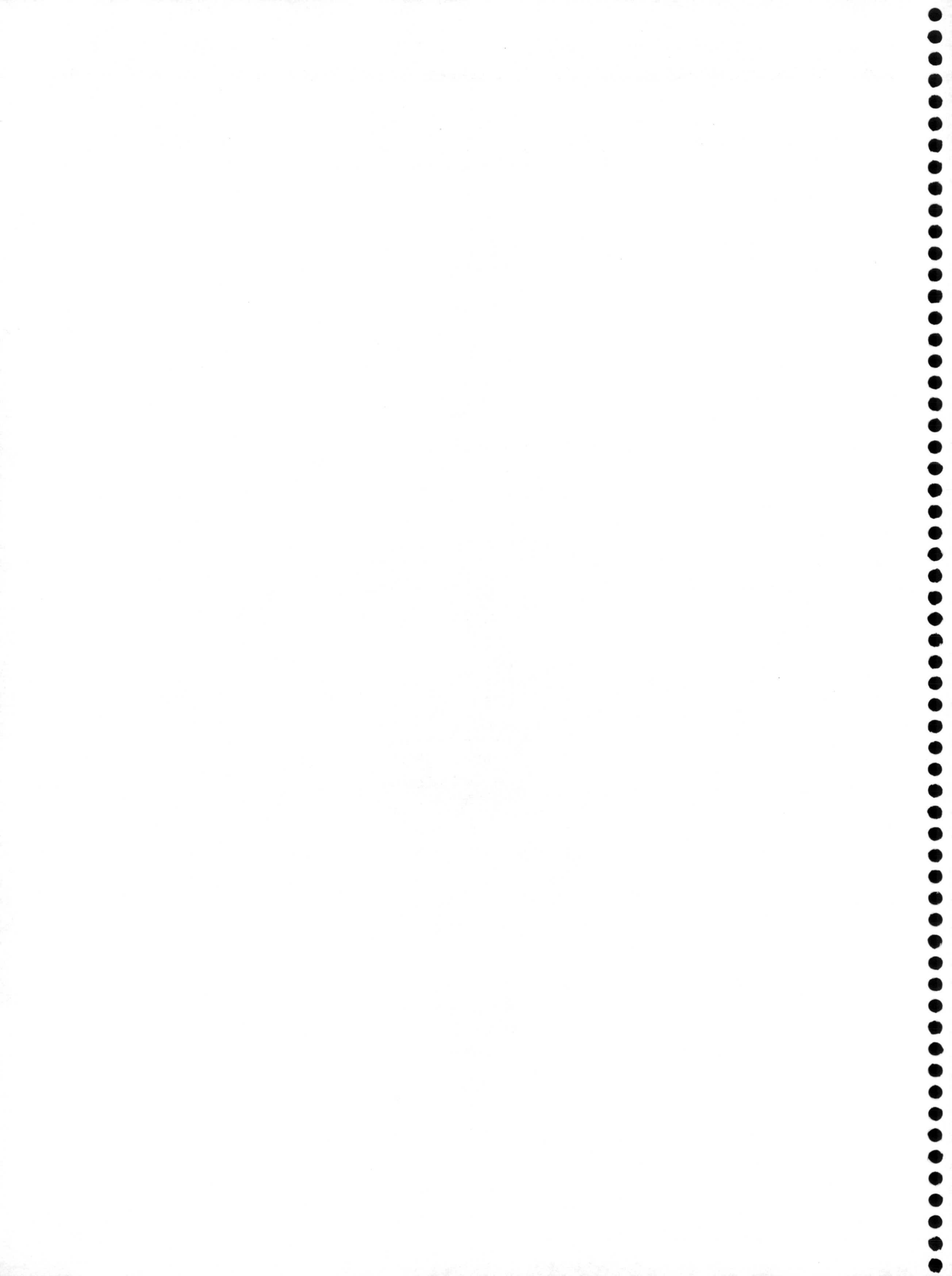
**B**

**Perfil de puntos isoelectricos**



Pico	Posición	pI
1	163,56	6,76
2	172,33	6,62

**Figura 22:** Perfiles de los puntos correspondientes a las proteínas de interés sometidas a electroforesis bidimensional y teñidas con nitrato de plata de la figura 13A, que nos determina los pesos moleculares (A) y los puntos isoelectricos (B) de los polipéptidos mayoritarios.



teñidos con nitrato de plata o coomassie blue, correspondían a los siguientes pesos moleculares: 138, 80, 74, 69, 64, 53 y 33 kDa. En esta misma figura también se puede observar como el número de bandas reveladas con plata del **extracto nuclear** purificado por dos ciclos de cromatografía de afinidad quedaba reducido a cuatro. Estas cuatro bandas correspondían a los polipéptidos de 74, 69, 64 y 53 kDa de peso molecular. La determinación exacta de los pesos moleculares se llevó a cabo a través del estudio de los perfiles de cada una de las bandas reveladas, tal como se observa en la Figura 23B. La cantidad de proteína correspondiente a cada banda fue calculada comparando las intensidades de dichas bandas con las correspondientes a las proteínas marcadoras de concentración conocida.

#### **E.- Inmunotransferencia del extracto nuclear purificado por uno y dos ciclos de cromatografía de afinidad**

El estudio de la especificidad de las proteínas existentes en el **extracto nuclear** purificado por uno y dos ciclos de cromatografía de afinidad (según las condiciones descritas en el apartado anterior) mediante inmunotransferencia (Figura 24A) reveló la presencia, en ambas muestras, de dos polipéptidos de 64 y 74 kDa respectivamente que fueron reconocidos por el anticuerpo frente a melatonina, cuando eran preincubadas con 10  $\mu$ M de melatonina ó 10  $\mu$ M de CGP-5260. En esta misma figura también se puede observar como dichas bandas desaparecen cuando las muestras no eran preincubadas ni con melatonina ni con CGP-5260, al igual que cuando no eran incubadas con el anticuerpo frente a melatonina.

La Figura 24B muestra los perfiles de las bandas, correspondientes a los dos polipéptidos de 64 y 74 kDa, reconocidos por el anticuerpo frente a melatonina.

#### **E.- Electroforesis en SDS-PAGE (12,5%) de las diferentes etapas del proceso de purificación del receptor nuclear de melatonina por cromatografía de afinidad**

En la Figura 25 se observa una reducción en el número de bandas cuando el **extracto nuclear**, separado en SDS-PAGE (12,5%) y teñido con nitrato de plata, fue solubilizado con Tritón X-100 al 1% y precipitado con concentraciones de sulfato amónico (25-45% y 45-65%) antes de ser purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad (donde la cantidad de ligando utilizada en la preparación de la resina oscilaba entre 10-30  $\mu$ mol/ml gel, y el tiempo de elución con melatonina fue de 12 h). No se observan diferencias cuando las muestras se

incubaron en presencia o ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Cuando se empleó el revelado con plata los dos polipéptidos que aparecen en todas las etapas de purificación fueron los correspondientes a 64 y 74 kDa de peso molecular. La determinación exacta de los pesos moleculares se llevó a cabo a través del estudio de los perfiles de cada una de las bandas reveladas. La cantidad de proteína correspondiente a cada banda fue calculada comparando las intensidades de dichas bandas con las correspondientes a las proteínas marcadoras de concentración conocida.

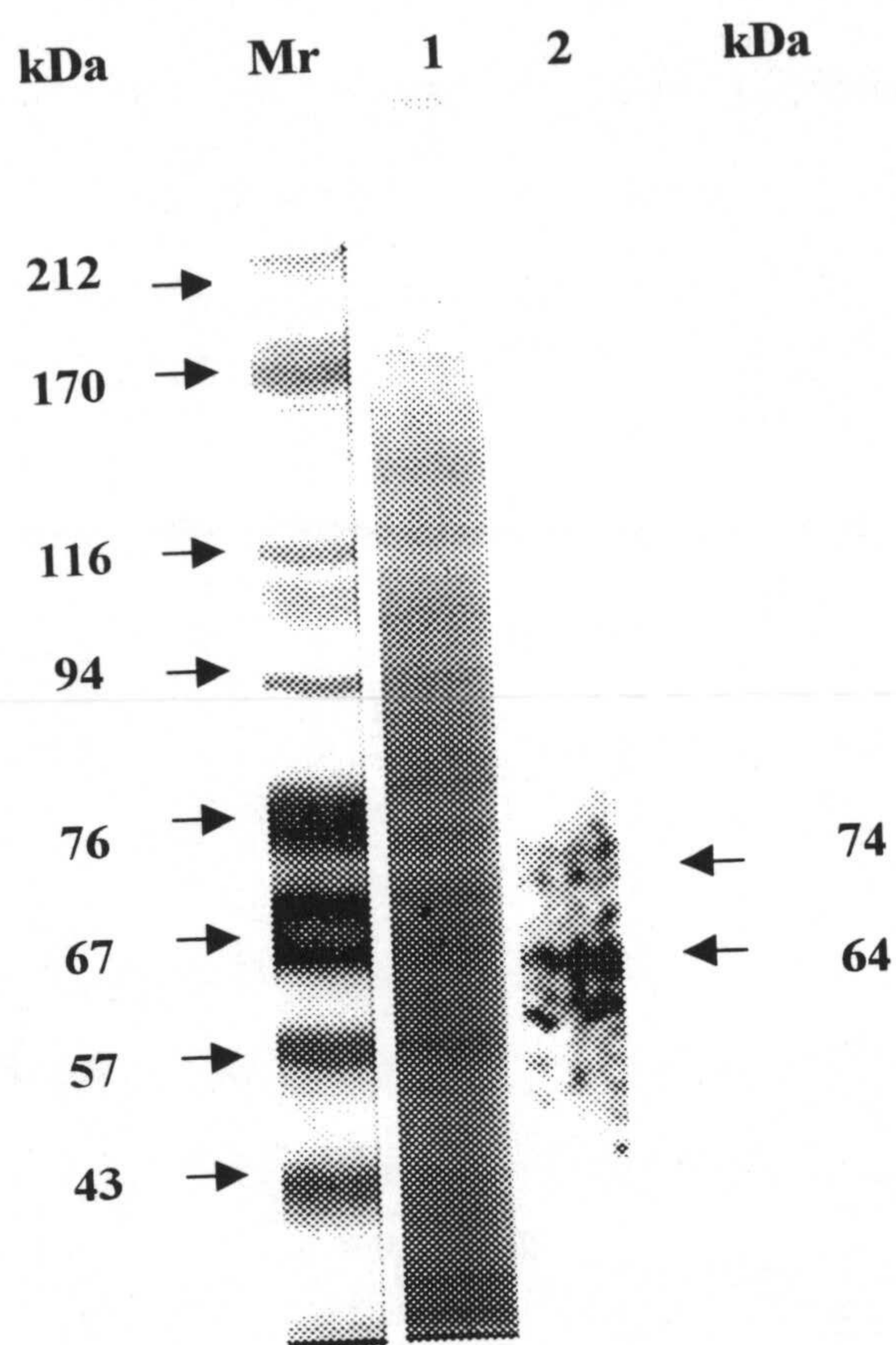
#### **F.- Inmunotransferencia de las diferentes etapas del proceso de purificación del receptor nuclear de melatonina por cromatografía de afinidad**

La inmunotransferencia de las muestras del apartado anterior (Figura 26) reflejó la presencia de dos proteínas de 64 y 74 kDa reconocidas por el anticuerpo frente a melatonina, previa incubación con 10  $\mu$ M de melatonina ó CGP-5260. En esta figura también se puede observar como dichas bandas desaparecen cuando las muestras no se preincuba ni con melatonina ni con CGP-5260, al igual que cuando no se incubaba con anticuerpo frente a melatonina. También se puede observar como estos dos polipéptidos no eran reconocidos por el anticuerpo frente a histonas totales (dilución 1:800), previa incubación con melatonina o CGP-5260. Por otra parte, al ser el peso molecular de una de las bandas caracterizadas de 64 kDa, muy parecido al de una proteína tan abundante como la BSA, ésta fue separada en SDS-PAGE y transferida a membrana de nitrocelulosa. La BSA fue reconocida por el anticuerpo frente a melatonina cuando no se preincuba con 10  $\mu$ M de melatonina.

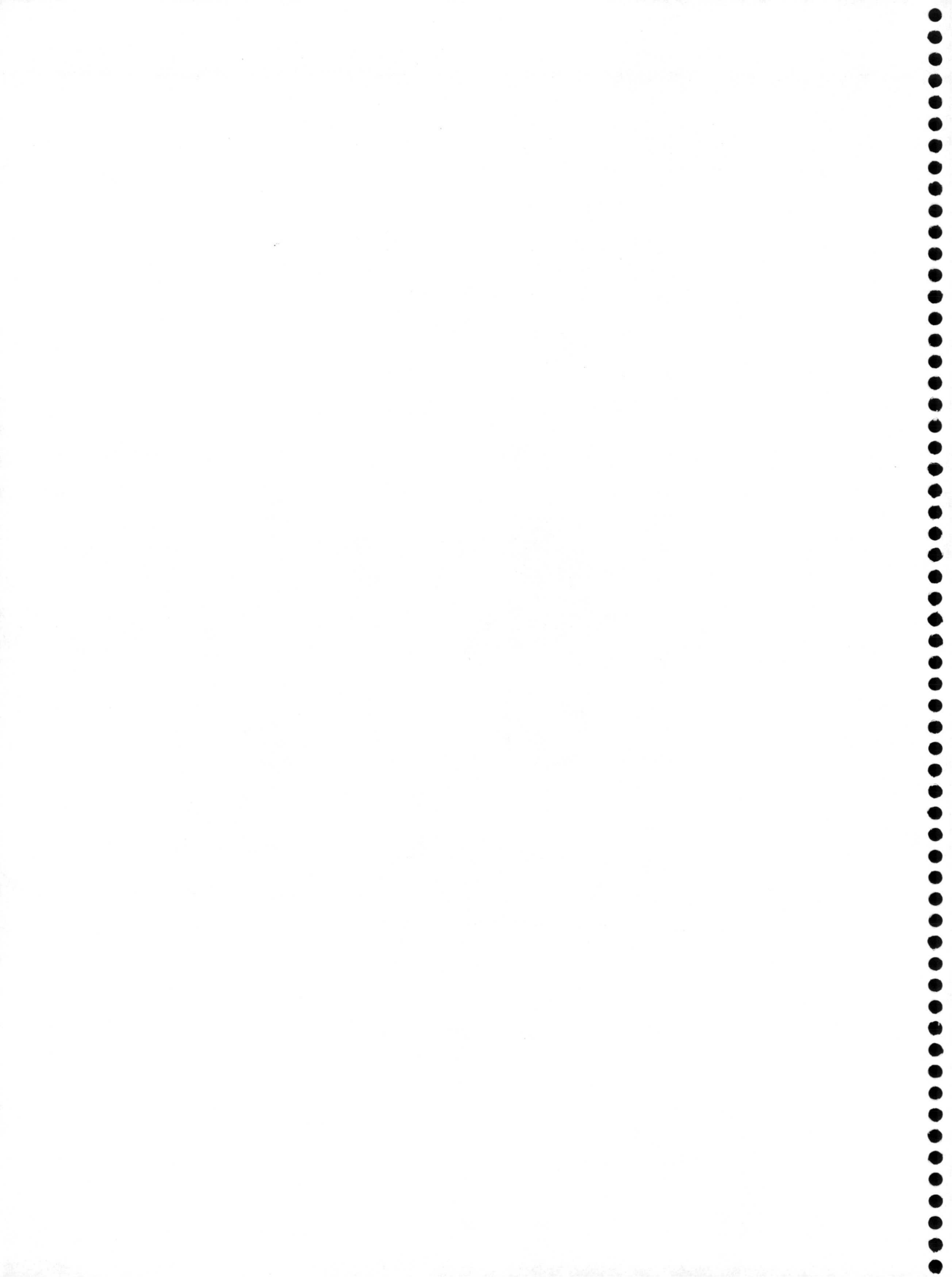
En la Figura 26B se observan los perfiles de las bandas, correspondientes a los dos polipéptidos de 64 y 74 kDa, reconocidos por el anticuerpo frente a melatonina.

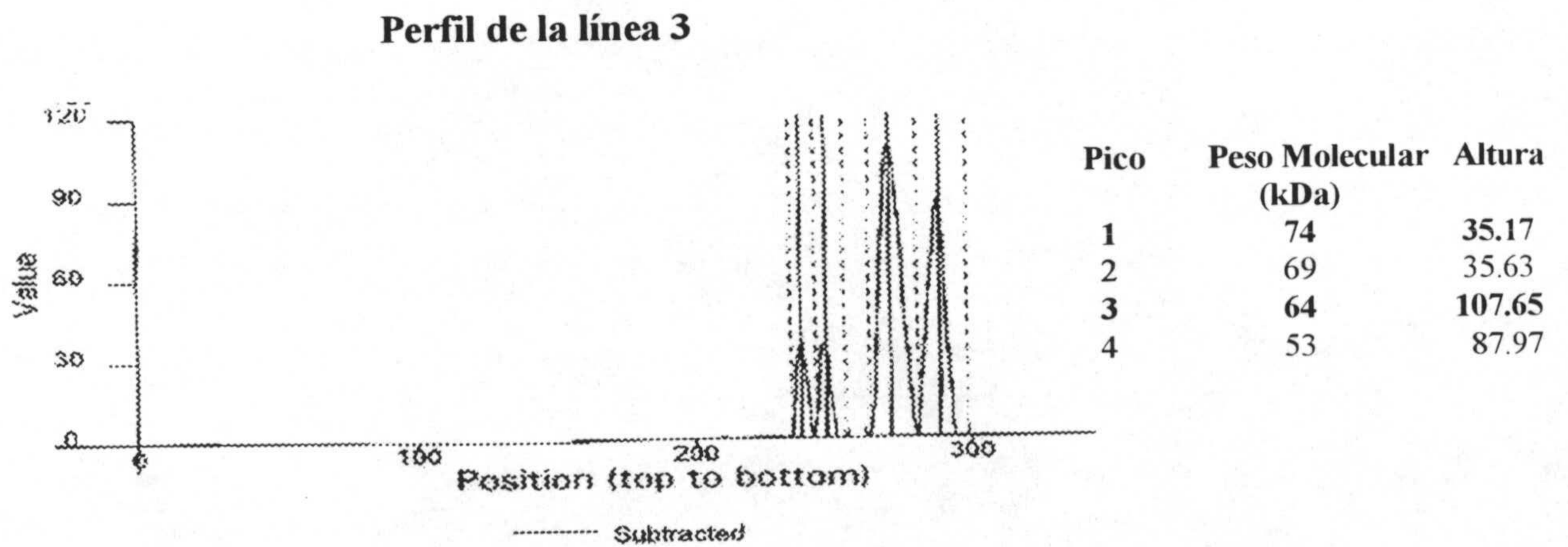
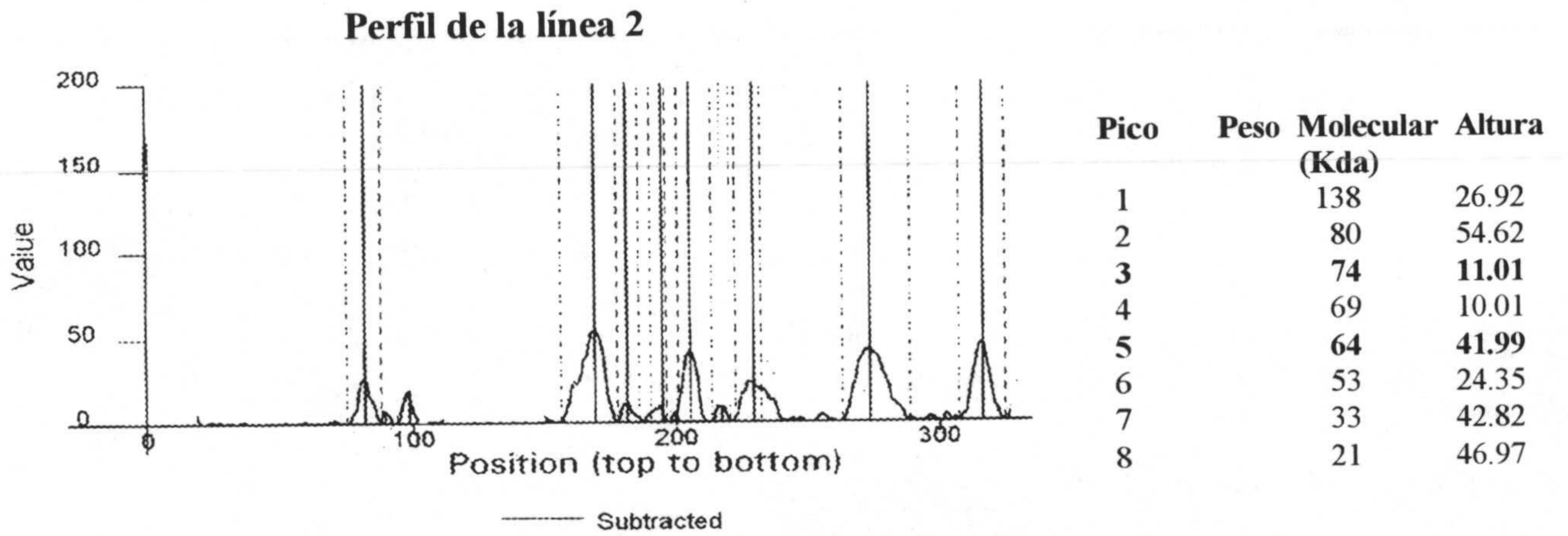
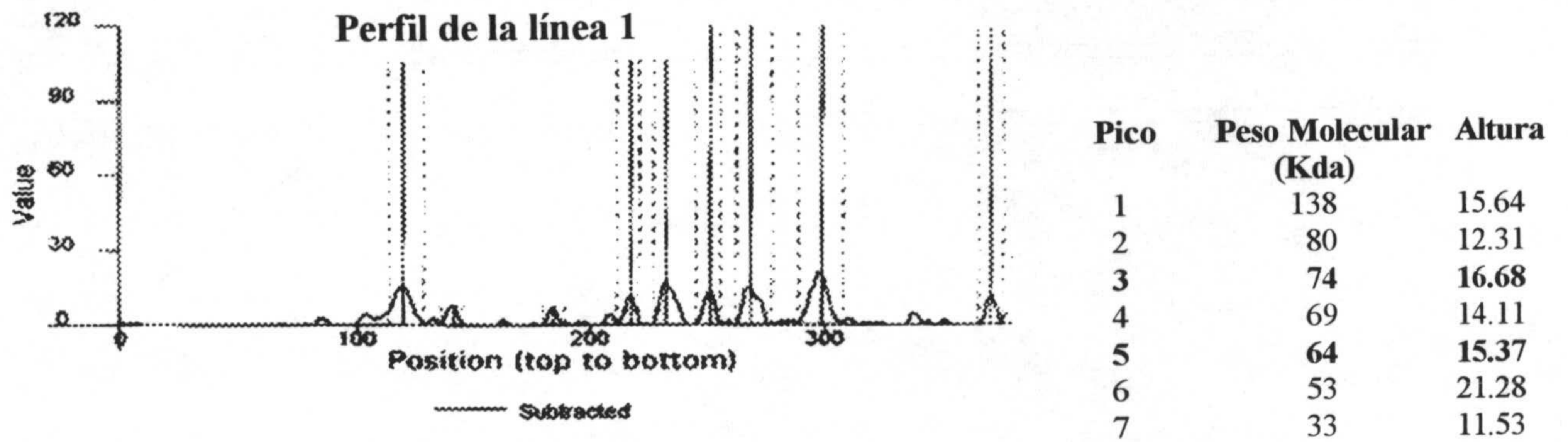


## Resultados

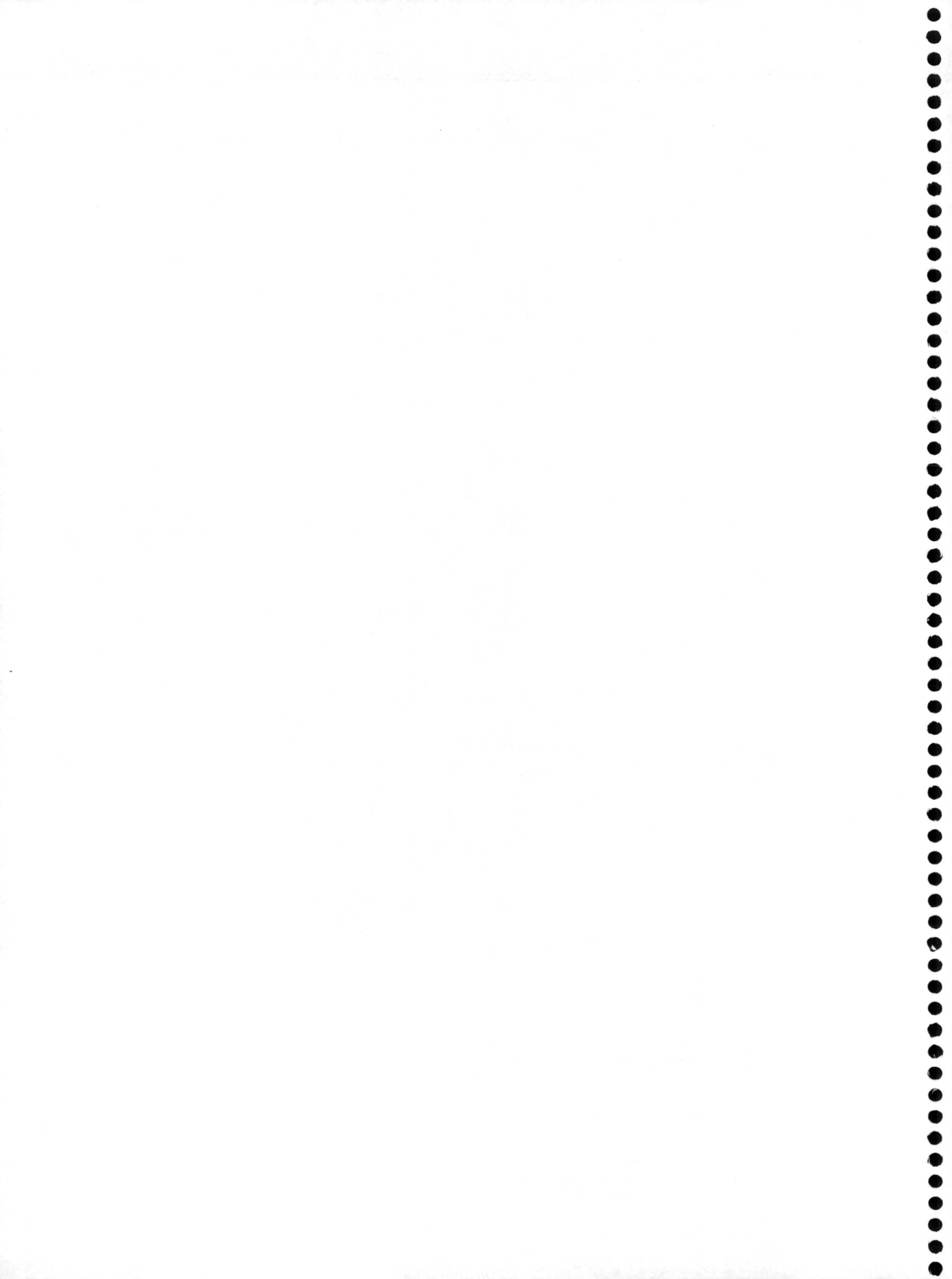


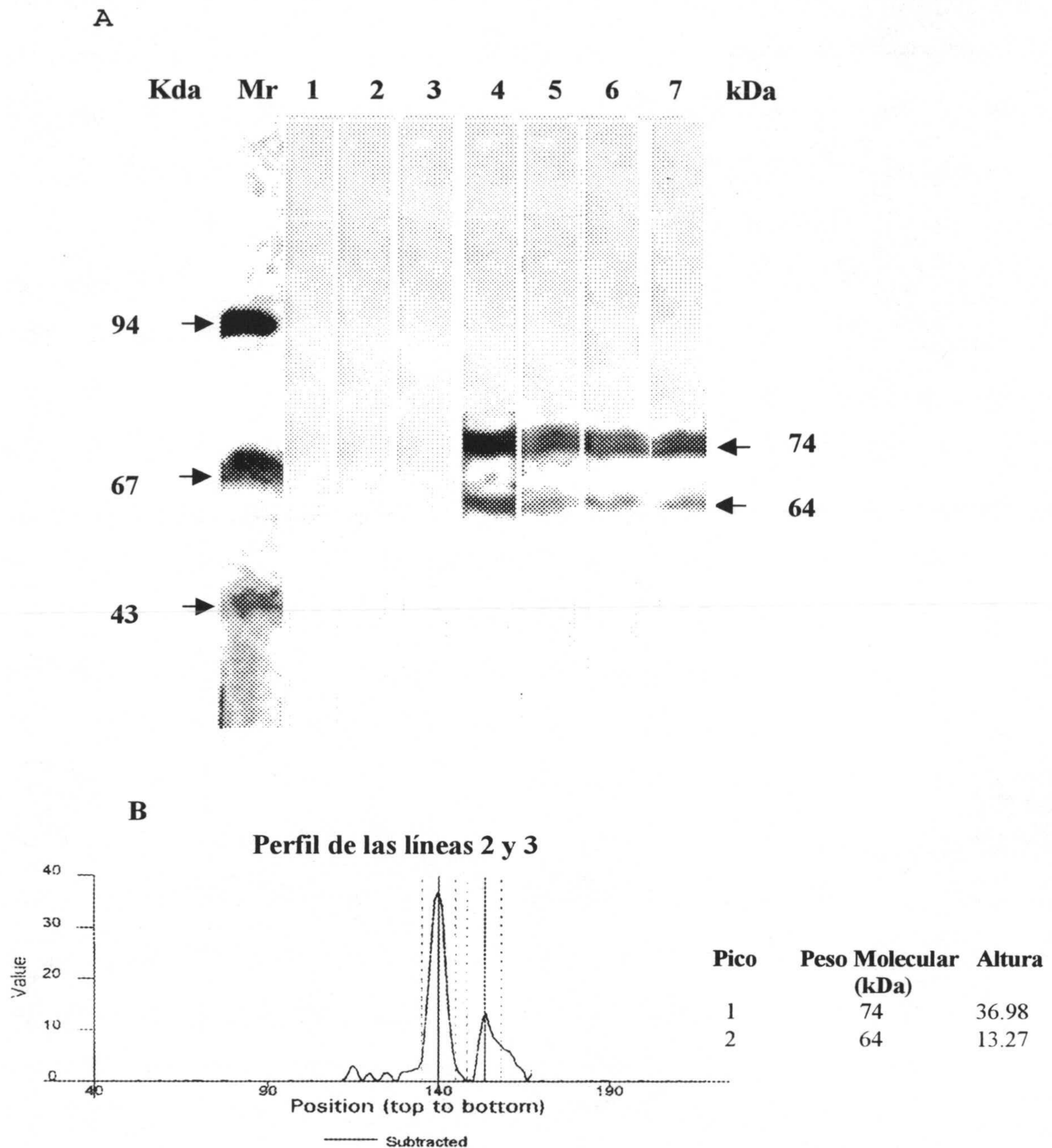
**Figura 23A:** Electroforesis en SDS-PAGE (7,5%) del extracto nuclear purificado por uno (línea 1) y dos ciclos de cromatografía de afinidad (línea 2). Línea Mr: proteínas marcadoras de peso molecular y concentración conocida. La cantidad de proteínas aplicada fue de  $\mu\text{g}$  para la línea 1 y  $\mu\text{g}$  para la línea 2.





*Figura 23B: Perfiles de las líneas 1, 2 y 3 de la figura 15A, que nos determina los pesos moleculares (kDa) de los polipéptidos mayoritarios.*

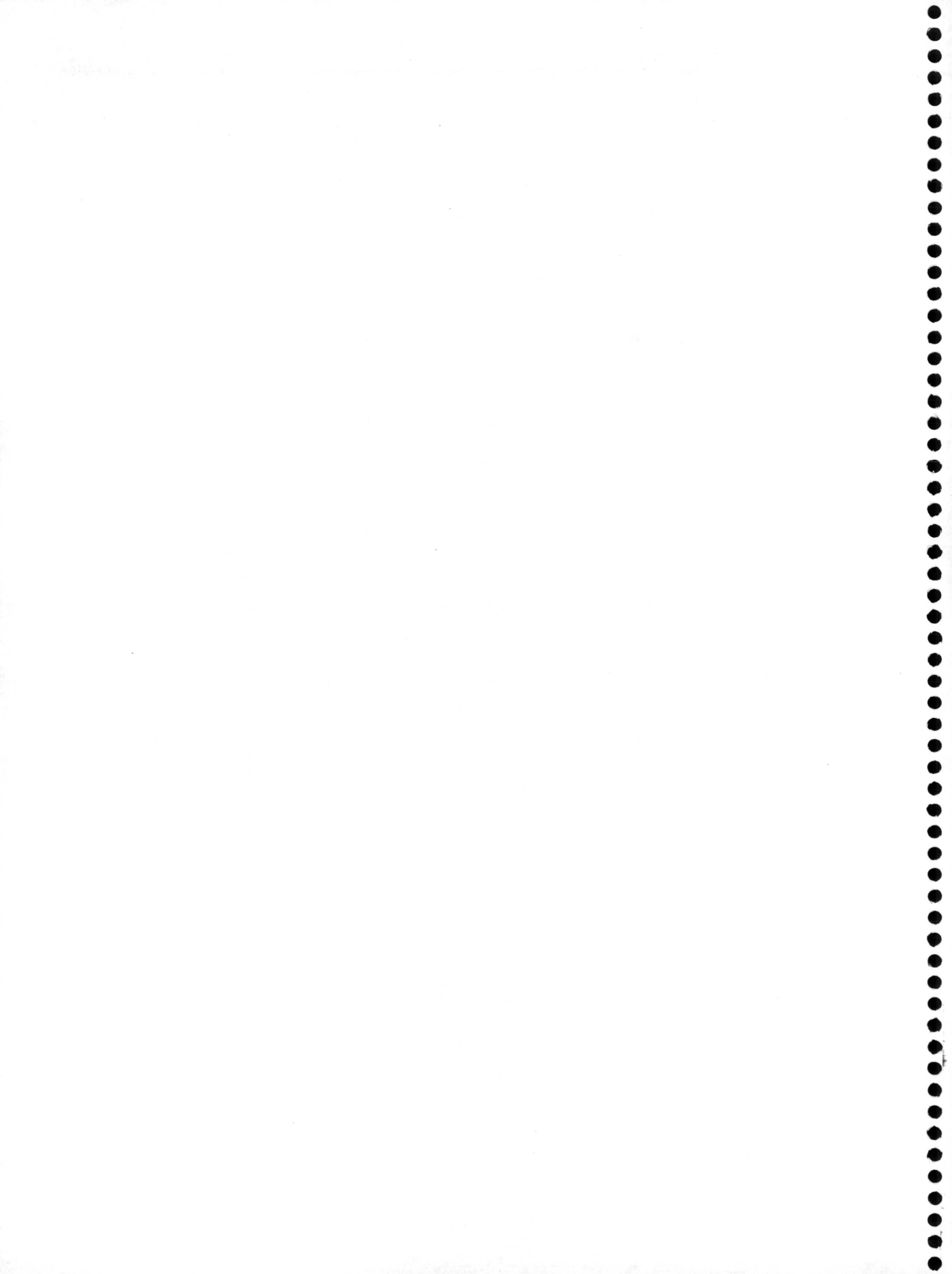


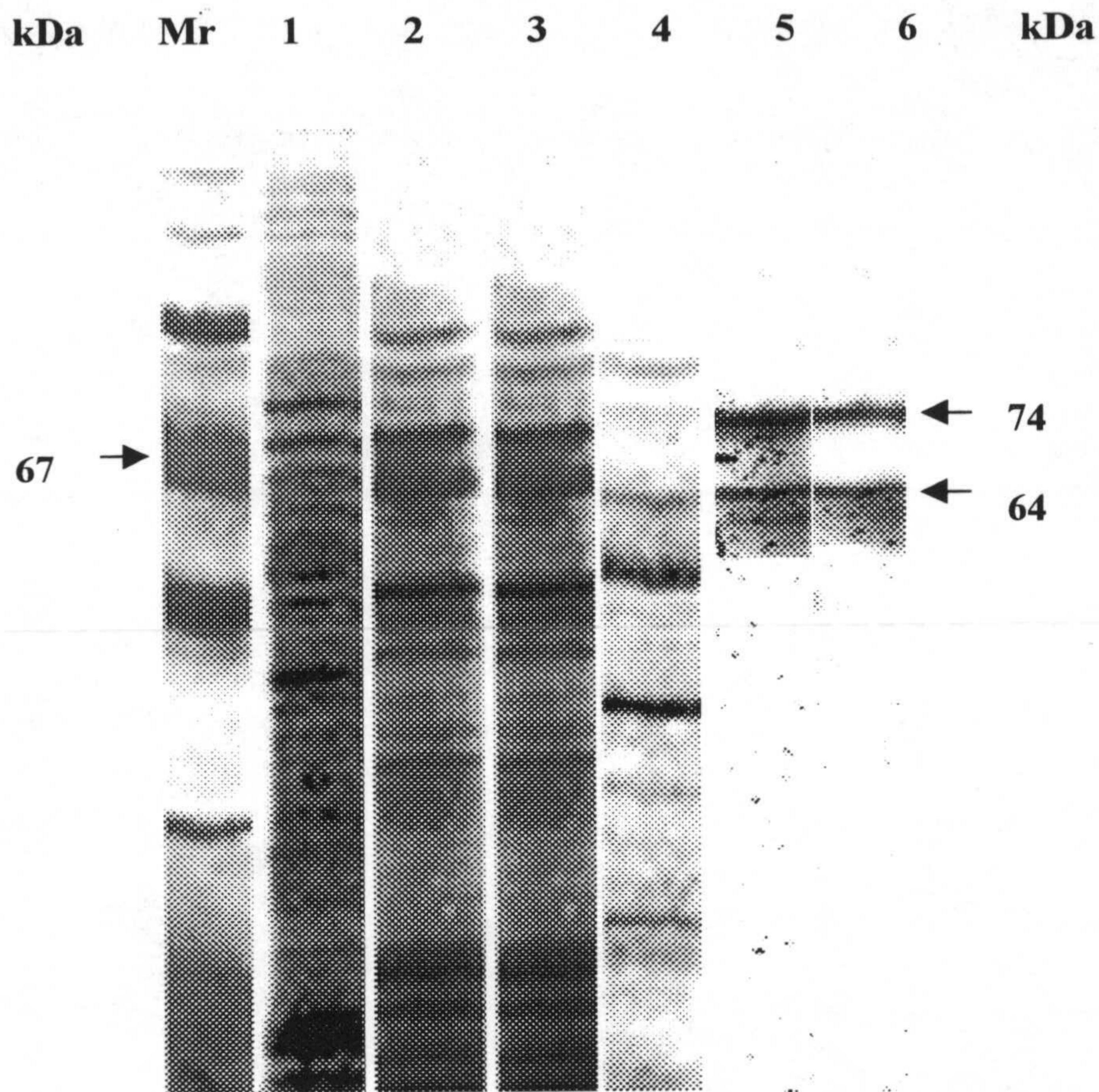


**Figura 24:** A) Inmunotransferencia del extracto nuclear purificado por uno (líneas 4 y 5) y dos ciclos (líneas 6 y 7) de cromatografía de afinidad, incubado previamente con  $10 \mu\text{M}$  de melatonina (líneas 4 y 6) y con  $10 \mu\text{M}$  CGP-5260 (líneas 5 y 7). Control sin incubar con melatonina (línea 1) y sin incubar con CGP-5260 (línea 2). Control sin incubar con anticuerpo frente a melatonina (línea 3).

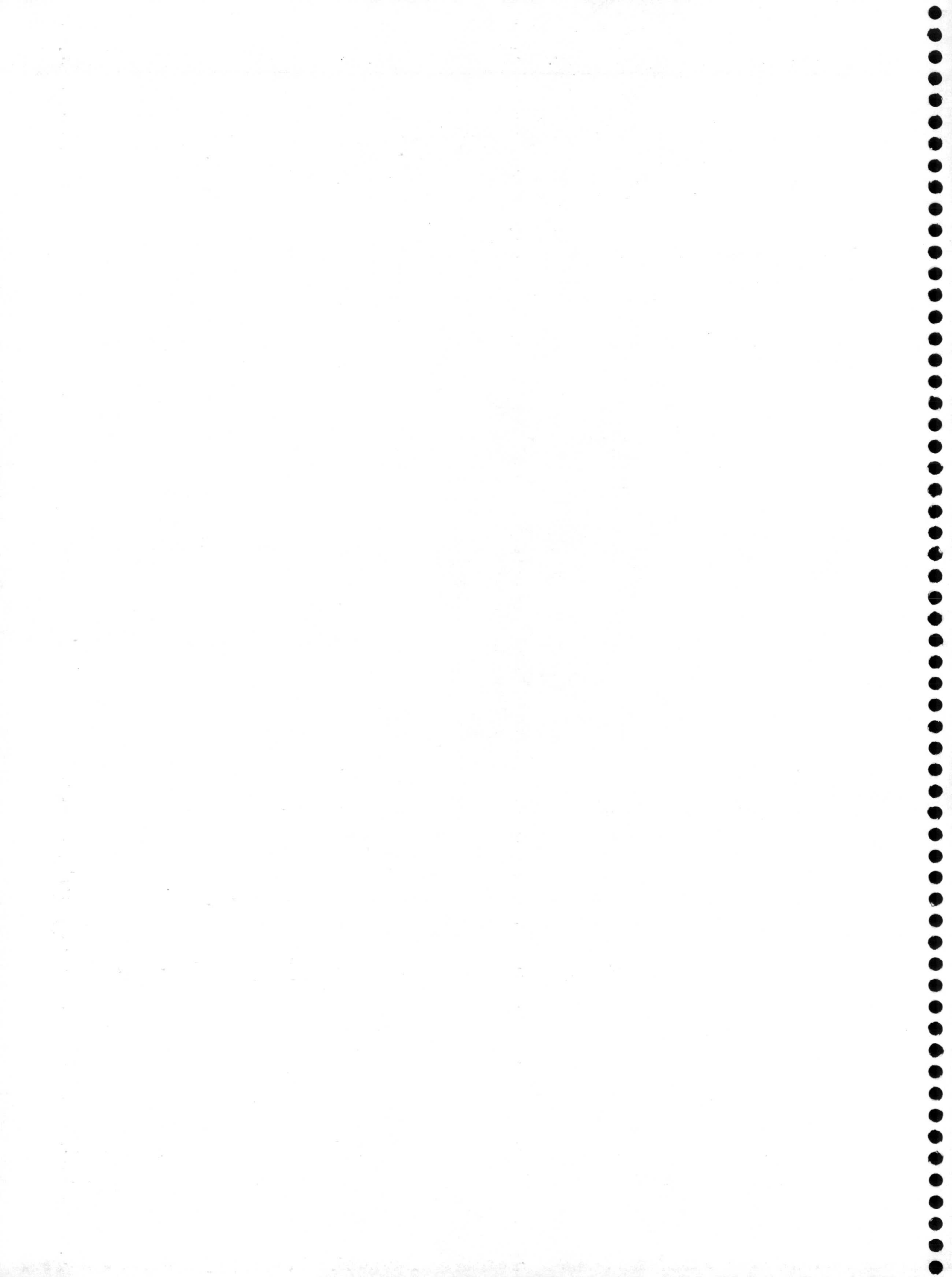
Línea Mr: proteínas marcadoras de peso molecular y concentración conocida.

B) Perfil de las líneas 2 y 3 que nos determina el peso molecular de los polipéptidos reconocidos por el anticuerpo frente a melatonina.

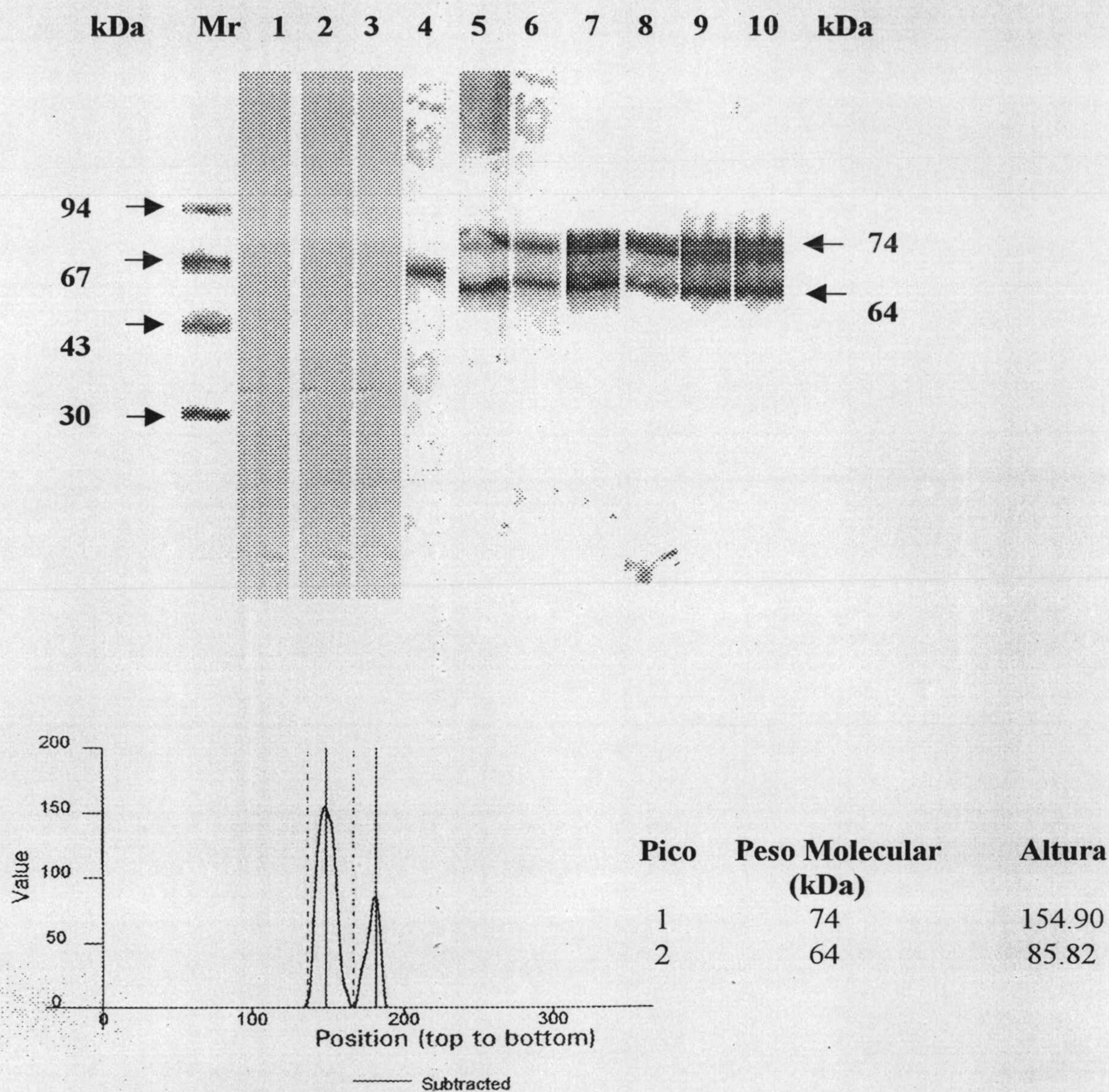




**Figura 25:** Electroforesis en SDS-PAGE (12,5%) y tñido con nitrato de plata de cada una de las etapas de purificación del extracto nuclear purificado por un ciclo de cromatografía de afinidad.: El extracto nuclear crudo (**línea 1**). El precipitado obtenido en la centrifugación del extracto nuclear crudo en presencia (**línea 2**) y ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (**línea 3**). El sobrenadante obtenido en la centrifugación del extracto nuclear (**línea 4**). Las muestras solubilizadas con Tritón X-100 y precipitada con 25-65% (**línea 5**) y 45-65 % (**línea 6**) de sulfato amónico

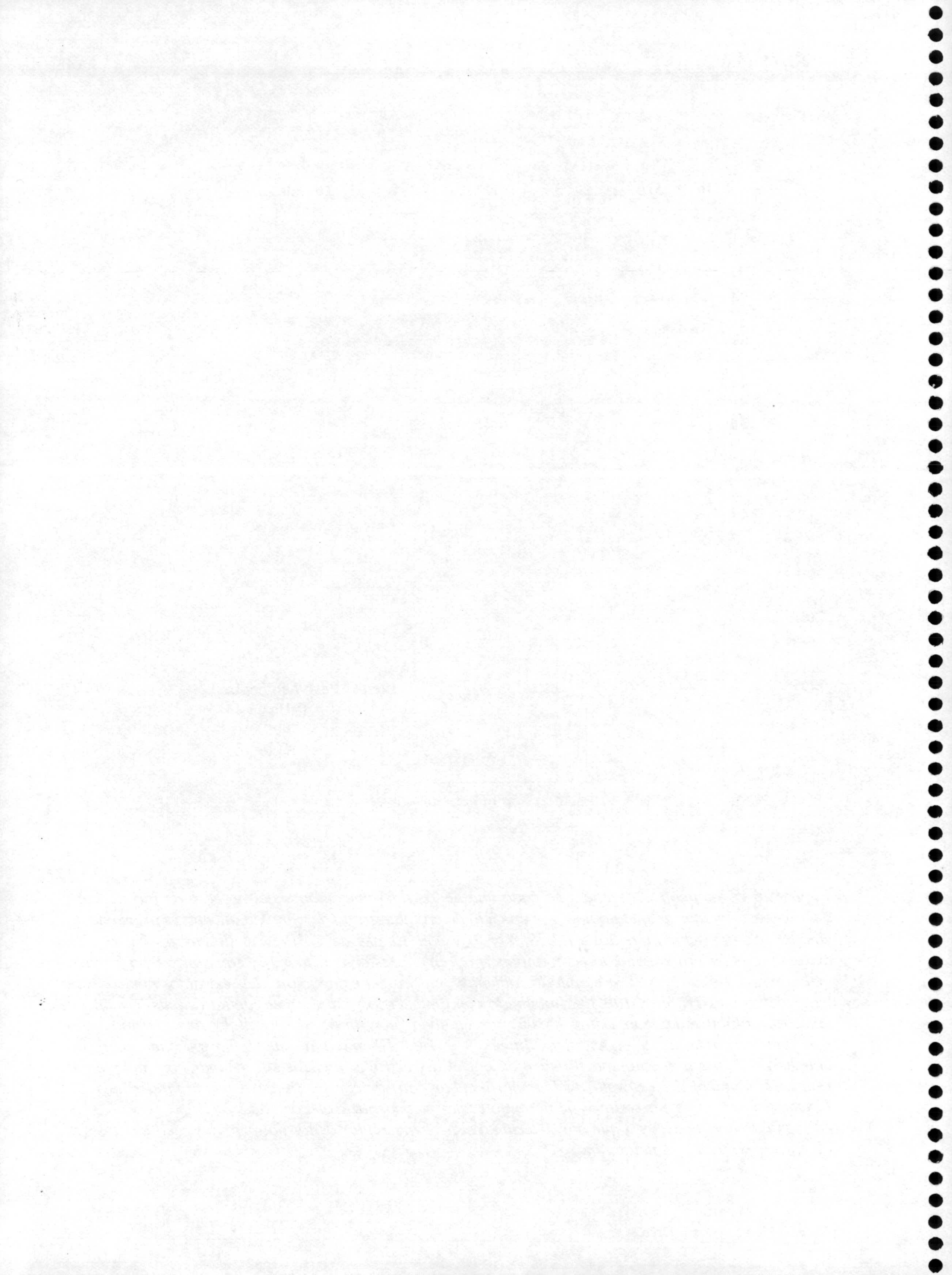




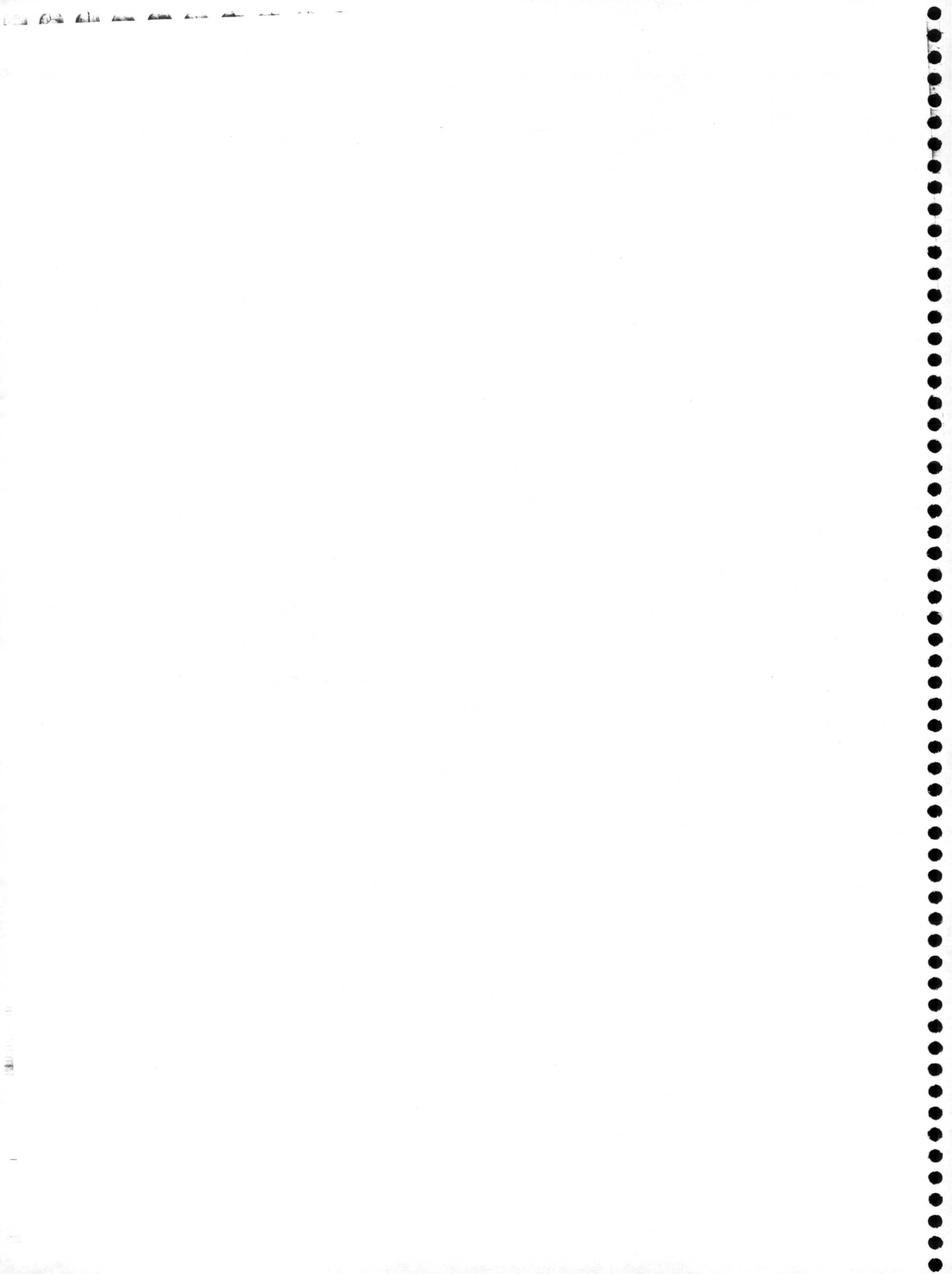


**Figura 26A:** Inmunotransferencia de cada una de las diferentes etapas del proceso de purificación del receptor nuclear de melatonina por un ciclo de cromatografía de afinidad, incubado previamente con  $10 \mu\text{M}$  de melatonina (líneas 3, 5, 7 y 9) y con  $10 \mu\text{M}$  de CGP-5260 (líneas 6, 8 y 10). El extracto nuclear crudo incubado con anticuerpo frente a histonas (línea 3) y con anticuerpo frente a melatonina (línea 5). El precipitado obtenido en la centrifugación del extracto nuclear sin tratamiento con Tritón X-100 1% incubado con anticuerpo frente a melatonina (líneas 7 y 8). La muestras solubilizadas con Tritón X-100 y precipitadas con 45-65 % de sulfato amónico incubado con anticuerpo frente a melatonina (líneas 9 y 10). Albúmina de suero bovino incubada con anticuerpo frente a melatonina (línea 4). Control del extracto nuclear sin incubar con melatonina (línea 1). Control del extracto nuclear sin incubar con anticuerpo frente a melatonina (línea 2). Línea Mr: proteínas marcadoras de peso molecular y concentración conocida.

B) Perfil de las líneas 2 y 3 que nos determina el peso molecular de los polipéptidos reconocidos por el anticuerpo frente a melatonina.



## 5.- DISCUSIÓN



## 5.- DISCUSIÓN

La melatonina, un compuesto indólico derivado del triptófano, se describió en principio como una hormona producida por la glándula pineal de los vertebrados. La característica principal de la melatonina es su secreción rítmica, que se refleja en la elevación de sus niveles circulantes durante la noche en casi todas las especies animales estudiadas, incluida la humana. Este aumento nocturno depende de un incremento en la síntesis y liberación de la hormona por la glándula pineal. El ritmo circadiano de melatonina sirve como una “señal hormonal de la noche”, siendo utilizada para sincronizar una serie de ritmos biológicos circadianos y estacionales con el ciclo día/noche. Por este motivo, la señal de la melatonina es esencial para una adecuada adaptación de los animales al medio (Klein y cols., 1992; Morgan y cols., 1994). Las primeras evidencias experimentales indicaban propiedades antigonaotrópicas para la melatonina (Wurtman y cols., 1968; Cardinali, 1981; Reiter, 1990), siendo ésta fundamental para regular los procesos reproductivos en los animales sometidos a reproducción estacional. La información que tenemos hoy en día sobre las acciones de la melatonina han cambiado profundamente desde los últimos 4 años. Hoy en día sabemos que la melatonina es una indolamina muy conservada desde el punto de vista filogenético, estando presente ya en organismos unicelulares de más de 2 billones de años de antigüedad. En mamíferos al menos, la melatonina se produce en diversos tejidos, además de la pineal, como son la retina, el timo, el linfocito y el intestino. Sus funciones van más allá de la regulación de la reproducción, y se considera como un protector celular conservado evolutivamente, con propiedades importantes en neuroinmunomodulación. Además, la melatonina se comporta como un excelente depurador de radicales libres, perteneciendo al conjunto de antioxidantes endógenos encargados de controlar el estrés oxidativo que el diario consumo de oxígeno produce en el organismo animal. Si bien la melatonina protege a la célula de los ataques que tienden a destruirla, es capaz de inhibir la proliferación celular regulando la cinética del ciclo celular (Blask and Hill, 1986; Cos y cols., 1991; Slominski y Pruski, 1993; Ying y cols., 1993).

La consecuencia lógica de el estudio de las acciones de la melatonina fue la búsqueda de su receptor celular. Además de los efectos antioxidantes, para los cuales la melatonina no necesita receptor, la mayoría de los estudios se dirigieron hacia la caracterización de un

receptor de membrana mediante técnicas de unión de ligando y De estas, se describieron hasta cuatro receptores de membrana ligados a proteína G, llamados Mel<sub>1a</sub>, Mel<sub>1b</sub>, Mel<sub>1c</sub> y Mel<sub>II</sub> autorradiografía (Dubocovich, 1983; White y cols., 1987; Krause y Dubocovich, 1990; Viswanathan y cols., 1990; Guerrero y Reiter, 1992; Pang y cols., 1993; Pontoire y cols., 1993; Reppert y cols., 1994; Ebisawa y cols., 1994; Morgan y cols., 1994; Calvo y cols., 1995).

Sin embargo, los estudios de distribución subcelular de uniones específicas de melatonina han mostrado su presencia no sólo en membranas celulares, sino también en citosol y núcleos, preferentemente. Estos datos explicarían el hecho de que la aparezca concentrada en los núcleos de diversos tejidos, como ha quedado demostrado por métodos de inmunohistoquímica y radionmunoensayo (Menéndez-Peláez y cols., 1993; Mennenga y cols., 1991). Además se ha observado que tanto la inyección exógena de melatonina como su producción endógena se correlaciona con su acumulación en núcleos (Mendéndez-Peláez y Reiter, 1993).

Por otro lado, existen una serie de efectos de la melatonina que sugieren una acción a nivel genómico por parte de este indol. La melatonina inhibe la expresión del gen de la 5-aminolevulinato sintetasa en la glándula de Harder, tanto en situaciones crónicas como agudas (Menéndez-Peláez y cols., 1991). Asimismo, la administración exógena de melatonina aumenta la expresión de los genes de la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa cobre-zinc y de la superóxido dismutasa manganeso, tanto en situaciones crónicas como agudas en cerebro de rata (Kotler y cols., 1998). La melatonina estimula la transcripción por incremento de la actividad de la ARN polimerasa II en preparaciones de núcleos "in vitro" de la glándula suprarrenal (Persengiev y cols., 1991).

La existencia de receptores nucleares para la melatonina ya ha sido sugerida en varios trabajos, Slominski y Pruski (1993) observaron uniones para [<sup>3</sup>H] melatonina (0,1 µM) en núcleos purificados de células de melanoma; estas uniones llegaban a ser saturables y la unión era reversible, ya que aumentando las concentraciones de melatonina no marcada se conseguía desplazar la [<sup>3</sup>H] melatonina de los lugares de unión. Sin embargo, los autores no pudieron ir más allá, puesto que dada la baja actividad específica de la melatonina tritiada (40-60 Ci/mmol), era imposible caracterizar más específicamente dichos sitios de unión.

La obtención (Vakkuri y cols., 1987) de la melatonina yodada (2-<sup>125</sup>I-iodomelatonina) con una actividad específica mucho más alta que la tritiada (200-2200 Ci/mmol) ha proporcionado una ayuda importante en la búsqueda del receptor de melatonina. Los primeros estudios sobre la existencia de sitios de unión específicos para 2-<sup>125</sup>I-iodomelatonina demostraron, además de su localización en membranas celulares, la presencia de un 30 a un 60 % de uniones específicas en el núcleo (Yuan y Pang, 1990); Persengiev, 1992; Poon y Pang, 1992). Sin embargo, en esos trabajos nunca se sugirió la posibilidad de que esas uniones fueran receptores específicos de melatonina en el núcleo celular.

Estudios posteriores llevados a cabo por Acuña-Castroviejo y cols., (1993, 1994) demostraron la existencia de sitios de unión con alta afinidad para la melatonina en núcleos de hepatocitos de rata. La unión específica de la <sup>125</sup>I-iodomelatonina al homogenizado de núcleos cumplía los criterios de receptor, ya que dicha unión es rápida, reversible, saturable, de alta afinidad y presenta selectividad farmacológica.

A partir de estas premisas, nos propusimos como primer objetivo en la purificación y caracterización del receptor nuclear de melatonina, comprobar la eficacia y bondad en el aislamiento de los núcleos a partir de hepatocitos de rata (Blum y cols., 1987; ligeramente modificada por nosotros). Con este propósito realizamos en primer lugar un análisis ultraestructural del precipitado obtenido tras el aislamiento de núcleos en gradiente de sacarosa, mediante microscopía electrónica de transmisión. Dicho análisis demostró la presencia de una gran mayoría de núcleos con su envoltura nuclear intacta. El análisis cuantitativo de dicho precipitado mediante citometría de flujo, dio como resultado que más del 45 % de las partículas aisladas eran núcleos intactos. La determinación, por ambos métodos del tamaño de los núcleos aislados coincide, oscilando entre 4 y 8 micras. La explicación de esta variación en el tamaño puede deberse a que una gran cantidad de hepatocitos (más del 50 %) son poliploides (contienen dos o más veces la cantidad normal de ADN), y existe una correlación entre el tamaño nuclear y la poliploidia.

El segundo objetivo y como paso previo a la localización de un receptor funcional de melatonina, se estudió la localización nuclear de la hormona mediante el uso de anticuerpos anti-melatonina. La calidad de los anticuerpos utilizados es crítica a la hora de este estudio. El primer trabajo relativo a la localización de la melatonina y del precursor de la misma, N-acetilserotonina, por técnicas inmunohistoquímicas se realizó hace 20 años por Bubenik y

colbs. (1974). Aproximadamente sobre las mismas fechas, tres grupos diferentes de investigadores realizaron estudios inmunoreactivos para determinar la localización de la melatonina en el aparato digestivo (Raikhlin y cols., 1975; Bubenik y cols., 1977; Holloway y cols., 1980). Nuevamente, la metodología utilizada dificultó la determinación exacta de la localización de las células positivas a melatonina. Sin embargo, como su localización preferencial era el estómago y duodeno se asumió que, probablemente, la melatonina inmunoreactiva estaba presente en las células argentafines. En estos trabajos se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia, tanto por su relativa simplicidad, como por el hecho de que era un método que permitía la cuantificación de los resultados obtenidos. Pero tanto la utilización de anticuerpos que presentaban relativamente alta reacción cruzada con otros indoles, como la N-acetilserotonina (6 %) y la 6-hidroximelatonina (3,5 %) y el uso de grandes concentraciones de anticuerpo (diluciones 1:10 y 1:20) no hablan, en nuestra opinión, muy a favor de la sensibilidad del método. Por otro lado, la resolución de las microfotografías presentadas en los trabajos publicados usando esta técnica no permiten afirmar que la reacción positiva a la melatonina fuese exclusivamente citoplasmática, como los autores proponían.

Con posterioridad Vivien-Roels y cols., (1981) utilizaron cuatro anticuerpos diferentes de baja reacción cruzada con otros indoles, aunque utilizados en alta concentración (diluciones 1:20 a 1:100). Mediante la técnica de inmunofluorescencia, estos autores localizaron la melatonina en la glándula pineal, retina y glándula de Harder en una gran variedad de vertebrados (hamsters, ratones, ratas, serpientes, peces, tortugas y ardillas). Asimismo, Vivien-Roels y cols. (1981) obtuvieron diferencias en la inmunorreactividad de la melatonina entre el día y la noche, aunque los datos variaban sustancialmente de unas especies estudiadas a otras. En las microfotografías que acompañan al trabajo, si bien los autores no lo mencionan, el marcaje nuclear de las células pertenecientes a la retina de tortugas y hamsters está puesto claramente de manifiesto.

Por medio de técnicas de inmunohistoquímica se consiguió un aumento considerable en la resolución de los resultados conducentes a la localización de melatonina en los tejidos. Uno de los avances más importantes fue el empleo de anticuerpos capaces de trabajar a diluciones elevadas para métodos de inmunofluorescencia y de peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP), ya que el ruido de fondo disminuye considerablemente. En estudios realizados en pineal y glándula de Harder de visón (Tillet y cols., 1989; Meusy-Desolle y Tillet, 1992) se mejoró



la especificidad del método, describiéndose la inmunolocalización de la melatonina citosólica. Las publicaciones muestran que el marcaje está principalmente concentrado en el núcleo celular tanto en el caso de la glándula pineal como en la de Harder. Nuestros resultados coinciden con otros trabajos más actuales en los que se demuestra por inmunohistoquímica la localización de la melatonina en el núcleo celular de los tejidos estudiados (Mennenga y cols., 1990; Menéndez-Peláez y cols., 1993). Si bien estos trabajos se basan sólo en estudio a microscopía óptica, ambos concluyen que la localización nuclear de la melatonina presumiblemente estaría asociada a la cromatina.

En nuestros estudios la utilización de una técnica inmunocitoquímica, mediante el uso de anti-IgGs marcadas con oro coloidal nos brindaba la oportunidad de observar "in situ" la localización subcelular de la melatonina. Los dos principales aspectos a considerar antes de discutir los resultados obtenidos en el estudio inmunocitoquímico son los métodos de fijación y el tipo de resina de inclusión usada. La finalidad es que se preserven al máximo no sólo las estructuras, sino también la antigenicidad (Knetch, 1991).

Menéndez-Peláez y Reiter, (1993) sugirieron que el hecho de utilizar tejidos no fijados o fijados pobremente (acetona, alcoholes) podría haber motivado la utilización de altas concentraciones de anticuerpo para conseguir la observación de parte del producto inmunoreactivo. Estos fijadores no conservan muy bien la estructura del tejido y probablemente desnaturalicen las proteínas a las que habitualmente se une la melatonina dejando libre a ésta y con grandes posibilidades de perderse en algunos de los pasos de la técnica. Por el contrario el estudio de fijadores que contienen paraformaldehído/glutaraldehído (como los utilizados en nuestros experimentos), son más útiles a la hora de conservar las estructuras. Estos fijadores facilitan la utilización de bajas concentraciones de anticuerpo, ya que la melatonina permanece unida a dichas estructuras intactas y por tanto se marcará más fácilmente. De esta forma se obtiene una mejor definición del marcaje nuclear de la hormona. Esta misma metodología fue utilizada por Hild-Petito (1991) para determinar la localización del receptor de andrógenos.

El glutaraldehído es un lento pero altamente eficiente fijador que reacciona con proteínas, produciendo la eliminación de agua y la consiguiente contracción de los tejidos. En nuestros estudios la fijación se llevó a cabo con glutaraldehído al 0,5 % necesaria para hacer insolubles los antígenos, preservar la estructura y evitar una sobrefijación por aldehídos. La sobrefijación por aldehídos pueden provocar enlaces cruzados entre proteínas y péptidos, de

tal manera que los epítomos no estén disponibles para ser reconocidos por el anticuerpo aplicado. En este sentido también se evitó la postfijación con tetróxido de osmio, uno de los fijadores más finos para la observación ultraestructural con el microscopio electrónico, pero que desgraciadamente enmascara la antigenicidad mostrada para proteínas.

Con respecto a la resina de inclusión usada en nuestros experimentos, llevamos a cabo varios ensayos previos con cortes incluidos en distintas resinas. Conseguimos una buena resolución y antigenicidad de las muestras en secciones incluidas en resinas tipo epoxi (Epon-812). La utilización de este tipo de resinas, que posee una baja capacidad de absorción de agua y con pocos grupos hidrofílicos en su estructura, necesitan la presencia de agentes intermediarios (como por ejemplo el óxido de propileno) para su solubilización.

El procedimiento inmunocitoquímico de postinclusión consiste esencialmente en incubar los cortes ultrafinos (50 nm de espesor) montados sobre rejillas de níquel de malla 300 con una serie de reactivos, pasando por unos lavados intermedios. Las rejillas se hacen flotar invertidas por la cara que lleva los cortes, sobre los diferentes reactivos. Es importante que entre los diferentes pasos los cortes no se sequen, ni se moje la otra cara al hundir las secciones en la gota de solución que contiene el anticuerpo marcado (pues en ambos casos se aumenta el marcado no específico). Tampoco deben usarse rejillas de cobre, pues las prolongadas incubaciones oxidan las rejillas y se producen precipitados densos a los electrones. Antes de aplicarse el anticuerpo marcado deben bloquearse los grupos químicos de las secciones que reaccionan inespecíficamente con los reactivos inmunológicos. El uso de albúmina de suero bovino (BSA) como reactivo bloqueador provocaba una gran cantidad de ruido de fondo que nos impedía visualizar las muestras a microscopía electrónica. Por este motivo tuvimos que eliminarla, tanto de las soluciones bloqueadoras, como de todas las soluciones utilizadas en inmunocitoquímica.

Finalmente las secciones deben someterse a un contrastado apropiado con acetato de uranilo, suficiente para visualizar los núcleos mediante microscopía, pero que no oculte la localización del oro, cuyo tamaño, forma y densidad uniforme permite distinguir fácilmente estas partículas de otras estructuras celulares en microscopía electrónica. Teniendo en cuenta la versatilidad del oro coloidal para unirse a un gran número de macromoléculas, su escasa adsorción inespecífica a las resinas inmunocitoquímicas (muy útil en el uso de técnicas de postinclusión) y la posibilidad de poder preparar partículas de oro de varios tamaños (10-20

nm), hacen de éste uno de los marcadores mas usados en microscopía electrónica y a partir del cual han derivado numerosas técnicas (Hayat, 1989). Todo esto junto con la utilización de un método directo, con el que conseguimos disminuir la distancia desde el marcador al antígeno (el marcador esta separado del antígeno por una sola IgG), fue suficiente no sólo para conseguir una mayor resolución, sino también para comprobar que la unión de las partículas de oro al anticuerpo frente a melatonina no modificó la eficacia de éste.

Después de asegurarnos que el procedimiento inmunocitoquímico utilizado fue el más adecuado, el mejor resultado en la visualización de los núcleos a microscopía electrónica de transmisión se consiguió incubando durante 1,5 h con una dilución 1:14.000 del anticuerpo marcado

Las partículas de oro se distribuyen uniformemente por todo el núcleo y al disminuir la concentración del anticuerpo marcado, hasta casi allímite de la sensibilidad del método, dichas partículas de oro se localizan preferentemente alrededor de la membrana interna del núcleo. Estos resultados coinciden con los últimos estudios de radioinmunoensayo llevado a cabo por Acuña-Castroviejo (sin publicar). Sin embargo, con estos resultados no podemos cuantificar la distribución de la melatonina intranuclear. En estudios posteriores se podría llevar a cabo un análisis cuantitativo de esta distribución mediante técnicas morfométricas o estereológicas. En las reacciones inmunocitoquímicas es posible calcular, fácilmente, la densidad de marca en un determinado compartimento celular cuando se utilizan marcadores en forma de partícula, como por ejemplo el oro coloidal (Griffiths y cols., 1986).

En el caso de núcleos de ratas pinealectomizadas, utilizados como control interno en los estudios de inmunocitoquímica, no se observó la presencia de partículas de oro. Estos resultados parecían indicar el origen exclusivamente pineal de la melatonina presente en el núcleo de hepatocitos de rata. Los estudios por citometría de flujo han indicado, sin embargo, presencia de fluorescencia en los núcleos de hepatocitos de ratas pinealectomizadas. El análisis por citometría de flujo, a diferencia del realizado mediante otras técnicas como la inmunofluorescencia directa, nos permite medir rápidamente e "in situ" una suspensión de núcleos, sin tener que manipular las muestras antes de ser medidas. En el procedimiento llevado a cabo para medir la fluroescencia de las muestras mediante citometría de flujo, se tuvo en cuenta el uso de detergentes no iónicos (Tritón X-100 al 0,1 %) para producir suspensiones

monodispersas de núcleos puros y permeabilizar parcialmente la envoltura nuclear que permitiera el paso de moléculas como las IgGs.

A la vista de estos resultados podemos concluir diciendo que la melatonina se localiza de forma significativa en el núcleo celular de hepatocitos rata lo que, junto a los posibles efectos genómicos de la melatonina descritos al principio de esta discusión, sugiere la existencia de un receptor nuclear para la misma. Asimismo, los datos obtenidos en ratas pinealectomizadas por citometría parecen indicar que una parte de la melatonina presente en el núcleo procede de otra fuente distinta de la pineal.

Mediante estudios de radioinmunoensayo (Menéndez-Peláez y cols., 1993b), técnica más sensible aún que la inmunocitoquímica, se ha detectado presencia de melatonina en el citosol. Esta diferencia con respecto a los resultados de inmunocitoquímica hacen pensar que la melatonina se encuentra libre en el citosol, perdiéndose durante el procesamiento necesario durante la inmunocitoquímica. El mantenimiento del marcaje nuclear sugiere que la melatonina se encuentra anclada a alguna proteína que impide su degradación. Un paralelismo con estos resultados de la melatonina en cuanto a la localización intracelular se refiere, se ha encontrado en el estudio de diversos receptores nucleares. En estos casos se piensa que los receptores citoplasmáticos se unen a la hormona y rápidamente son trasladados al interior de los núcleos (Gorski y cols., 1968; Jensen y cols., 1968; Siiteri y cols., 1973) Con la producción de anticuerpos específicos y el desarrollo de técnicas inmunocitoquímicas, se observó que los receptores de vitamina D<sub>3</sub> (VDR), hormona tiroidea (T<sub>3</sub> R), ácido retinoico (RAR) (Clemens y cols., 1988; Oppenheimer y cols., 1979; Walters y cols., 1981), así como los receptores esteroideos para andrógenos, estrógenos y progesterona, se localizan en el núcleo en ausencia de hormona (Perrot-Appianat y cols., 1985; King y cols., 1984), y así se diferencian de otros receptores como los de los glucocorticoides. En este sentido, diversos estudios han indicado la presencia de inmunoreactividad correspondiente a receptores de glucocorticoides en el citoplasma, sugiriendo una difusión del receptor desde el núcleo al citosol en ausencia de hormona (Gasc y cols., 1989). Aunque la localización citosólica de receptores nucleares no está muy clara, lo que si parece evidente es que todos los receptores residen en el núcleo después de la administración de la hormona correspondiente. En definitiva, la traslocación de los receptores presentes en el citosol al núcleo puede ocurrir por dos mecanismos principalmente: la difusión de las proteínas a través de la membrana nuclear y la interacción de las proteínas con

los poros nucleares, proceso mediado por una señal de translocación de dicha proteína (Dingwall y cols., 1986). En el primer mecanismo el límite de exclusión de proteínas esféricas es de 67 kDa (Giguere y cols., 1987), aunque la forma elíptica del receptor esteroideo (Evans, 1988) debe facilitar su difusión a pesar de su gran tamaño.

La disponibilidad de la [<sup>125</sup>I]-iodomelatonina como radioligando de alta actividad específica, ha permitido la caracterización bioquímica y farmacológica de sitios de unión de alta afinidad de la melatonina a proteínas nucleares en hepatocitos de rata, mediante técnicas de unión de ligando (Acuña-Castroviejo y cols., 1993, 1994). Este hecho junto a su alta tasa metabólica hacen de este tejido uno de los más adecuados para purificar el receptor nuclear de melatonina.

Por su similitud con los problemas presentados en la purificación de los receptores nucleares de las hormonas esteroideas y tiroideas (Litwack, 1990), hay que tener en cuenta las siguientes cuestiones:

- *La baja concentración de receptores nucleares que existe en los distintos órganos.* Para soslayar este problema, desarrollamos un método con el que no hubo pérdida significativa, tanto cualitativa como cuantitativa de las proteínas ó receptores objeto de la purificación, al contrario de lo que ocurre en métodos convencionales (Ichikawa y cols., 1986). Además, con este procedimiento eliminamos la necesidad de centrifugaciones a alta velocidad, necesario en los métodos convencionales que usan gradientes de sacarosa de elevada densidad (2,1-2,3 M) (Apriletti y cols., 1988). Sin embargo, el uso de homogenizaciones extensas realizadas con nuestro método, libera enzimas proteolíticas que pueden fragmentar el receptor u otras proteínas. Para prevenir esta proteólisis, todos los extractos nucleares utilizados se trataron desde el principio con una mezcla de distintos inhibidores de proteasas (PMSF, leupeptina, pepstatina A y EDTA) (Lomasney y cols., 1986; Rivkess y cols., 1990). La adición de ADNasa y ARNasa hasta una concentración máxima de 20-25 µg/ml, junto a heparina sódica (39 µl/ml) elimina un alto porcentaje de ácidos nucleicos cuya presencia, como había sido demostrado previamente (Acuña-Castroviejo y cols., 1994) aumenta las uniones inespecíficas.

- *La obtención de una resina específica* para poder llevar a cabo mediante cromatografía de afinidad la purificación del receptor en una sola etapa, aumentando el rendimiento si alterar o

degradar las características de éste, y eliminar de esta manera la mayoría de los métodos cromatográficos convencionales (Oppenheimer y cols., 1972; Latham y cols., 1976; Silva y cols., 1977; Apriletti y Baxter, 1981; Ichikawa y DeGroot, 1987).

Los estudios iniciales para la preparación de la agarosa-melatonina, se llevaron a cabo incubando 5-10  $\mu\text{mol}$  de 6-hidroxi-melatonina por cada ml de Epoxi-Sepharosa 6B. Sin embargo, el máximo rendimiento del proceso se obtuvo usando entre 10-30  $\mu\text{mol}$  de 6-hidroximelatonina por cada ml de Epoxi-Sepharosa 6B. Esta proporción aseguraba en la preparación final de la resina una unión aproximada de 1-3  $\mu\text{mol}$  ligando/ml gel.

Previamente a la purificación del receptor por cromatografía de afinidad, las proteínas presentes en el extracto nuclear se solubilizaron mediante el tratamiento del mismo con varios detergentes no iónicos y posterior centrifugación. De esta forma, además de liberar las proteínas asociadas a las membranas nucleares, se eliminan los restos de las mismas que pudieran interferir en el procesamiento posterior. Este procedimiento, junto con la separación del extracto nuclear crudo en distintas fracciones mediante precipitación con sulfato amónico, permitió aumentar el rendimiento en la purificación del receptor.

En la tabla XI se observa que el mayor porcentaje de recuperación de receptor, purificado por un solo ciclo de cromatografía de afinidad, se obtiene en las fracciones solubilizadas totalmente, es decir, tratadas con detergentes no iónicos y precipitadas con 25-65 % de sulfato amónico. Además como se observa en la figura 24. , el número de proteínas separadas en SDS-PAGE (12,5%) y teñidas con nitrato de plata se reduce a medida que aumentamos la solubilización del extracto nuclear mediante detergentes y precipitación con sulfato amónico. Todo esto demuestra que las etapas previas a la purificación por cromatografía de afinidad fueron muy eficientes, no sólo para la obtención de una mayor cantidad de receptor, sino que al eliminar una gran cantidad de proteínas por precipitación con sulfato amónico disminuye las posibles interacciones entre ellas durante la purificación.

La resina una vez preparada se incubó con las distintas muestras del extracto nuclear solubilizado mediante dos métodos diferentes: adsorción en vaso de precipitado y a través de columna, sin observar en un principio diferencia alguna en el rendimiento final de la cromatografía entre estos dos métodos. Sin embargo, la adsorción en vaso de precipitado fue óptima cuando el volumen de la resina era menor a 10 ml y cuando las muestras usadas

provenían de extracto nuclear crudo, con una concentración elevada de proteínas. Este procedimiento fue estandarizado para todos los estudios posteriores. El paso a través de columna se optimizó para volúmenes de resina superiores a 10 ml (Caron y cols., 1979).

La resina se mezcló con las muestras del extracto nuclear solubilizado durante un período de tiempo que oscilaba entre 24-36 h. Una vez finalizado éste, la resina se lavó abundantemente hasta no detectar proteínas en las soluciones de lavado. Después del lavado, sólo las proteínas presentes en las muestras con alta afinidad para la melatonina quedan retenidas en la resina. Dichas proteínas se eluyen incubando la resina con melatonina 10  $\mu$ M durante 6 h. En ensayos posteriores, aumentando el tiempo de incubación hasta 12 h, se consiguió una mayor recuperación de proteínas, tal y como podemos observar en las figuras 11 y 15. Para aumentar optimizar aún mas el procedimiento de purificación del receptor por cromatografía de afinidad, el eluido obtenido en el primer ciclo de cromatografía se sometió a un segundo ciclo, lo que hemos denominado repurificación, tal y como podemos observar en la tabla XI y en la Figura 22.

El estudio electroforético y de inmunotransferencia de las proteínas obtenidas tras la purificación del extracto nuclear por cromatografía de afinidad (usando una concentración de ligando de 5-10  $\mu$ mol/ml gel y un tiempo de elución de 6 h) reveló la presencia de una banda, con un peso molecular de 64 kDa y con un punto isoelectrico ácido. Los estudios realizados por autorradiografía demostraron que esta proteína de 64 kDa se unía covalentemente a la 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina. Tal como demuestran los resultados de electroforesis bidimensional e inmunotransferencia (figura 13), en esta misma banda hay incluida dos proteínas, con el mismo peso molecular y distinto punto isoelectrico (6,76 y 6,62 respectivamente).

El estudio electroforético de las proteínas purificadas bajo las condiciones que permitieron una mayor eficiencia y rendimiento en la cromatografía de afinidad (con una concentración de ligando de 10-30  $\mu$ mol/ml gel y un tiempo de elución de 12 h) reveló la presencia de dos bandas, tanto si se utilizaba la tinción con plata, como si se utilizaba la de azul coomassie. De estas dos bandas, una corresponde a 64 kDa igual a la obtenida por el procedimiento anterior y otra corresponde a 74 kDa. Cuando se incuban en presencia de melatonina, estas dos proteínas son reconocidas por el anticuerpo anti-melatonina usado por

nosotros, sugiriendo que dichas proteínas podrían ser identificadas como el receptor(es) nuclear de esta hormona.

Para asegurar la especificidad de la unión entre estas proteínas nucleares y la melatonina, utilizamos el CGP-52608. Este compuesto sintético es un agonista funcional de la melatonina, con mas afinidad que ésta para unirse y activar all receptor nuclear de melatonina identificado como RZR/ROR, pero que sin embargo no es capaz de unirse a otros receptores nucleares (Weisenberg y cols., 1995). Los resultados obtenidos indican que este ligando se une solamente y con alta afinidad a las dos bandas de proteínas de 64 y 74 kDa purificadas por nosotros, apoyando aún mas su identificación como el receptor nuclear de melatonina. Estas proteínas parecen estar en la fracción soluble del núcleo o unidas a la membrana del mismo, no tratándose de proteínas asociadas al ADN como las histonas, ya que ya que tal como se observa en la figura 18, el anticuerpo antihistonas no las reconoce. (Latham y cols., 1976).

Estos resultados electroforéticos y de inmunotransferencia plantean una importante cuestión sobre la posible relación y significado de esas dos proteínas identificadas como posibles receptor(es) de la melatonina. La primera posibilidad es que el componente de 64 kDa sea un derivado proteolítico del componente de 74 kDa, como resultado de una modificación postsintética del receptor. Nosotros estudiamos esta posibilidad, no observando diferencia alguna en la distribución relativa de estas dos formas por SDS-PAGE cuando se usaron los inhibidores de proteasas durante el proceso de aislamiento y obtención del extracto nuclear crudo. De todas formas, para poder concluir que estas dos formas no proceden de una degradación proteolítica, sería necesario realizar un estudio más exhaustivo, asegurando aún más la protección frente a la acción de proteasas en todas las etapas de purificación del receptor, incluido la etapa de electroforesis en gel. Otra alternativa a esta proteolisis metodológica podría ser que en la proteína de 74 kDa está contenida la de 64 kDa, la cual a su vez está entrecruzada a una proteína de 10 kDa. Bajo estas circunstancias, este componente de 10 kDa puede representar una subunidad intrínseca del receptor o proteína en dominios específicos de cromatina con los que esta en contacto el componente unido a la hormona (Pascual y cols., 1982). Alternativamente, estos dos componentes pueden representar proteínas distintas que tienen similares dominios de unión a la hormona, tal y como se ha descrito para el receptor de la progesterona (Dure y cols., 1980). Por último, podría ocurrir que uno de los componentes sea el producto primario de una translación del ARNm del receptor que, después



de su asociación con el núcleo, sea convertido por determinados procesos en el otro componente.

La cuestión más importante que se plantea actualmente es si la señal de la melatonina sobre el núcleo y la membrana están ligadas funcionalmente, o si compiten por el ligando o si se excluye una a la otra. Como se ha comentado en la introducción, la existencia de uniones de alta afinidad de melatonina se han asociado fundamentalmente a membranas celulares (Dubocovich y Takahashi, 1987; Reppert y cols., 1988). Los resultados presentados en gran número de trabajos que muestran sitios de unión de melatonina a membrana son a veces discutibles y han sido puestos en duda recientemente en exhaustivos trabajos (Kennaway y Hugel, 1992; Acuña-Castroviejo y cols., 1994). Sin embargo, recientemente se ha clonado un receptor con siete dominios transmembrana para la melatonina en ranas (Ebisawa y cols., 1995), en tejidos de oveja y humanos (Reppert y cols., 1994). Este receptor está acoplado a una proteína-G, que traduciría la activación del receptor por la melatonina en una señal intracelular, estableciendo así una vía de transmisión de señales de membrana para la melatonina.

La mayoría de los estudios por autorradiografía, incluyendo estudios por autorradiografía cuantitativa, muestran como lugares de unión de la melatonina pequeñas áreas en tejidos asociados como el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y posiblemente la eminencia media y la pars tuberalis de la hipófisis anterior (Laitinen y Saavedra, 1990; Williams y cols., 1991). En contraposición, otros estudios autorradiográficos muestran una distribución de sitios de unión de  $^{125}\text{I}$ -melatonina en el cerebro de conejo más amplia de lo que cabría esperar por los resultados iniciales (Stankov y col., 1991a).

La mayoría de los estudios bioquímicos usando la técnica de unión de ligando revelan un único sitio de unión de alta afinidad para la melatonina en el cerebro, mientras que algunos autores señalan para el cerebro de rata y hámster un modelo de unión a dos sitios (Krause y Dubocovich, 1991). Muchos trabajos han mostrado también la presencia de estos sitios de unión de alta afinidad en numerosos tejidos periféricos de diferentes especies de animales, como en ovario y testículos de pollo (Ayre y col., 1992), testículo de codorniz (Wang y cols., 1992), bazo de aves y mamíferos (Yu y cols., 1991) y riñón de pato (Song y cols., 1992). Sin embargo, existe una gran disparidad respecto al tiempo que tarda en producirse la unión máxima del ligando al receptor (cinética de saturación) en los diferentes tejidos estudiados, variando

desde unos pocos minutos en el cerebro completo de hamster a 8 horas en la codorniz (Kennawa y Hugel, 1992).

Los receptores de membrana de la melatonina parecen tener una afinidad por el ligando mayor que los receptores nucleares. Así que, en una competición directa por el ligando los receptores de membrana podrían tener cierta preferencia. Como no hay datos muy claros sobre el significado biológico de la unión de la melatonina a este receptor de membrana, varios autores proponen una explicación alternativa (Kennaway y Hugel, 1992; Acuña-Castroviejo y cols., 1994), consistente en que los sitios de unión de membrana para la melatonina pueden indicar la existencia de un aceptor para esta molécula; de esta manera se podría explicar su dependencia de la temperatura y el hecho de que sus constantes de asociación sean mucho más rápidas que la disociación, como se ha descrito (Weaver y cols., 1989; Latinen y cols., 1990; Siuciak y cols., 1991; Stankov y cols., 1991c; Sugden y Chong, 1991). La unión de melatonina a esos sitios puede ser metabolizada o internalizada, así que la cantidad de hormona que puede alcanzar el núcleo estaría regulada por una proteína de membrana. Además existen pruebas de que un incremento de la melatonina extracelular conlleva a una mayor concentración intranuclear, alcanzando un máximo en torno a 1 nM (Menéndez-Peláez y cols., 1993b).

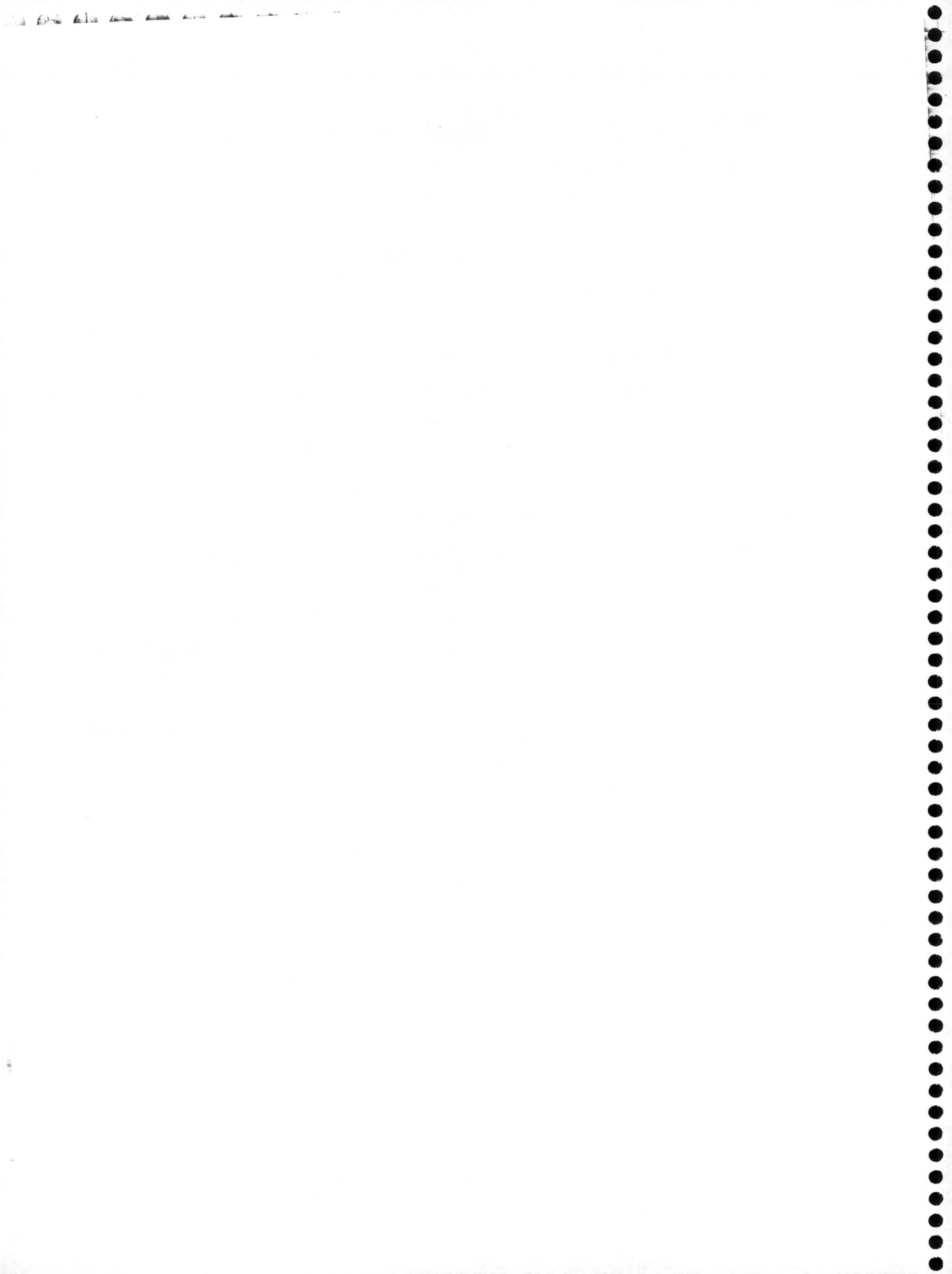
Recientemente ha sido propuesto por Carlberg (1995) que las señales de transducción inducidas probablemente por el receptor con siete dominios transmembrana para la melatonina, inducen una modificación covalente del receptor nuclear. Esta hipótesis sugiere una conexión directa entre ambas vías de transmisión de señales para la melatonina. No obstante aún no existen pruebas experimentales que describan en células la co-expresión de ambos receptores. En la figura A se esquematiza las posibles interacciones entre los receptores nucleares de membrana de la melatonina.

La melatonina como otras hormonas lipofílicas (por ejemplo las hormonas esteroideas, tiroideas y la vitamina D3, debido a su capacidad de difusión por ambientes hidrófobos son candidatos ideales para servir como reguladores de la expresión diferencial de diversos genes. Durante el desarrollo de este trabajo experimental, se publicó que la melatonina constituía un ligando natural de los hasta entonces receptores huérfanos RZR/ROR (Wiesenberg y cols., 1995). Además el que la melatonina reprima la expresión del gen de la 5-lipooxigenasa (Steinhilber y cols., 1995) en linfocitos B humanos, junto con el resto de estudios que demuestran la existencia de una acción nuclear específica de la melatonina (citas) suponen

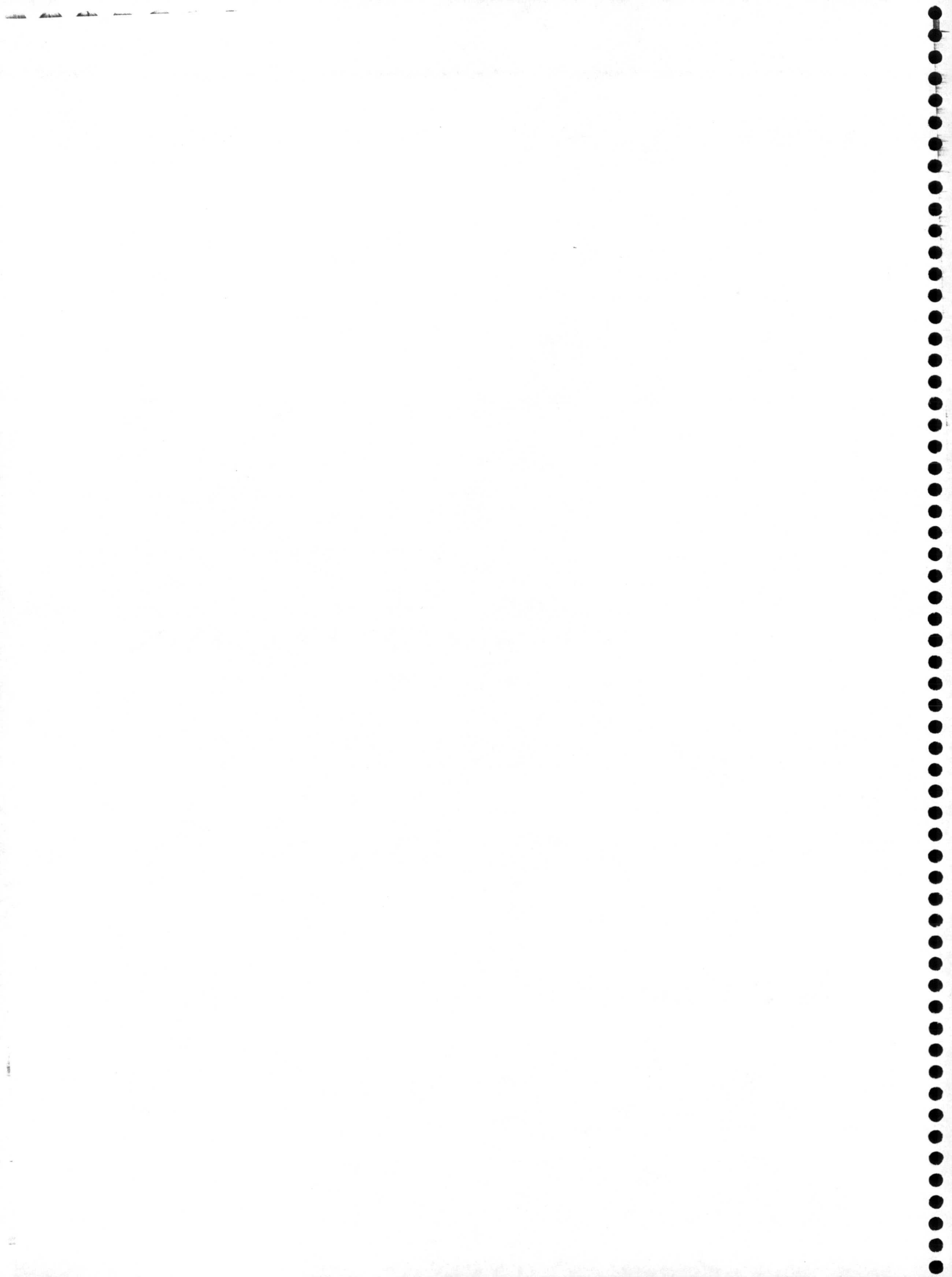
pruebas suficientes de la existencia de un receptor(es) nuclear(es) para la melatonina que establecería una vía de transmisión de señales nucleares para la melatonina (Carlberg y cols., 1995).

En vista de todos estos datos experimentales, uno debe pensar en realizar hipótesis confluyentes y no excluyentes sobre la existencia y significación de ambos receptores de melatonina, nuclear y de membrana. Siguiendo la homología con otros receptores, como es el caso de la aldosterona, la visión inicial de la existencia de receptores nucleares exclusivamente se truncó cuando se clonó el receptor de membrana de la aldosterona (cita). La existencia de estos dos receptores puede explicar efectos rápidos y lentos de la hormona en cuestión. Otro ejemplo claro es la tiroxina, hormona que presenta sitios de unión en membrana plasmática, citosol y núcleo. Por otra parte, las propiedades químicas de la melatonina son similares a las de la tiroxina. Ambas moléculas son muy pequeñas, lipofílicas y son sintetizadas a partir de un sólo aminoácido. Otra característica que pueden presentar en común la tiroxina y las hormonas esteroideas con la melatonina es la presencia de receptores nucleares asociados a la cromatina de las células diana. Estos datos han dado lugar a hipótesis sobre la recíproca interacción que puede existir entre melatonina y estradiol y sus respectivos receptores en los núcleos de las células diana (Zisapel y cols., 1987).

La melatonina es una molécula muy importante si atendemos a su absoluta conservación en la escala filogenética, por ello, no sería extraño que ejerciese distintas acciones en las células y que, por ello, necesitase más de un receptor. El mensaje circadiano que queda la información sobre el día y el momento del año en el que se encuentra el animal a los diferentes órganos puede depender perfectamente de los receptores de membrana descritos (Stankov y cols., 1991b), mientras que las demás acciones, ya descritas, que realiza la melatonina deben estar relacionadas con algún receptor nuclear.



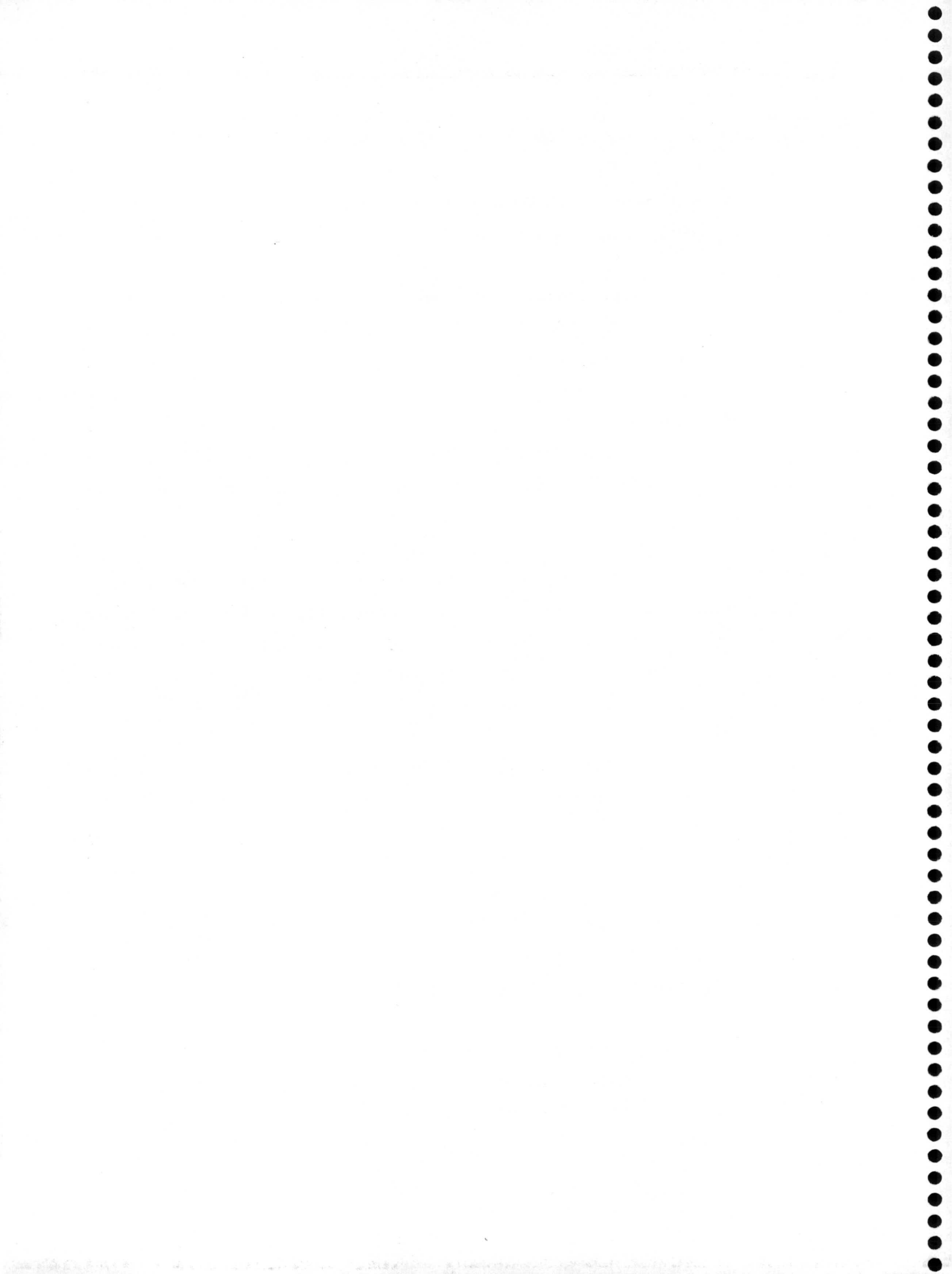
## 6.- CONCLUSIONES



## 6.- CONCLUSIONES

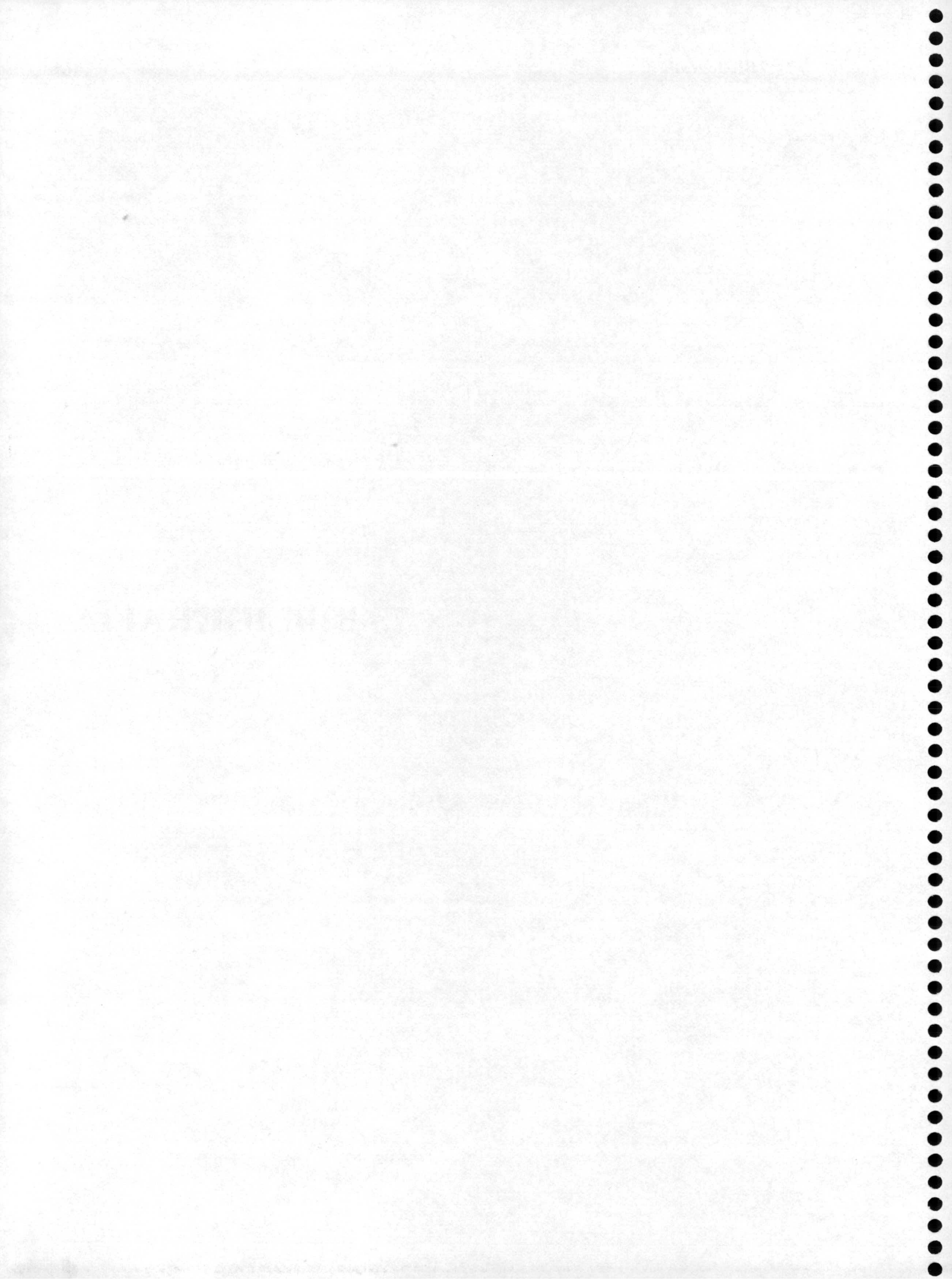
A partir de los resultados expuestos en la presente memoria de investigación podemos deducir las siguientes conclusiones:

- 1.- El método utilizado permite la purificación de núcleos enteros sin contaminantes celulares. Por técnicas de inmunocitoquímica y citometría de flujo se demuestra la presencia de melatonina en dichos núcleos.
- 2.- Durante el proceso de purificación del receptor nuclear de melatonina se obtuvo el máximo rendimiento tratando el homogenizado de núcleos con 25-65% de sulfato amónico, siendo la fracción precipitada con este porcentaje la utilizada en la cromatografía de afinidad.
- 3.- El análisis electroforético y de inmunotransferencia de las proteínas obtenidas tras la purificación del extracto nuclear por cromatografía de afinidad reveló la presencia de una banda de 64 kDa de peso molecular y punto isoeléctrico ácido. Por autorradiografía se comprobó que la 2-<sup>125</sup>I-iodomelatonina se unió específica y reversiblemente a esta proteína.
- 4.- Cuando se purificó la eficiencia y el rendimiento de la cromatografía de afinidad, por un aumento en la concentración de 6-hidroximelatonina y tiempo de elución, el análisis electroforético y de inmunotransferencia reveló la presencia de dos bandas de 64 y 74 kDa de peso molecular.
- 5.- Ambas proteínas de 64 y 74 kDa se unen específica y reversiblemente a la melatonina. Asimismo, dichas proteínas se unen selectivamente y reversiblemente al CGP-52608, un ligando específico del receptor nuclear de melatonina tipo RZR/ROR.
- 6.- Dado su peso molecular y su alta afinidad por la melatonina y el CGP-52608, estas proteínas de 64 y 74 kDa pueden pertenecer al grupo de receptores huérfanos, por su similitud al receptor RZR/ROR clonado recientemente.





## 7.- BIBLIOGRAFÍA



1. -Antibody as a Probe: Autoradiography. In: Hudson LHFC, ed. Practical Immunology. Tercera Ed. Oxford London Edinburg Boston: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1988:70-73.
2. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of physiological interactions. *Endocrine Reviews* 1991;12:151-180.
3. Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J.Pineal Res.* 1994;16:100-112.
4. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M, Muñoz Hoyos A, Molina Carballo A, Arauzo M, Montes R, Vives F. Cell protective role of melatonin in the brain. *J.Pineal Res.* 1995;19:57-63.
5. Acuña D, Lowenstein PR, Rosenstein RE, Cardinali DP. Diurnal Variations of Benzodiazepine Binding in Rat Cerebral Cortex: Disruption by Pinealectomy. *J.Pineal Res.* 1986;3:101-109.
6. Acuña D, Fernández B, Gomar MD, Del Aguila CM, Castillo JL. Influence of the Pituitary-Adrenal Axis on Benzodiazepine Receptor Binding to Rat Cerebral Cortex. *Neuroendocrinology* 1990;51:97-103.
7. Acuña D, Castillo JL, Fernández B, Gomar MD, Del Aguila CM. Modulation by Pineal Gland of Ouabain High Affinity Binding Sites in Rat Cerebral Cortex. *Am.J.Physiol.(Reg.Int.Comp.Physiol.)* 1992;262:R698-R706
8. Acuña D, Del Aguila CM, Fernández B, Gomar MD, Castillo JL. Characterization of Ouabain High Affinity Binding to Rat Cerebral Cortex. Modulation by Melatonin. *Eur.J.Pharmacol.* 1992;226:59-67.
9. Andrews AT. Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications. In: *Anonymous Electrophoresis.* 2 Ed. Oxford: Clarendon Press, 1986:241-288.
10. Antolín I, Rodríguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uría H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menéndez-Peláez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1996;10:882-890.
11. Antón-Tay F, Díanz JL, Fernández-Guardiola A. On the effect of melatonin upon human brain: is possible therapeutic implications. *Life Sci.* 1971;10:841-850.
12. Antón-Tay F. Melatonin: effects on brain function. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 1974;11:315-324.
13. Apriletti JW, Eberhardt NL, Latham RK, Baxter DJ. Affinity chromatography of thyroid hormone receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 1981;256:12094-12101.

14. Apriletti JW, Baxter JD, Lavin TN. Large scale purification of the nuclear thyroid hormone receptor from rat liver and sequence-specific binding of the receptor to DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 1988;263:9409-9417.
15. Axelrod J. Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase. *J.Biol.Chem.* 1962;237:1657-1660.
16. Baler R, Klein DC. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. *J.Biol.Chem.* 1995;270:27319-27325.
17. Baler R, Coon S, Klein DC. Orphan nuclear receptor RZRbeta: Cyclic AMP regulates expression in the pineal gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996;220:975-978.
18. Barlow-Walden L, Reiter RJ, Abe M, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Chen L-D, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase. *Neurochem.Int.* 1995;26:497-502.
19. Bartsch C, Bartsch H. Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. *J.Neural Transm.* 1981;52:269-279.
20. Bartsch C, Bartsch H, Laumas SR, Wetterberg L. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients. *J.Neural Transm.* 1981;52:281-294.
21. Bartsch H, Bartsch C, Simon W.E., Fleming B, Ebels I, Lippert TH. Antitumor activity of the pineal gland: effect of unidentified substances versus the effect of melatonin. *Oncology* 1992;52:279-283.
22. Beck O, Borg S, Lundman A. Concentration of 5-methoxyindoles in the human pineal gland. *J.Neural Transm.* 1982;54:111-116.
23. Becker-André M, André E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;194:1371-1379.
24. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, André E, Missbach M, Saurat J-H, Carlberg C. Pineal Gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269:28531-28534.
25. Benítez-King G, Ríos A, Martínez A, Antón-Tay F. In vitro inhibition of Ca<sup>++</sup>/calmodulin dependent protein kinase II activity. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1996;1290:191-196.
26. Benítez-King G, Antón-Tay F. Calmodulin and protein kinase C $\alpha$  are two Ca<sup>++</sup>-binding proteins that mediate intracellular melatonin signaling. In: Webb SM, Puig-Domingo M, Moller M, Pevet P, eds. Pineal update. New York (USA): PJD Publications limited, 1997:13-20.

27. Benítez-King G, Antón-Tay F. Role of melatonin in cytoskeletal remodeling is mediated by calmodulin and protein kinase C. *Front.Horm.Res.* 1998;21:6344-6352.
28. Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J.Pineal Res.* 1990;9:209-220.
29. Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res.* 1991;557:289-292.
30. Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. Binding of <sup>3</sup>H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 1993;53:201-207.
31. Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J.Pineal Res.* 1998;20:205-210.
32. Binkley S, Mosher K, White BH. Circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase activity: Rapid phase reversal and response to shorter than 24-hour cycles (IV). *J.Neurochem.* 1987;49:828-833.
33. Binkley S. Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia* 1993;49:648-653.
34. Blask DE, Hill SM. Effects of melatonin on cancer: Studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J.Neural Transm.* 1986;21:433-449.
35. Blum M, McEwens BS, Roberts JL. Transcriptional Analysis of Tyrosine Hydroxylase Gene Expression in the Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons of the Rat Arcuate Nucleus after Estrogen Treatment. *The Journal of Biological Chemistry* 1987;262:817-821.
36. Bowers CW, Zigmond RE. The influence of the frequency and pattern of sympathetic nerve activity on serotonin N-acetyltransferase in the rat pineal gland. *J.Physiol.* 1982;330:279-296.
37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal.Biochem.* 1976;72:248
38. Bubenik GA, Brown GM, Uhler I, Grotta LJ. Immunohistological localization of N-acetylinolealylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Res.* 1974;81:233-242.
39. Bubenik GA, Brown GM, Grotta LJ. Immunohystological localization of melatonin in the digestive system of the rat. *Experientia* 1998;33:66-663.
40. Cagnacci A, Elliott JA, Yen SSC. Melatonin: A major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1992;75:447-452.

41. Cardinali DP. Molecular biology of melatonin: Assessment of the "microtubule hypothesis of melatonin action". In: Birau N, Schloot W, eds. Melatonin: Current Status and Perspectives. Oxford: Pergamon Press, 1980:247-256.
42. Cardinali DP. Melatonin: A mammalian pineal hormone. *Endocrine Rev.* 1981;2:327-346.
43. Cardinali DP, Vacas MI, Gejman PV. The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. *J. Neural Transm.* 1981;52:1-21.
44. Cardinali DP, Gejman PV, Ritta MN. Further evidence of adrenergic control of translocation and intracellular levels of estrogen receptors in rat pineal gland. *Endocrinology* 1983;112:492-498.
45. Cardinali DP, Vacas MI, Gejman PV, Pisarev M, Barontini M, Boado RJ. The sympathetic superior cervical ganglia as a "little neuroendocrine brains". *Acta Physiol. Latinoam.* 1983;33:205-221.
46. Cardinali DP, Vacas MI, Rosenstein RE, Lowenstein PR, Gonzalez-Solveyra C, Romeo HE, Sarmiento MIK. The pineal gland as a multi-effector organ. In: Reiter RJ, Karasek M, eds. *Advances in pineal research: 1.* London: John Libbey, 1986:129-138.
47. Cardinali DP, Lowenstein PR, Rosenstein RE, Gonzalez-Solveyra C, Sarmiento MIK, Romeo HE, Acuña-Castroviejo D. Functional links between benzodiazepine and GABA receptors and pineal activity. In: Donoso AO, Racagni G, eds. *GABA and endocrine function.* New York: Raven Press, 1986:155-164.
48. Cardinali DP, Vacas MI, Keller Sarmiento MI, Etchegoyen GS, Pereyra EN, Chuluyan HE. Neuroendocrine integrative mechanisms in mammalian pineal gland: Effects of steroid and adenohipophysial hormones on melatonin synthesis *in vitro*. *J. Steroid Biochem.* 1987;27:565-571.
49. Carlberg C, Hooft R, Huijsduijnen RH, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-André M. RZR, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Molecular Endocrinology* 1994;8:757-770.
50. Carlberg C, Weisenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5 lipoxygenase: an unexpected relationship. *J. Pineal Research* 1995;18:171-178.
51. Carlberg C, Wiesenberg I, Schröder M. Nuclear signalling of melatonin. In: Maestroni GJM, Conti A, Reiter RJ, eds. *Frontiers of hormone Research.* 1997:25-35.
52. Caron MG, Lefkowitz RJ. Solubilization and characterization of the b-adrenergic receptor binding sites of frog erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1976;251:2374-2384.
53. Caron MG, Srinivasan Y, Pitha J, Kocielek K, Lefkowitz JR. Affinity Chromatography of the b-adrenergic receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1979;254:2923-2927.

54. Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrine Reviews* 1990;11:201-220.
55. Cohen M, Roselle D, Chabner B, Schmidt TJ, Lippman M. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature* 1978;274:894-895.
56. Cos S, Blask DE. Effects of melatonin on growth factor activity in MCF-7 human breast cancer cells. In: Arendt J, Pevet P, eds. *Advances in pineal research: 5*. London: John Libbey, 1991:365-367.
57. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 1993;262:689-695.
58. Cuatrecasas P. Agarose derivates for purification of protein by affinity chromatography. *Nature* 1970;228:1327-1328.
59. Cuatrecasas P, Anfinsen CB. Affinity chromatography. *Ann.Rev.Biochem.* 1971;40:259
60. Cuatrecasas P. Affinity chromatography of Macromolecules. In: Meister A, ed. *In advances in Enzymology*. New York: 1972:29
61. Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM. *AnonymousData for Biochemical Research*. 3d Ed. Oxford: Oxford Science Publicartions, 1986:
62. Dingwall C, Laskey RA. Protein import into the nucleus. *Annu.Rev.Cell Biol.* 1986;2:367
63. Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 1983;306:782-784.
64. Dubocovich ML, Takahashi JS. Used of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1987;84:3916-3920.
65. Dubocovich ML. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? *TIPS* 1995;16:50-56.
66. Duncan MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML. 2-[<sup>125</sup>I]Iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: Pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 1988;122:1825-1833.
67. Duncan MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML. Characteristics and autoradiographic localization of 2-<sup>125</sup>I]Iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology* 1989;125:1011-1018.
68. Ebadi M. Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. In: Reiter RJ, ed. *The pineal gland*. New York: Raven Press, 1984:1-37.
69. Ebels I, Noteborn HPJM. A survey of different biologically active pineal compounds: current status. In: Reiter RJ, Karasek M, eds. *Advances in pineal research: 1*. London: John Libbey, 1986:111-119.

70. Ebisawa T, Karne S, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Neurobiology* 1994;91:6133-6137.
71. Eison AS, Mullins UL. Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in Syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells. *Life Sci.* 1993;53:393-398.
72. England S, Seifter S. Precipitation Techniques. *Methods in Enzymology* 1990;182:285-300.
73. Escames G, Acuña-Castroviejo D, Vives F. Melatonin-dopamine interaction in the striatal projection area of sensorimotor cortex in the rat. *Neuroreport* 1996;7:597-600.
74. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1998;240:889
75. Faulk WPTGM. *Immunochemistry* 1971;8:1081-1083.
76. Fernández B, Montero A, Del Aguila CM, Malde J.L., Castillo JL, Acuña-Castroviejo D. Relationship between pineal activity and the hypothalamus-hypophysis-gonadal axis in human pregnancy and cord blood of term infants. I. Melatonin and steroid hormones. *Life Sci.* 1992;11:89-96.
77. Fernández B, Montero A, Malde JL, Acuña-Castroviejo D. Relationship Between Renal Clearance Rates and Plasma Levels of FSH, bhCG, DHAs and melatonin during normal pregnancy. *J. Steroid of Biochemistry* 1990;18:713-714.
78. Findlay JBC. The isolation and labelling of membrane proteins and peptides. In *Biological membranes*. In: Findlay JBC, Hpuck JC, eds. A practical approach. Isolation and labeling of proteins and peptides. Oxford: IRL Press, 1986:179-213.
79. Finocchiaro LME, Artz ES, Fernández-Castelo S, Criscuolo M, Finkielman S, Nahmod VE. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: Stimulation by interferon- $\gamma$  as part of an immunomodulatory pathway. *J. Interf. Res.* 1988;8:705-716.
80. Forman BM, Chen J, Blumberg B, Kliwer SA, Henshaw R, Ong ES, Evans RM. Cross-Talk among ROR $\alpha$ 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Molecular Endocrinology* 1994;8:1253-1261.
81. Frey MDeal. Preparation of rehydratable polyacrylamide gels and their application in ultrathin-layer isoelectric focusing. *Electrophoresis* 1986;7:28-40.
82. Gasc JM, Delahaye F, Baulieu E.E. Compared intracellular localization of the glucocorticosteroid and progesterone receptors: an immunocytochemical study. *Exp. Cell Res.* 1989;181:492
83. Giguere VOES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 1987;330:624



84. Gomar MD, Castillo JL, Del Aguila CM, Fernández B, Acuña-Castroviejo D. Intracerebroventricular injection of naloxone blocks melatonin-dependent brain 3H-flunitrazepan binding. *Neuroreport* 1993;4:987-990.
85. Gomar MD, Fernández B, Castillo JL, Del Aguila CM, Acuña-Castroviejo D. Suppressive effect of simultaneous injection of ACTH(1-10) and b-endorphin on brain (3H)flunitrazepan binding. *Neuroreport* 1993;5:252-254.
86. Gomar MD, Fernández B, Castillo JL, Del Aguila CM, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts pinealectomy-dependent decreases in rat brain (3H)flunitrazepam binding through an opioid mechanism. *Neurosci.Lett.* 1993;164:149-153.
87. González-Brito A, Reiter RJ, Santana C, Menéndez-Peláez A, Guerrero JM. b-adrenergic stimulation prior to darkness advances the nocturnal increase in Syrian hamster pineal melatonin synthesis. *Brain Res.* 1988;475:393-396.
88. Gorski J, Toft D, Shyamala G, Smith D, Notides D. Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. *Recent Prog Horm Res* 1998;24:45
89. Griffiths G, Hpuck JC. Quantification in immunocytochemistry: Correlation of immunogold labeling to absolute number of membrane antigens. *J.Histochem.Cytochemi.* 1986;34:1389-1398.
90. Guerrero JM, Santana C, Reiter RJ. Effect of isoproterenol and dibutyryl cyclic AMP on thyroxine type-II 5'-deiodinase and N-acetyltransferase activities in rat pineal organ cultures. *Neurosci.Lett.* 1988;89:229-233.
91. Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr.res.* 1992;18:91-113.
92. Guigere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of RORa, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes and Development* 1994;8:538-553.
93. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 1993;17:347-357.
94. Harven E, Leung R, Chistensen H. A novel approach for scanning electron microscopy of colloidal gold-labelled cell surfaces. *J.Cell.Biol.* 1984;99:53-57.
95. Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tanford C. Properties of detergents. *Meth.Enzymol.* 1979;56:734-749.
96. Herbert J. Neural systems underlying photoperiodic time measurement: a blueprint. *Experientia* 1989;45:965-972.

97. Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985;6:103-112.
98. Hild-Petito S, West NB, Brenner RM, Stouffer RL. Localization of androgen receptor in the follicle and corpus luteum of the primate ovary during the menstrual cycle. *Biol.Rep.* 1991;44:561-568.
99. Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Senoh S. *In vitro* and *in vivo* formation of two new metabolites of melatonin. *J.Biol.Chem.* 1974;249:1311-1313.
100. Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. RORgamma: The third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Viochemical and Biophysical Research Communications* 1994;205:1976-1983.
101. Hjelmeland LM. Solubilization of native membrane proteins. *Meth.Enzymol.* 1990;182:253-265.
102. Ho AK, thomas TP, Chik CL, Anderson WB, Klein DC. Protein kinase C: Subcellular redistribution by increased  $Ca^{2+}$  influx. *J.Biol.Chem.* 1988;263:9292-9297.
103. Hoffman RA, Reiter RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat.Rec.* 1965;153:561-568.
104. Holloway WR, Grota LJ, Brown GM. Determination of immunoreactive melatonin in the colon of the rat by immunohistochemistry. *J.Histochem.Cytochemi.* 1980;28:255-262.
105. Ichikawa K, Degroot LJ. Purification and characterization of rat liver nuclear thyroid hormone receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1987;84:3420-3424.
106. Ichikawa K, Bentley S, Fee M, Degroot LJ. Modification of deoxyribonucleic acid-thyroid hormone receptor interaction by histones. *Endocrinology* 1987;121:893-899.
107. Ichikawa K, Degroot LJ. Purification and characterization of rat liver nuclear thyroid hormone receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1987;84:3420-3424.
108. Ichikawa K, Dernick R. Receptor Purification of the thyroid hormone receptor. In: Litwack G, ed. *Receptor Purification*. Clifton, New Jersey: Humana Press, 1990:321-335.
109. Iguchi H, Kato K-I, Ibayashi H. Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1982;54:1025-1027.
110. Iguchi H, Kato K-I, Ibayashi H. Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1982;55:27-29.
111. Imagawa M, Ishikawa E, Nakajima K. A sensitive and specific sandwich enzyme immunoassay for human thyroid-stimulating hormone. *Clinica Chimica Acta* 1982;126:227-236.

112. Jansen JM, Copping S, Gruppenm G, Molinari EJ, Dubocovich ML, Grol CJ. The high affinity melatonin binding site probed with conformationally restricted ligands: ml Pharmacophore and minireceptor models. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 1996;4:1321-1332.
113. Jägerstern C, Edström A. 2-D electrophoresis in small gels. *Journal Biochemistry Biophysical methods* 1987;14:44-44.
114. Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER. A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;59:632
115. Johnson EF, Palmer CNA, Griffin.K.J., Mei-Hui H. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in cytochrome P450 4A gene regulation. *Faseb Journal* 1996;10:1241-1248.
116. Karasek M, Reiter RJ. Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Micr.Res.Tech.* 1992;21:136-157.
117. Kelly RW, Amato F, Seamark RF. N-acetyl-5-methoxykynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1984;121:372-379.
118. Kennaway DJ, Hugel HM. Melatonin, melatonin metabolites and the suprachiasmatic nucleus. In: Foldes A, Reiter RJ, eds. *Advances in pineal research: 6*. London: John Libbey, 1991:169-178.
119. Kennaway DJ, Hugel HM. Melatonin binding sites: Are they receptors? *Mol.Cell.Endocrinol.* 1992;88:C1-C9
120. Kennaway DJ, Hugel HM. Melatonin binding sites: Are they receptors? *Mol.Cell.Endocrinol.* 1992;88:C1-C9
121. King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984;307:745
122. Kitay JI, Altschule MD. *Anonymous The Pineal Gland*. Harvard: Harvard University Press, 1954:
123. Klein DC, Weller JL. Adrenergic-adenosine 3'-5'-monophosphate regulation of serotonin N-acetyltransferase activity and the temporal relationship of serotonin N-acetyltransferase activity to synthesis of <sup>3</sup>H-N-acetylserotonin and <sup>3</sup>H-melatonin in the cultured rat pineal gland. *J.Pharmacol.Exptl.Ther.* 1973;186:516-527.
124. Klein DC, Buda MJ, Kappor CL, Krishna G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: Abrupt decrease in adenosine 3',5-monophosphate may be signal for "turnoff". *Science* 1978;199:309

125. Klein DC. Circadian rhythms in the pineal gland. In: Krieger DT, ed. *Endocrine Rhythms*. New York: Raven Press, 1979:203-223.
126. Klein DC. Photoperiodism, melatonin and the pineal. *Ciba Found. Symp.* 1985;117:38-56.
127. Klein DC, Roseboom PH, Donouhe SJ, Marrs BL. Evolution of melatonin as a night signal: contribution from a primitive photosynthetic organism. *Mol. Cell. Neurosci.* 1998;14:1-10.
128. Knecht E, Martínez-Ramón A, Grisolia S. Electron microscopic localization of glutamate deshydrogenase in rat liver mitochondria by an immunogold procedure and monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 1986;34:913-922.
129. Knecht E. Métodos de post-inclusión en las técnicas de inmunocitoquímica en Microscopia Electrónica. In: Durfort M, Vialaró S, Renau J, Serratosa J, eds. *Técnicas de Inmunocitoquímica en Microscopia Electrónica*. Publications de la Universidad de Barcelona, 1991:164-165.
130. Krause DN, Dubocovich ML. Regulatory sites in the melatonin system of mammals. *TINS* 1990;13:464-470.
131. Krause DN, Dubocovich ML. Melatonin receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1991;31:549-568.
132. Krause DN, Dubocovich ML. Melatonin receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1991;31:549-568.
133. Kvetnoy IM, Yuzhakov VV. Extrapineal melatonin: non-traditional localization and possible significance for oncology. In: Maestroni GJM, Conti A, Reiter RJ, eds. *Advances in pineal research: 7*. London: John Libbey, 1994:197-210.
134. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
135. Laitinen JT, Castren E, Vakkuri O, Saavedra JM. Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 1989;124:1585-1587.
136. Laitinen JT, Saavedra JM. Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: Modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology* 1990;126:2110-2115.
137. Laitinen JT, Saavedra JM. Differential sensitivity to cations of the melatonin receptors in the rat area postrema and suprachiasmatic nuclei. *J. Neurochem.* 1990;55:1450-1453.

138. Laitinen JT, Viswanathan M, Vakkuri O, Saavedra JM. Differential regulation of the rat melatonin receptors: Selective Age-associated decline and lack of melatonin-induced changes. *Endocrinology* 1992;130:2139-2144.
139. Laskey RA, Mills AD. *Eur.J.Biochem* 1975;56:335
140. Laskey RA, Mills AD. *FEBS Lett.* 1977;82:314
141. Latham KR, Ring JC, Baxter JD. Solubilized nuclear receptors for thyroid hormones. *The Journal of Biological Chemistry* 1976;251:7388-7397.
142. Layne E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Mesuring Proteins. *Methods Enzymol.* 1957;3:447-454.
143. Leone RM, Silman RE. *Endocrinology* 1984;114:1825-1832.
144. León JVF, Crespo E, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Germaine E, Acuña-Castroviejo D. Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivations. *Journal of Endocrinology* 1998;10:
145. León J, Vives F, Gómerz I, Camacho E, Gallo MA, Espinosa A, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Modulation of rat striatal glutamatergic response in search for new neuroprotective agents: evaluation of melatonin and some kynurenine derivaties. *Brain Res.Bull.* 1998;45:1-6.
146. Lerner AB, Case JD, Takahasi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J.Am.Chem.Soc.* 1958;LXXX:2587
147. Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. Structure of Melatonin. *J.Am.Chem.Soc.* 1959;LXXXI:6084-6085.
148. Lissoni P, Tisi E, Barni S, Ardizzoia A, Rovelli F, Rescaldini R, Ballabio D, Benenti C, Angeli M, Tancini G, Conti A, Maestroni GJM. Biological and clinical results of a neuroimmunotherapy with interleukin-2 and the pineal hormone melatonin as a first line treatment in advanced non-small cell lung cancer. *Br.J.Cancer* 1992;66:155-158.
149. Lissoni P, Barni S, Tancini G, Rovelli F, Ardizzoia A, Conti A, Maestroni GJM. A study of the mechanisms involved in the immunostimulatory action of the pineal hormone in cancer patients. *Oncology* 1993;50:399-402.
150. Lomasney JW, Fredrik Leeb-Lundberg LM, Cotecchia S, Regan JW, DeBernardis SF, Caron MG, Lefkowitz RJ. Mammalian alfa1-adrenergic receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1986;261:7710-7716.
151. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AS, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951;193:265-275.

152. Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin.Exp.Immunol.* 1987;68:384-391.
153. Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. *Immunology* 1988;63:465-469.
154. Maestroni GJM, Conti A. Beta-endorphin and dynorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int.J.Immunopharmac.* 1989;11:333-340.
155. Maestroni GJM, Conti A. Anti-stress role of the melatonin-immuno-opioid network: Evidence for a physiological mechanism involving T cell-derived, immunoreactive b-endorphin and met-enkephalin binding to thymic opioid receptors. *Intern.J.Neurosci.* 1991;61:289-298.
156. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ, Gonzalez-Brito A, Santana C, Guerrero JM. Regulation of N-acetyltransferase in the Syrian hamster harderian glands. In: Reiter RJ, Pang SF, eds. *Advances in pineal research:3.* London: John Libbey, 1989:77-81.
157. Menendez-Pelaez A. Melatonin and other indoles in the rodent Harderian glands: regulation and physiological significance. In: Reiter RJ, Lukaszyk A, eds. *Advances in pineal research: 4.* London: John Libbey, 1990:75-80.
158. Menendez-Pelaez A, Vaughan MK, Tolivia D, Rodriguez C, Reiter RJ. Pineal-harderian gland interactions: morphological and physiological evidences for an endocrine function of the Syrian Hamster harderian gland. In: Fraschini F, Reiter RJ, eds. *Role of melatonin and pineal peptides in neuroimmunomodulation.* New York: Plenum press, 1991:185-190.
159. Menéndez-Peláez A, Howes KA, González-Brito A, Reiter RJ. N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the harderian glands of the female Syrian hamster: Changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1987;145:1231-1238.
160. Menéndez-Peláez A, Santana C, Howes KA, Sabry I, Reiter RJ. Effects of photoperiod or exogenous melatonin administration on the activity of N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase and the melatonin content of the harderian gland of two strains of female Syrian hamsters. *J.Pineal Res.* 1988;5:293-300.
161. Menéndez-Peláez A, Buzzell GR, Nonaka KO, Reiter RJ. In vivo administration of isoproterenol or forskolin during the light phase induces increases in the melatonin content of the Syrian hamster pineal gland without a rise in N-acetyltransferase activity. *Neurosci.Lett.* 1990;110:314-318.
162. Menéndez-Peláez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: Immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J.Cell.Biol.* 1993;54:1-10.

163. Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J.Pineal Res.* 1993;15:59-69.
164. Menéndez-Peláez A, Sainz RM, Mayo JC, Rodríguez-Colunga MJ, Vázquez-Rojo J, Antolin I, Carbajo MP, Toliva D. Mast cells in the Harderian gland of female syrian hamsters during the estrous cycle and pregnancy: Effects of the light/dark cycle. *J.Reprod.Immunol.* 1993;25:51-61.
165. Menéndez-Peláez A, López-González MA, Guerrero JM. Melatonin binding sites in the Harderian gland of Syrian hamsters: Sexual differences and effect of castration. *J.Pineal Res.* 1993;14:34-38.
166. Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J.Pineal Res.* 1993;15:59-69.
167. Menéndez-Peláez A, Rodriguez C, Dominguez P. 5-aminolevulinate synthase mRNA levels in the Harderian gland of Syrian hamsters: correlation with porphyrin concentrations with porphyrin concentration and regulation by androgens and melatonin. *Mol.Cell.Endocrinol.* 1998;80:177-182.
168. Mennenga K, Ueck M, Reiter RJ. Immunocytochemical results with melatonin antiserum in the pineal gland and retina of the pigeon. In: Reiter RJ, Likaszyk A, eds. *Advances in Pineal Research.* London: John Libbey, 1990:69-74.
169. Mennenga K, Ueck M, Reiter RJ. Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. *J.Pineal Res.* 1991;10:159-164.
170. Meusy-Desolle N, Tillet Y. Immunohistochemical demonstration of melatonin in the female mink Harderian gland. *Anat.Rec.* 1992;234:549-554.
171. Mhatre MC, Pena G, Sieghart W, Ticku MK. Antibodies specific for GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  subunits reveal that chronic alcohol treatment down-regulates  $\alpha$ -subunit expression in rat brain regions. *J.Neurochem.* 1993;61:1620-1625.
172. Moore RY. The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog.Reprod.Biol.* 1978;4:1-9.
173. Morgan PJ, Barrett P, Howell E, Helliwell R. Melatonin receptors: Localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem.Int.* 1994;24:101-146.
174. Morgan PJ, Barrett P. Melatonin receptors in model systems. In: Fraschini F, Reiter RJ, Stankov B, eds. *The pineal gland and its hormones: fundamentals and clinical perspectives.* New York: Plenum press, 1995:83-94.
175. Morgan PJ, Willians LM, Barret P, Lawson W, Davidson G, Hannah L, Maclean A. Differential regulation of melatonin receptors in sheep, chicken and lizard brains by cholera and pertussis toxins and guanine nucleotides. *Neurochem.Int.* 1996;28:259-269.

176. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992;258:597-603.
177. Nayeri MS, Kahlen J-P, Carlberg C. The high affinity ligand binding conformation of the nuclear 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor is functionally linked to the transactivation domain 2 (AF-2). *Nucleic Acids Research* 1996;24:4513-4518.
178. Nelson CS, Marino JL, Allen CN. Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 1996;7:717-720.
179. Niles LP, Hashemi F. Picomolar-affinity binding and inhibition of adenylate cyclase activity by melatonin in Syrian hamster hypothalamus. *Cell.Mol.Neurobiol.* 1990;10:553-558.
180. Nishikawa T, Teramoto T, Shimizu S-I. Effect of morphine on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from homogenate of synaptosomes and of synaptic membrane of rat cerebral cortex. *Brain Res.* 1990;510:92-96.
181. Ormerod MG. Analysis of DNA-general methods. In: Ormerod MG, ed. *Flow Cytometry*. Oxford University Press, 1994:124-126.
182. Pang CS, Brown GM, Tang PL, Pang SF. G-protein linked melatonin binding sites in the chicken lung. *Neurosci.Lett.* 1993;162:17-20.
183. Pang SF, Yew DT. Pigment aggregation by melatonin in the retinal pigment epithelium and choroid of guinea pigs, *Cavia porcellus*. *Experientia* 1979;35:231-233.
184. Pang SF, Tang PL, Tang GWK, Yam AWC. Melatonin and pregnancy. In: Brown GM, Wainwright SD, eds. *The pineal gland: endocrine aspects*. 1 Ed. Oxford: Pergamon press, 1985:157-162.
185. Pang SF, Woo NYS, Tang PL, Allen AE. Differential effects of bilateral enucleation on serum melatonin: Evidence for an endocrine retina in the fish and the hypothesis of a sensorihormonal transducer. *Chin.J.Physiol.Sci.* 1987;3:341-349.
186. Pang SF, Allen AE, Nir I, Tang PL. The photoreceptor in the retina: A photo-humoral and photo-endocrine transducer. In: Yew DT, So KF, Tsang DSC, eds. *Vision: Structure and Function*. Singapore: World Scientific, 1990:154-176.
187. Pang SF, Pang CS, Ayre EA, Wang ZP, Cheng KM, Yuan H, Brown GM. Melatonin implants, photoperiod and [<sup>125</sup>I] iodomelatonin - binding sites in the quail brain and testis: evidence for a direct melatonin action on the testis. In: Moller M, Pevet P, eds. *Advances in pineal research: 8*. London: John Libbey, 1994:393-401.
188. Pascual A, Casanova J, Samuels HH. Photoaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptors in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1982;257:9640-9647.



189. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J.Neurosci.* 1990;10:1035-1041.
190. Perrot-Appanat M, Logeat F, Groyer-Picard MT, Milgrom E. Immunocytochemical study with monoclonal antibodies to progesterone. *Cancer Res.* 1985;47:2652
191. Persengiev S, Usheva A, Kanchev L. Biochemical characteristics of melatonin receptors in different organs and translation of hormonal signal in the nucleus. In: Fraschini F, Reiter RJ, eds. *Role of melatonin and pineal peptides in neuroimmunomodulation.* New York: Plenum press, 1991:137-145.
192. Persengiev S, Patchev V, Velev B. Melatonin effects on thymus steroid receptors in the course of primary antibody responses: Significance of circulating glucocorticoid levels. *Int.J.Biochem.* 1991;23:1487-1489.
193. Persengiev S, Marinova CH, Patchev V. Steroid hormone receptors in the thymus: A site of immunomodulatory action of melatonin. *Int.J.Biochem.* 1991;23:1483-1485.
194. Persengiev SP. 2-(125I)iodomelatonin binding sites in rat adrenals: Pharmacological characteristics and subcellular distribution. *Life Sci.* 1992;51:647-651.
195. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belong to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987;330:444
196. Pierce ME, Besharse JC. Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: Melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity. *Brain Res.* 1987;405:400-404.
197. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: Effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1994;91:787-791.
198. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan D-X, Chen L-D, manchester LC, Barlow-Walden L. Melatonin - A highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed *in vitro*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.USA* 1994;47:1-2.
199. Pontoire C, Bernard M, Silvain C, Collin J-P, Voisin P. Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. *Eur.J.Pharmacol.* 1993;247:111-118.
200. Poon AMS, Pang SF. Constant light exposure increases 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the guinea pig spleen. *Neurosci.Lett.* 1992;146:41-44.
201. Poon AMS, Pang SF. 2[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sci.* 1992;50:1719-1726.
202. Powers JC, Harper JW, Barret AJ, Salvensen G, eds. *In Proteinase inhibitors.* Amsterdam: Elsevier, 1986:219

203. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 1994;55:455-460.
204. Pozo D, Delgado M, Fernandez-Santos JM, Calvo JR, Gomariz RP, Martin-Lacave I, Ortiz G, Guerrero JM. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *The FASEB Journal* 1997;11:466-473.
205. Puig-Domingo M, Webb SM, Serrano J, Peinado MA, Corcoy R, Rusalleda J, Reiter RJ, De Leiva A. Melatonin-related hypogonadotropic hypogonadism. *New Eng.J.Med.* 1992;327:1356-1359.
206. Quay WB. General Biochemistry of the pineal gland of mammals. In: Reiter RJ, ed. *The Pineal Gland, vol. I: Anatomy and Biochemistry.* Boca Raton, Florida: CRC Pres Inc, 1980:173-198.
207. Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* 1975;255:344-345.
208. Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C. *Anal.Biochem.* 1975;64:209
209. Reiter RJ. Interaction of photoperiod, pineal and seasonal reproduction as exemplified by findings in the hamster. *Prog.Reprod.Biol.* 1978;4:169-190.
210. Reiter RJ, Puig-Domingo M, Guerrero JM. Nocturnal increase in the sensitivity of the Syrian hamster pineal gland to isoproterenol is darkness dependent. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1987;185:219-222.
211. Reiter RJ. Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol.Sci* 1991;6:223-227.
212. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of physiological interactions. *Endocrine Reviews* 1991;12:151-180.
213. Reiter RJ. Pineal gland. Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *TEM* 1991;2:13-19.
214. Reiter RJ. Melatonin synthesis: Multiplicity of regulation. In: Schwartz R, ed. *Kynurenine and Serotonin Pathways.* Nueva York: Plenum Press, N.Y., 1991:149-158.
215. Remvikos Y, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Frelat G, Dutrillaux B, Thomas G. Simultaneous monitoring of P53 protein and DNA content of colorectal adenocarcinomas by flow cytometry. *Int.J.Cancer* 1990;45:450-456.
216. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel1b melatonin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1995;92:8734-8738.

217. Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences* 1996;17:100-102.
218. Richman PG, Meister A. Regulation of t-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J.Biol.Chem.* 1975;250:1422-1426.
219. Rivkess SA, Conron RW, Reppert SM. Solubilization and Purification of Melatonin Receptors from Lizard Brain. *Endocrinology* 1990;127:1206-1214.
220. Rose R. Anonymous Manual of Clinical Laboratory Immunology. 1986:106-106.
221. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 1996;137:3033-3045.
222. Rousk W. Can "Resetting" hormonal rhythms treat illness? *Science* 1995;269:1220-1221.
223. Rubin R, Warren R. *Anal.Biochem.* 1977;83:773
224. Santana C, Guerrero JM, Reiter RJ, González-Brito A, Menéndez-Peláez A. Forskolin, and activator of adenylate cyclase activity, promotes large increases in N-acetyl transferase activity and melatonin production in the Syrian hamster pineal gland only during the late dark period. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1988;255:209-215.
225. Schleif FR, Wensink CP. Anonymous Practical Methods in Molecular Biology. New York: Springer-Verlag, 1981:186-187.
226. Sedmak JJ, Grossberg SE. *Anal.Biochem.* 1977;79:544
227. Siuciak JA, Krause DN, Dubocovich ML. Quantitative pharmacological analysis of 2-<sup>125</sup>I-iodomelatonin binding sites in discrete areas of the chicken brain. *J.Neurosci.* 1991;11:2855-1864.
228. Slominski A, Pruski D. Melatonin inhibits proliferation and melanogenesis in rodent melanoma cells. *Exptl.Cell Res.* 1993;206:189-194.
229. Smith JA, Mee TJX, Padwick DJ, Spokes EG. Human postmortem pineal enzyme activity. *Clin.Endocrinol.* 1981;14:75-81.
230. Song Y, Ayre EA, Pang SF. The identification and characterization of <sup>125</sup>I-labelled iodomelatonin-binding sites in the duck kidney. *J.Endocrinol.* 1992;135:353-359.
231. Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Capsoni S, Fauteck J, Fumagalli P, Fraschini F. Localization and characterization of melatonin binding sites in the brain of the rabbit

- (*Oryctolagus cuniculus*) by autoradiography and in vitro ligand-receptor binding. *Neurosci.Lett.* 1991;133:68-72.
232. Stankov B, Biella G, Panar C, Lucini V, Capsoni S, Fauteck J, Cozzi B, Fraschini F. Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system: Using the rabbit cortex as a model. *Endocrinology* 1992;130:2152-2159.
233. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen J-P, Nayeri MS, Carlberg C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in Human B Lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1995;270:7037-7040.
234. Sugden D, Chong NWS. Pharmacological identity of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res.* 1991;539:151-154.
235. Sugden D, Klein DC. Regulation of rat pineal  $\alpha_1$ -adrenoceptors. *J.Neurochem.* 1985;44:63-67.
236. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989;45:922-932.
237. Sugden D, Chong NS. Pharmacological identity of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in chicken and sheep pars tuberalis. *Brain Res.* 1998;539:151-154.
238. Sundberg L, Porath J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. a. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *Journal Chromatogr.* 1974;90:87-98.
239. Tan D-X, Chen L-D, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1993;1:57-60.
240. Tillet Y, Meusy-Desoulle N, Martinet L. Immunohistochemical demonstration and radioimmunoassay of melatonin in the milk pineal gland. *Tissue Res.* 1989;2257:23-28.
241. Underwood H, Goldman B. Vertebrate circadian and photoperiodic systems: Role of the pineal gland and melatonin. *J.Biol.Rhythms* 1987;2:279-315.
242. Vacas MI, Keller Sarmiento MI, Cardinali DP. Melatonin increases cGMP and decreases cAMP levels in rat medial basal hypothalamus in vitro. *Brain Res.* 1981;225:207-211.
243. Vacas MI, Berría MI, Cardinali DP, Lascano EF. Melatonin inhibits  $\beta$ -adrenoceptor-stimulated cyclic AMP accumulation in rat astroglial cell cultures. *Neuroendocrinology* 1984;38:176-181.
244. Vakkuri O, Leppäluoto J, Kauppila A. Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine. *Life Sci.* 1985;37:489-495.

259. Wurtman RJ, Moskowitz A. The pineal organ (first of two parts). *N.Eng.J.Med.* 1977;296:1329-1333.
260. Wurtman RJ, Waldhauser F, Lieberman HR. The secretion and effects of melatonin in humans. In: Axelrod J, Fraschini F, Velo GP, eds. *The pineal gland and its endocrine role.* New York: Plenum press, 1983:551-573.
261. Wyckoff M. Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate- containing buffers using multiphasic buffer systems: properties of the stack, valid Rf-measurements. In: Anonymous 1977:
262. Ying S-W, Niles LP. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate-solubilized binding sites for 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin in chick brain retain sensitivity to guanine nucleotides. *J.Neurochem.* 1991;56:580-586.
263. Ying S-W, Niles LP, Crocker C. Human malignant melanoma cells express high-affinity receptors for melatonin: Antiproliferative effects of melatonin and 6-chloromelatonin. *Eur.J.Pharmacol.* 1993;246:89-96.
264. Ying S-W, Niles LP, Crocker C. Human malignant melanoma cells express high-affinity receptors for melatonin: Antiproliferative effects of melatonin and 6-chloromelatonin. *Eur.J.Pharmacol.* 1993;246:89-96.
265. Yu Z-H, Yuan H, Lu Y, Pang SF. [<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. *Neurosci.Lett.* 1991;125:175-178.
266. Yuan H, Pang SF. [<sup>125</sup>I]melatonin binding sites in membrane preparations of quail brain: Characteristics and diurnal variations. *Acta Endocrinol.* 1990;122:633-639.
267. Zisapel N, Laudon M. A novel melatonin antagonist affects melatonin-mediated processes in vitro and in vivo. *Eur.J.Pharmacol.* 1987;136:259-260.
268. Zisapel N, Oaknin S, Anis Y, Nir I. Melatonin receptors in discrete areas of the rat and Syrian hamster brain: modulation by melatonin, pinealectomy, testosterone and the photoperiod. In: Arendt J, Pevet P, eds. *Advances in pineal research: 5.* London: John Libbey, 1991:175-181.

245. Vanecek J, Vollrath L. Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res.* 1989;505:157-159.
246. Vanecek J, Vollrath L. Localization and characterization of melatonin receptors. In: Reiter RJ, Lukaszyk A, eds. *Advances in pineal research: 4.* London: John Libbey, 1990:147-154.
247. Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1990;87:6200-6203.
248. Vretblad P. Purification of lectins by biospecific affinity chromatography. *Biochim.Biophys.Acta* 1976;434:169-176.
249. Wang ZP, Cheng KM, Brown GM, Pang CSF, Pang SF. Characterization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin-binding sites in quail testes at mid-light and mid-dark. *Neurosci.Lett.* 1992;146:195-198.
250. Weaver DR, Provencio I, Carlson LL, Reppert SM. Melatonin receptors and signal transduction in photorefractory Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 1991;128:1086-1092.
251. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 1986;324:641-646.
252. Wetterberg L. Melatonin in humans. Physiological and clinical studies. *J.Neural Transm.* 1978;13:289-310.
253. Wiechmann AF. Melatonin: Parallels in pineal gland and retina. *Exp.Eye.Res.* 1986;42:507-527.
254. Williams LM, Martinoli MG, Tichener LT, Pelletier G. The ontogeny of central melatonin binding sites in the rat. *Endocrinology* 1991;128:2083-2090.
255. Williams KW, Söderberg L. A carrier ampholyte for isoelectric focusing. *International Laboratory* 1979;Jan/Feb:
256. Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Santana C, Attia AM, Reiter RJ. Interferon-t modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J.Interferon Res.* 1990;10:403-411.
257. Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Attia AM, Reiter RJ. Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-t. *J.Pineal Res.* 1990;8:313-322.
258. Wurtman RJ, Apriletti JW. The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Prog.Horm Res.* 1969;25:493-522.