

GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101: COMUNICACIÓN INTERCELULAR
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE TECNOLÓGICO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE GRANADA



***Estudio de los mecanismos de
regulación de la síntesis, distribución y
efectos de la melatonina extrapineal***

Carmen Jesica Venegas Maldonado

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carmen Jesica Venegas Maldonado
D.L.: GR 1006-2013
ISBN: 978-84-9028-508-4

D. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Carmen Jesica Venegas Maldonado**, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado “**Estudio de los mecanismos de regulación de la síntesis, distribución y efectos de la melatonina extrapineal**” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 22 de Noviembre de 2012

Vº Bº Director

La interesada

Darío Acuña Castroviejo

Carmen Jesica Venegas Maldonado

Dña. GERMAINE ESCAMES, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Carmen Jesica Venegas Maldonado**, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado “**Estudio de los mecanismos de regulación de la síntesis, distribución y efectos de la melatonina extrapineal**” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 22 de Noviembre de 2012

Vº Bº Directora

La interesada

Germaine Escames

Carmen Jesica Venegas Maldonado

Financiación y proyectos

Becas y proyectos de investigación que han financiado este estudio

A. Becas predoctorales:

1. Ayuda predoctoral del grupo de investigación CTS-101: Comunicación Intercelular.

Duración: 2007-2008.

2. Contrato asociado al proyecto de investigación “Modelos de ratón con deficiencia primaria en ubiquinona: caracterización y aproximaciones terapéuticas” ref. SAF2009-08315.

Duración: 2010-2011.

B. Proyectos de investigación:

Título del Proyecto: Mecanismo de acción de la melatonina.

Entidad Financiadora: PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía).

Duración, Desde: 2005

Hasta: 2006

Código: CTS101-2005

Cantidad (€): 14.790,73

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo, D.

Título del Proyecto: Mecanismo de acción de la melatonina.

Entidad Financiadora: PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía).

Duración, Desde: 2006

Hasta: 2007

Código: CTS101-2006

Cantidad (€): 16.942,86

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo, D.

Título del Proyecto: Mecanismo de acción de la melatonina.

Entidad Financiadora: PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía).

Duración, Desde: 2007

Hasta: 2008

Código: CTS101-2007

Cantidad (€): 14.362,48

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo, D.

Título del Proyecto: Red temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad (RETICEF).

Entidad Financiadora: ISCIII.

Duración, Desde: 1-1-2007

Hasta: 31-12-2012

Código: RD06/0013/0008

Cantidad (€): 411.370,00

Investigador Principal: Acuña-Castroviejo, D.

Título del Proyecto: Modelos de ratón con deficiencia primaria en ubiquinona: caracterización y aproximaciones terapéuticas.

Entidad Financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación.

Duración, Desde: 1-1-2010

Hasta: 31-12-2012

Código: SAF2009-08315

Cantidad (€): 121.000,00

Investigador Principal: López García, L. C.

Título del Proyecto: Consecuencias moleculares y fisiopatológicas de la deficiencia en Coenzima Q: evaluación.

de estrategias terapéuticas alternativas al suplemento exógeno de ubiquinona

Entidad Financiadora: Consejería de Empresa, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia).

Duración, Desde: 1-1-2011

Hasta: 31-12-2014

Código: P10-CTS-6133

Cantidad (€): 234.247,00

Investigador Principal: López García, L. C.

Publicaciones y comunicaciones

A. Publicaciones científicas relacionadas con esta tesis.

Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García Corzo L, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. J Pineal Res 2012, 52:217-227.

Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. Venegas C, García JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. J Pineal Res 2012, doi 10.1111/jpi.12019.

B. Comunicaciones en congresos relacionadas con esta tesis.

Determinación de la melatonina tisular y su control por la melatonina pineal. Venegas C. Endocrine and Neural Systems in Aging, 2008.

Liver and brain subcellular distribution and synthesis regulation of melatonin. Venegas C, López A, Ortiz F, Dayoub JC, Chahbouni M, Escames G, Acuña-Castroviejo D. XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF), 2009.

Analysis of the subcellular distribution of melatonin in rat brain. Venegas C, García JA, García-Corzo L, Doerrier C, Ortiz F, Escames G, Acuña-Castroviejo D. 43rd European Brain and Behaviour Society Meeting, 2011.

Daily changes and regulation of melatonin receptors in rat liver. Venegas C, García JA, Escames G, Volt H, Leonardo-Mendonza R, Noguera T, García-Corzo L, Acuña-Castroviejo D. Joint FEPS & Spanish Physiological society scientific congress 2012, 2012.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Darío Acuña el haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi tesis doctoral en su laboratorio, pero sobre todo por haberme transmitido nuevos valores, como constancia, disciplina y meticulosidad, aumentando mi formación investigadora.

A la Dra. Germaine Escames, quien siempre ha estado dispuesta a compartir todos sus conocimientos conmigo y ayudarme a solucionar todas las dificultades que se me han presentado.

A mis padres, a los que les debo todo lo que tengo, los que han contribuido a que este momento sea posible, ofreciéndome en cada momento todos los medios que se encontraban a su alcance. Sin su esfuerzo y dedicación no estaría hoy aquí y no hubiese llegado a cumplir este sueño. Y claro, como no, a mi hermana, por haber estado siempre a mi lado, y compartir los buenos y malos momentos.

A mis compañeros, los que han hecho que esta etapa sea inolvidable, por ayudarme de forma desinteresada siempre que lo he necesitado (aunque les haya costado noches sin dormir). Pero sobre todo por no limitarse a ser simples compañeros, sino por haberse convertido en mis mejores amigos.

A Ana por estar siempre dispuesta a ayudarme y por brindarme su confianza y apoyo en todo momento.

A todos, muchísimas gracias.

Abreviaturas

AANAT: Arilalkilamina N-Acetiltransferasa.

AFMK: N¹-N²-formil-5-metoxiquinuramina.

AMK: N¹- acetil-5-metoxiquinuramina.

aMT: Melatonina.

ASMT: Acetilserotonina O-metiltransferasa.

BSA: Albúmina.

CaM: Calmodulina.

cAMP: Adenosín monofosfato-3',5' cíclico.

CAT: Catalasa.

cGMP: Guanosín monofosfato-3',5' cíclico.

CL: Luz Continua.

CRE: Elemento de respuesta a cAMP.

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta.

CTE: Cadena de transporte electrónico.

DBD: Dominio de unión al ADN.

GCS: Ganglio cervical superior.

GPx: Glutation Peroxidasa.

GRd: Glutation Reductasa.

GSH: Glutation.

GSSG: Glutation oxidado.

G-6-P-DH: Glucosa-6-P-Deshidrogenasa.

HOCl: Ácido hipocloroso.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

ICER: Represor inducible temprano.

LBD: Dominio de unión a ligando.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

Lz: Luzindol.

MAO: Monoamina oxidasa.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno.

NADPH: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido.

NAS: N-acetil-serotonina/ N-acetil-5-hidroxitriptamina.

NE: Norepinefrina.

nNOS: Óxido nítrico sintasa neural.

NSQ: Núcleo supraquiasmático.

PD: Pars Distalis.

PDE4B2: Fosfodiesterasa 4B2.

PKA: Proteína quinasa A.

PKA: Proteína quinasa C.

PT: Pars Tuberalis.

Px: Pinealectomizado.

QR2: Quinona reductasa 2.

RORE: Elemento de respuesta a ROR.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SIK1: Salt quinasa inducible 1.

SOD: Superóxido dismutasa.

TGI: Tracto gastrointestinal.

THP: L-triptófano-hidroxilasa.

5-MIAA: Ácido 5-metoxiindolacético.

5-ML: 5- metoxitriptofol.

5-MT: 5-metoxitriptamina.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. ESTRUCTURA DE LA MELATONINA	3
2. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA MELATONINA	5
2.1 BIOSÍNTESIS	5
2.2 METABOLISMO.....	7
3. REGULACIÓN DE LA MELATONINA PINEAL	9
4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA	14
4.1 UNIÓN A RECEPTORES DE MEMBRANA	14
4.2 INTERACCIÓN CON RECEPTORES NUCLEARES	21
4.3 INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS CITOSÓLICAS.....	26
4.4 ACCIÓN DIRECTA	26
4.5 EFECTOS SOBRE LA MITOCONDRIA	30
5. MELATONINA EXTRAPINEAL	31
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	38
MATERIAL Y MÉTODOS	42
1. GRUPOS EXPERIMENTALES	47
2. PROTOCOLO DE ESTUDIO	47
3. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR: AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS, CITOSOL Y NÚCLEOS DE HÍGADO Y CORTEZA CEREBRAL	48
4. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE HÍGADO Y CORTEZA CEREBRAL	51
5. EXTRACCIÓN DE MELATONINA EN PLASMA Y TEJIDO Y MEDIDA DE MELATONINA POR HPLC.	52
5.1. EXTRACCIÓN DE MELATONINA EN PLASMA	52
5.2 EXTRACCIÓN DE MELATONINA EN TEJIDO	52
5.3 CUANTIFICACIÓN DE MELATONINA POR HPLC	53
6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA DE LOS RECEPTORES MT1, MT2 Y RORα POR WESTERN BLOT.	53
6.1. PREPARACIÓN DE NÚCLEOS Y HOMOGENADO.....	53
6.2. WESTERN-BLOT DE ROR α	54
6.3. WESTERN BLOT DE MT1 Y MT2	55
7. EXTRACCIÓN DE RNA Y MEDIDA POR RT-PCR	56
7.1. EXTRACCIÓN DE RNA	56
7.2. RT-PCR.....	57

8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	59
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
RESULTADOS	46
1. RESULTADOS DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE MELATONINA	63
2. RESULTADOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES DE MELATONINA	73
DISCUSIÓN	83
1. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE MELATONINA	85
2. DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES DE MEMBRANA Y NUCLEARES	92
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	103
ANEXOS	121

Introducción

1. Estructura de la melatonina

La N-acetil-5metoxitriptamina es una indolamina descrita inicialmente por McCord y Allen (McCord CO y Allen EP, 1917), y aislada por primera vez a partir de extractos de glándula pineal de vaca por Lerner en el año 1958 (Lerner AB y colbs., 1958). En 1959 se identificó la estructura química de esta indolamina, y se propuso el nombre de melatonina (Lerner AB y colbs., 1959).

Desde un punto de vista químico, esta indolamina es un cristal orgánico, de color blanco, con un peso molecular de 232,38 Da, cuyo punto de fusión se encuentra entre 116-118° C, poco soluble en agua y muy soluble en etanol (Szmuskowicz AW and Heinzelman RV, 1960).

La melatonina está muy conservada a lo largo de la evolución ya que se encuentra desde organismos muy primitivos como cianobacterias, algas unicelulares, y parásitos como *Trypanosoma cruzi*, hasta organismos actuales (Paredes y colbs., 2009; Hardeland, 2008; Hardeland y Poeggeler, 2003; Macias y colbs., 1999). La melatonina se distribuye ubicuamente a través de todo el organismo, ya que su naturaleza anfipática le permite atravesar todas las barreras celulares. Se cree que su aparición podría ser consecuencia de una adaptación de los organismos para utilizar el oxígeno, debido a que esta molécula es capaz de neutralizar el efecto dañino que ejerce este gas sobre las diferentes estructuras celulares mediante la producción de radicales libres. A lo largo de la evolución, la melatonina ha ido adquiriendo numerosas funciones en el organismo, actuando además de como antioxidante, como antiinflamatorio y cronobiótico. Actualmente sabemos que, si bien las principales dianas celulares de la melatonina son el núcleo y la mitocondria, es su participación en la regulación de la homeostasis mitocondrial la que cada vez refleja en mayor medida su papel como protector celular.

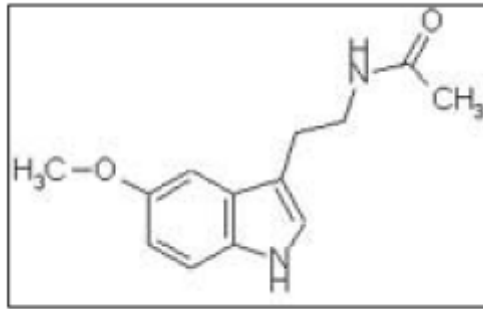


Figura 1. Estructura química de la melatonina.

Inicialmente se descubrió que la síntesis de la melatonina tenía lugar en la glándula pineal, conectada con el núcleo supraquiasmático, lo que relacionaba su acción en el marco de la fisiología circadiana y reproductiva (Arendt, 1995). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que la mayor parte, sino todos, los órganos y tejidos del organismo tienen los enzimas necesarios y la capacidad de síntesis de melatonina; entre estos se encuentran: retina, riñón, piel, glándula harderiana, hígado, timo, tiroides, páncreas, cerebelo, mucosa del intestino, epitelio respiratorio, ovarios, placenta, endometrio, así como en células no endocrinas tales como eosinófilos, plaquetas, células endoteliales y células natural killer (Kvetnoy y colbs., 2002). La demostración de la existencia de melatonina tisular se determinó mediante PCR, observándose la expresión de las dos enzimas clave para la biosíntesis de la indolamina: la arialquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) y la hidroxindol-O-metil transferasa, conocida actualmente como la acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) (Stefulj y colbs., 2001).

2. Biosíntesis y metabolismo de la melatonina

2.1 Biosíntesis

Su biosíntesis se origina a partir del triptófano, aminoácido captado del torrente circulatorio por parte del pinealocito a través de un mecanismo de transporte activo que se encuentra bajo control adrenérgico (Alonso R, 1999). El triptófano se hidroxila en posición 5 por la L-triptófano hidroxilasa (TPH) originándose 5-hidroxitriptófano; este paso ocurre en la mitocondria en presencia de una pteridina usada como cofactor, posiblemente la tetrahidrobiopterina, y, tras una descarboxilación mediada por la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa, pasa a 5-hidroxitriptamina o serotonina. Esta enzima se localiza en el citosol, su actividad esta regulada por la iluminación ambiental a través de fibras simpáticas y requiere como cofactor el fosfato de piridoxal (Snyder y cols., 1964). En este paso la serotonina puede sufrir una desaminación por acción de la MAO o una acetilación por acción de la AANAT, originándose la N-acetil-5-hidroxitriptamina o N-acetil-serotonina (NAS). La NAS se metila por la ASMT produciendo finalmente N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina. Aunque inicialmente se ha propuesto que la enzima limitante en la síntesis de melatonina es la AANAT, ya que exhibe el mismo ritmo circadiano que la melatonina y su actividad, así como la producción de melatonina, se inhiben con la luz, estudios recientes en ratas Long Evans Cinnamon, que tienen una disminución del 90% en la actividad de AANAT, demostraron que poseen los mismos niveles de melatonina que ratas controles. Además un aumento mantenido de la AANAT no conlleva un incremento proporcional de melatonina, lo que pone de manifiesto que la enzima limitante de la biosíntesis de esta hormona podría ser la ASMT (Liu y Borjigin, 2005).

Una vez sintetizada en la pineal, la melatonina se libera rápidamente al sistema vascular, accediendo a todos los tejidos, compartimentos celulares y fluidos como el líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, orina, semen, líquido folicular, bilis, líquido amniótico, líquido sinovial y leche materna. Debido a que la melatonina no se acumula en la glándula pineal, los niveles de la hormona en sangre son considerados el principal índice de su síntesis pineal (Reiter, 1991b). Sin embargo, la melatonina producida en los tejidos ocurre en cantidades mucho mayores que en la pineal, llegando a un rango micromolar (Reiter y Tan, 2003). Esta melatonina extrapineal permanece en el interior celular y no sale a la circulación, lo que sugiere que su acción biológica debe ser diferente a la de origen pineal.

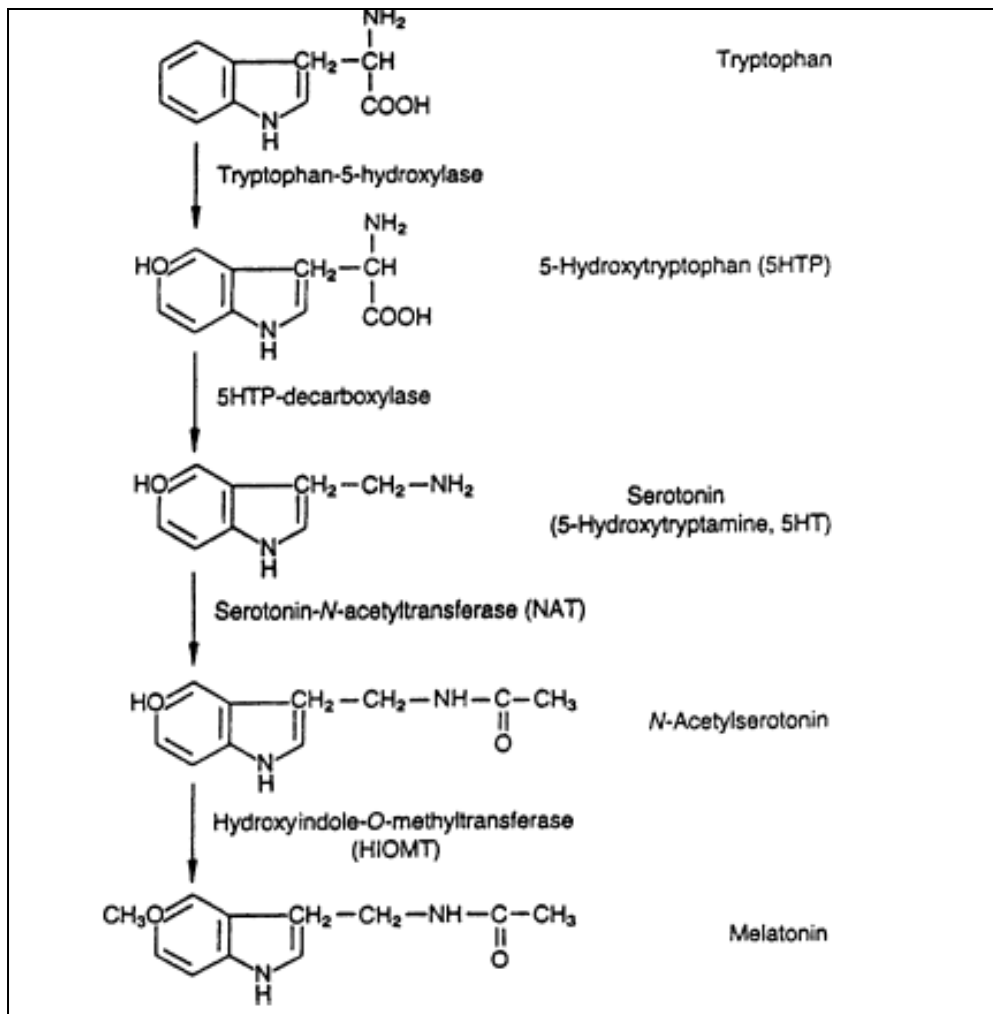


Figura 2. Ruta biosintética de la melatonina.

2.2 Metabolismo

La mayor parte de la melatonina que es vertida al torrente circulatorio se metaboliza en el hígado, donde se transforma en 6-hidroximelatonina mediante la acción de diversos sistemas enzimáticos como el citocromo P450 (CYP1A2, CYP1A1 y CYP1B1) (Ma y cols., 2005), o por depuración de dos OH^\bullet . La 6-hidroximelatonina se elimina a través de la orina, ya que es hidrosoluble debido a la conjugación con sulfatos y glucurónidos (KOPIN y cols., 1961; KVEDER y McISAAC, 1961; Hardeland y cols., 1993)

La melatonina en la retina, cerebro e hígado puede sufrir desacetilación y desaminación, convirtiéndose en 5-metoxindolacético y 5-metoxitriptofol (Cahill y Besharse, 1989). Existe otra vía por la que tiene lugar su degradación, ésta ocurre en cerebro, plexo coroideo, pineal y piel, donde la melatonina se transformaría en primer lugar en N¹-N²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) y posteriormente en N¹- acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), por medio de la 2,3-deoxigenasa (Hirata y cols., 1974; Leon y cols., 2006) (fig 3). Además de este origen, AFMK y AMK también se producen de manera no enzimática cuando la melatonina depura en primer lugar OH• y después O₂^{-•} (Fujiwara y cols., 1978).

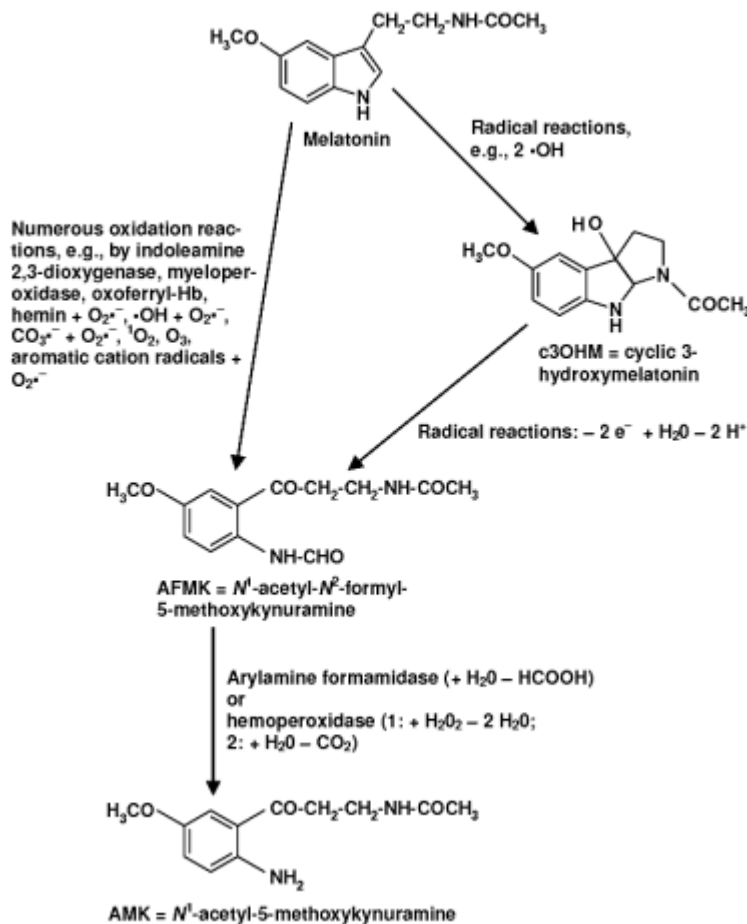


Figura 3. Vía quinurenínica de degradación de la melatonina.

La melatonina se metaboliza a AFMK cuando interacciona con el peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radical hidroxilo, aunque cuando interacciona con este último puede producir también otro metabolito, la 3-hidroximelatonina (Tan y colbs., 1998).

La 2-hidroximelatonina es también un metabolito hidroxilado de la melatonina. Es el principal producto procedente de la interacción de la melatonina con el ácido hipocloroso (Dellegar y colbs., 1999). La 2-hidroximelatonina y su ceto tautómero, 2-indolinona melatonina fueron identificados como productos de la interacción con la hemoglobina oxoférrica o con el hidroxilo (Agozzino y colbs., 2003; Horstman y colbs., 2002). Tan y colbs, han propuesto que 2-hidroximelatonina y su forma cetónica pueden ser generadas *in vivo* como un tautómero de 3-hidroximelatonina cíclica (Tan y colbs., 1998).

Como productos de la interacción de la melatonina con los peroxinitritos se forman nitrosomelatonina y 1-nitromelatonina (Blanchard y colbs., 2000; Peyrot y colbs., 2006). Sin embargo, el mecanismo de formación de estos metabolitos *in vivo* es aún desconocido.

3. Regulación de la melatonina pineal

La melatonina pineal tras ser sintetizada se vierte rápidamente al torrente circulatorio. Esta hormona sigue un ritmo circadiano, alcanzándose unos niveles máximos en plasma durante la noche, alrededor de las 2-3 de la madrugada. Los niveles diurnos oscilan entre 10-20 pg/ml, mientras que los nocturnos aumentan unas diez veces.

En la glándula pineal, el incremento nocturno de la síntesis de melatonina se controla por la liberación de norepinefrina (NE) procedente de los nervios simpáticos

que inervan el pinealocito (Klein, D. C. y colb., 1991). Esta liberación está controlada por el reloj circadiano en el núcleo supraquiasmático (NSQ), que envía una señal estimuladora a la glándula pineal por la noche a través de un circuito neuronal que incluye estructuras neuronales centrales y periféricas (Moore y Klein, 1974). El reloj circadiano NSQ está sincronizado por el fotoperiodo a través del tracto retinohipotalámico (Klein, D. C. y colb., 1991; Ganguly y colbs., 2002). Tal disposición asegura que la estimulación de la glándula pineal está estrechamente acoplada al ciclo ambiental de luz/oscuridad.

Durante el día, la luz mantiene hiperpolarizados ciertos fotorreceptores de la retina, lo que impide la transmisión de la señal al NSQ, bloqueando la activación de la vía polisináptica que inerva al pinealocito y la liberación de noradrenalina a éste. Sin embargo, por la noche, los fotorreceptores generan potenciales de acción que son conducidos vía retinohipotalámica hasta el NSQ, y de éste al ganglio cervical superior (GCS), que activa entonces la vía postganglionar simpática que libera noradrenalina. Esta noradrenalina estimula los receptores α y β adrenérgicos del pinealocito, provocando un aumento de hasta 100 veces en el nivel de cAMP (Klein, 1985), fosforilando una proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Roseboom y Klein, 1995; Maronde y colbs., 1997). Cuando CREB se fosforila, se une a CRE en el promotor de la AANAT (Baler y colbs., 1997) y se inicia su transcripción. La consecuencia es un aumento mayor de 100 veces en los niveles de mRNA de la AANAT durante la oscuridad, seguido por un aumento similar de la proteína AANAT, así como de su actividad (Roseboom y colbs., 1996).

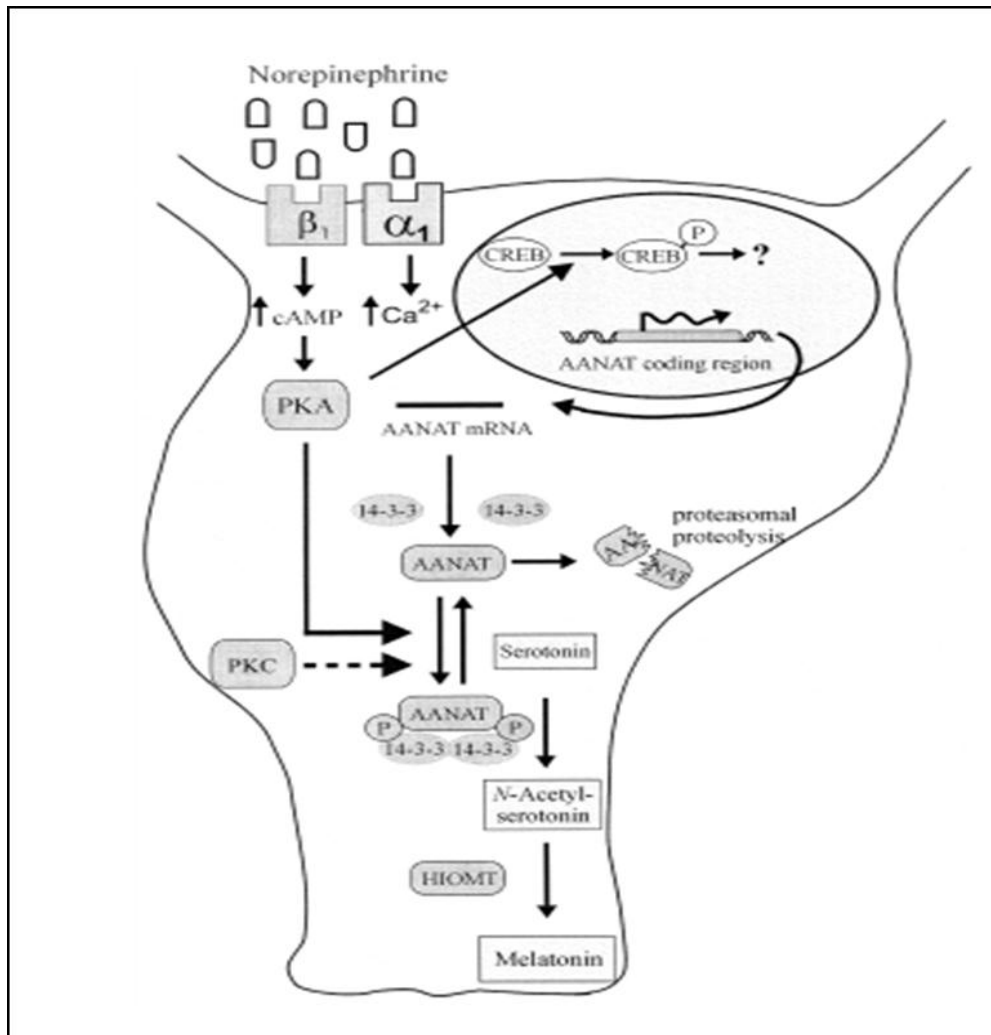


Figura 4. Vía de regulación de la melatonina pineal

Aunque esta es la vía más conocida, el mismo mecanismo está relacionado con la inducción de otros genes diana. Recientemente se ha observado que algunos de los más de 600 genes inducidos por esta misma vía de señalización, juegan un papel importante en la modulación de la transcripción de *Aanat* por la noradrenalina (Bailey y cols., 2009). Las moléculas implicadas en este proceso son MAP quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógenos), ICER (repressor inducible temprano), PDE4B2

(fosfodiesterasa 4B2), y SIK1 (Salt quinasa inducible). Además, la PKA también fosforila otras proteínas como factores de transcripción y moléculas de señalización que tienen impacto sobre la transcripción de *Aanat*.

Estudios previos en la glándula pineal de rata muestran fosforilación de p42/44MAPK y p38MAPK por la noradrenalina (Ho y Chik, 2000; Chik y cols., 2004; Ho y cols., 2006), estando la activación de p42/44MAPK mediada a través de la PKG, mientras que la p38MAPK es a través de la PKA. El incremento nocturno estimulado por la noradrenalina provoca un aumento de p42/44MAPK y en la amplitud de p38MAPK. Pero los mecanismos por los que MAPKs median sus propios efectos sobre AANAT permanecen por determinar, si bien podrían estar relacionados con la estabilidad del enzima.

Este proceso también puede regularse mediante la participación de la Aurora C, una quinasa que cataliza la fosforilación de la Ser10 de la H3 durante el proceso de mitosis (Crosio y cols., 2002; Sugiyama y cols., 2002). Aurora C parece tener un papel en la modulación de la expresión de genes inducidos por noradrenalina en la glándula pineal. Estudios recientes muestran que la ruta NE/cAMP/PKA también causa fosforilación en la histona por la activación de Aurora C. Esta teoría propone que la fosforilación de la histona inicia una serie de modificaciones que promueve el ensamblaje de la maquinaria transcripcional, la cual repercute en la transcripción de *Aanat* (Ho y Chik, 2010).

La transcripción de *Aanat* también está regulada por ICER. La vía NE/cAMP/PKA causa la síntesis de factores de transcripción inhibidores como ICER, un producto del gen *Crem* (Stehle y cols., 1993) y Fra-2 (Baler y Klein, 1995), que por competición con pCREB para el sitio CRE puede inhibir la transcripción de *Aanat*

(Foulkes y colbs., 1997; Maronde y colbs., 1997). Además, Fra-2 que es también inducido en la glándula pineal durante la noche puede inhibir la transcripción de *Aanat* por la interacción con el factor de transcripción AP-1 sobre el promotor del gen *Aanat* (Baler y colbs., 1997).

Otro factor que influye en la regulación de la *Aanat* es la fosfodiesterasa 4B2 (*Pde4b2*). El nivel de cAMP en la glándula pineal, que regula la transcripción mediada por PKA/pCREB, está determinado por el balance que se establece entre su síntesis vía adenil ciclasa y su degradación vía fosfodiesterasa (PDE). La elevación nocturna de la actividad de PDE en la glándula pineal es debida a un aumento en la transcripción de *Pde4b2* seguido del correspondiente incremento de la proteína y su actividad (Kim y colbs., 2007). Estos cambios están mediados a través del mecanismo cAMP/PKA, lo que sugiere que la inducción de *Pde4b2* por la noradrenalina puede afectar negativamente al nivel de cAMP, limitando la duración de respuestas a cAMP tales como la transcripción de *Aanat*.

Las riboproteínas nucleares también intervienen en la regulación de la AANAT. La degradación del mRNA de AANAT se encuentra bajo la regulación de un grupo de proteínas cuya función es desestabilizar el RNA (Kim y colbs., 2005). Estas proteínas son hnRNP R, hnRNP Q y hnRNP L, las cuales muestran un marcado ritmo circadiano y sus elevados niveles nocturnos se correlacionan con el declive en los niveles de mRNA de *Aanat* (Kim y colbs., 2005).

Por último, otro factor que esta implicado en la regulación de *Aanat* es SIK1 (Salt-inducible quinasa). Considerando el papel crucial de CREB en la regulación de la inducción de *Aanat* (Roseboom y Klein, 1995), su represión por SIK puede representar un mecanismo importante a través del cual puede regularse la expresión de la *Aanat* en

la glándula pineal. Estudios sobre la regulación de la quinasa muestran una rápida inducción de *Sik1* por la NE en cultivos de pinealocitos que precede a la inducción de *Aanat* (Kanyo y colbs., 2009). La inducción de *Sik1* está regulada a través de la vía receptores beta-adrenérgicos/cAMP/PKA, la misma ruta que origina la transcripción de *Aanat* (Klein y colbs., 1997).

Los mecanismos por los que SIK 1 ejerce su acción sobre la expresión de *Aanat* no están claros. Algunos estudios sugieren que SIK1 puede ejercer su acción por la fosforilación de TORC, un coactivador específico de CREB (Takemori y colbs., 2002; Takemori y colbs., 2007; Conkright y colbs., 2003), que permite exportar a TORC desde el núcleo y secuestrarlo en el citoplasma por una vía de fosforilación dependiente de la asociación con la proteína 14-3-3. Esto resulta en la reducción de la actividad transcripcional de CREB (Screaton y colbs., 2004).

4. Mecanismos de acción de la melatonina

El descubrimiento en los últimos años de diferentes dianas celulares sugiere una variedad de mecanismos de acción para la melatonina, actuando a través de sus receptores, (tanto de membrana como nucleares), a través de proteínas citosólicas o por interacción directa. En la actualidad se han descrito cinco mecanismos de acción de la melatonina: 1) Unión a receptores de membrana, 2) Unión a receptores nucleares, 3) Interacción con proteínas citosólicas, 4) Interacción directa e 5) Interacción con la mitocondria.

4.1 Unión a receptores de membrana

El primer receptor de melatonina, denominado Mel1c fue clonado en *Xenopus laevis* en 1994 (Ebisawa y colbs., 1994). Más tarde se describieron otros dos tipos de

receptores de melatonina, clasificándose según su afinidad en receptores de alta afinidad (MT1 y MT2) (Reppert y colbs., 1994; Reppert y colbs., 1995) o de baja afinidad (MT3) (Dubocovich, 1995).

Los receptores mejor caracterizados son los receptores de membrana MT1 y MT2. La clasificación entre MT1 y MT2 está basada en diferencias cinéticas y farmacológicas sobre la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina al receptor. La unión de la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina a MT1 es reversible, saturable y de alta afinidad ($K_d < 300$ pM) (Ebisawa y colbs., 1994; Dubocovich y Takahashi, 1987; Krause y Dubocovich, 1991; Reppert y colbs., 1994). Su cinética de asociación y disociación es lenta y depende de la temperatura de incubación, mostrando un aumento en la afinidad a medida que aumenta la temperatura (Dubocovich y Takahashi, 1987; Krause y Dubocovich, 1991; Dubocovich y colbs., 1989). Por el contrario, la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina con MT2 posee baja afinidad ($K_d = 0.9-10$ nM) y sus cinéticas de asociación y disociación son muy rápidas en la membrana cerebral de hámster y en la línea celular RPMI1846. Como hemos mencionado anteriormente la clasificación de los receptores se ha hecho en base al perfil farmacológico obtenido a través de la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina al receptor. Sin embargo, esta unión se encuentra influenciada por cambios en la afinidad dependiendo de la temperatura de incubación, la pureza y concentración del radioligando, la presencia o ausencia de cationes y GTP endógeno. La unión del ligando al receptor disminuye en presencia de Na^+ , mientras no se ve afectada por la presencia de Mg^{2+} en cerebro y retina de pollo ni en el NSQ y área postrema en ratas (Dubocovich y Takahashi, 1987; Dubocovich y colbs., 1989; Laitinen y Saavedra, 1990b; Laitinen y Saavedra, 1990a). En otros tejidos el Ca^{2+} promueve la unión al receptor MT1 (Dubocovich y Takahashi, 1987; Dubocovich y colbs., 1989; Laitinen y Saavedra, 1990b). Por el contrario, la unión a MT2 en las membranas cerebrales del hámster no es

sensible a los diferentes iones y al GTP (Duncan y cols., 1988). En la retina y cerebro de pollo la afinidad por MT1 aumenta con la temperatura de incubación, con unos valores de K_d de 434,72 y 57 pM para unas temperaturas de incubación de 4,25 y 37° C, respectivamente, con un aumento máximo a los 25° C. Sin embargo, la unión a MT2 es menor cuando aumenta la temperatura de incubación (Dubocovich, 1995). Para eliminar la influencia de todos estos factores se compararon bajo las mismas condiciones las características farmacológicas de los receptores de melatonina en la retina del pollo. Tras la interacción de estos receptores con distintos agonistas y antagonistas, el perfil farmacológico es el siguiente: 2-iodomelatonina \geq melatonina > 6-hidroximelatonina \gg N-acetil 5-HT \gg 5-HT > prazosin, para MT1. El perfil farmacológico de MT1 en retina de pollo es similar al descrito en neuronas de mamíferos, al de retina de conejo y corteza cerebral (Stankov y cols., 1992), al del NSQ y arteria caudal de rata y al de la pars tuberalis de oveja (Viswanathan y cols., 1990; Laitinen y Saavedra, 1990a). Sin embargo el perfil es distinto para MT2, siguiendo el orden: 2-iodomelatonina > prazosin \geq N-acetil 5-HT \geq melatonina \geq 6-hidroximelatonina \gg 5-HT.

El receptor MT1 se localiza en humanos en el cromosoma 4q35.1 y posee 350 aminoácidos (Slaugenhaupt y cols., 1995), mientras que MT2 se localiza en el cromosoma 11q21-22 y contiene 363 aminoácidos, siendo la homología entre ellos del 60% (Reppert y cols., 1995). Ambos receptores muestran un alto nivel de similitud con otras especies, como la rata, un 84,1 y 78,3 % para MT1 y MT2 respectivamente (Ishii y cols., 2009). Pertenecen a una familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G, y actúan modulando señales intracelulares inhibiendo la adenilato ciclasa, lo que provoca un descenso en la actividad de la PKA y la fosforilación de CREB, y estimulando el inositol fosfato (Godson y Reppert, 1997). Ambos receptores se expresan en una amplia variedad de tejidos; así, mientras que MT1 se expresa en

cerebro, sistema cardiovascular, sistema inmune, testículos, ovarios, piel, hígado, riñón, corteza adrenal, placenta, retina, páncreas y bazo (Dubocovich y Markowska, 2005; Fischer y colbs., 2008; Pandi-Perumal y colbs., 2008; Slominski y colbs., 2005; Slominski y colbs., 2008), MT2 se expresa en sistema inmune, cerebro, retina, pituitaria, testículos, riñón, tracto gastrointestinal, glándulas mamarias, tejido adiposo y piel (Dubocovich y colbs., 2005; Reppert y colbs., 1995; Roca y colbs., 1996; Slominski y colbs., 2005). La expresión de estos receptores depende de varios factores, como la especie, el tejido, la luz ambiental, el estado endocrino y el estado del desarrollo en que se encuentre el individuo (Vanecek, 1998). Diversos estudios han mostrado estas variaciones. En pars distalis (PD) de rata se vio que la densidad de los receptores durante el desarrollo embrionario y el día del nacimiento era de 30 fmol/mg, pero decrece bruscamente 10 veces al llegar al mes de vida (Vanecek, 1988), aunque los factores por los que se induce este descenso permanecen desconocidos. Sin embargo, no se encontraron cambios durante el desarrollo en otras áreas, como NSQ y pars tuberalis (PT); en el hámster, sin embargo, se observa una reducción de la expresión de MT2 en NSQ a partir del día 12 de vida (Duncan y colbs., 1989), y al llegar a adulto esta expresión en NSQ se regula por el fotoperiodo (Gauer y colbs., 1994). Otro factor que influye en la regulación de estos receptores, aunque sólo se ha observado en mamíferos, es el nivel de estradiol circulante, donde aparece una relación inversa entre los niveles de este estrógeno y la densidad de receptores MT1 en arterias cerebrales y caudales de ratas hembra (Seltzer y colbs., 1992). MT1 también se encontró en las capas epiteliales y subepiteliales del intestino. En el intestino, MT1 está regulado por la ingesta, ya que tras someter a las ratas a un ciclo de 12:12 h luz/oscuridad, la expresión de la capa subepitelial en el colon distal no presentó ritmo alguno, mientras que después de la ingesta se observó que aumentaba la expresión de MT1 en la capa subepitelial del

intestino grueso y delgado. Tras la ingesta, este incremento persistió a largo plazo sólo en el colon, mientras que en determinados segmentos del intestino volvió a los niveles basales (Sotak y cols., 2006). Otros factores que actúan en la regulación de MT1 son las hormonas ováricas en el estroma antimesometrial. La función de estas hormonas se estudió durante el ciclo estral, donde la ovariectomía con o sin tratamiento con estradiol y/o progesterona provocó que la unión de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina al receptor fluctuara durante este ciclo. La ovariectomía redujo casi un 70% la unión al receptor; sin embargo, tras ser tratadas las ratas con estradiol o progesterona, a los 11 días se observó casi una completa restauración, indicando que MT1 está regulado por estas hormonas (Zhao y cols., 2002). La expresión de estos receptores (MT1 y MT2) en la piel de mamíferos varía dependiendo de la especie y es específica del tipo celular. La piel humana presenta ambos receptores, aunque MT1 es el predominante. Por el contrario, MT2 predomina o es el único receptor presente en la piel de ratones C57BL/6, donde se expresa en función de la fase del ciclo de vida del pelo, y los niveles máximos se encuentran asociados al proceso de involución de los folículos pilosos (Slominski y cols., 2003; Slominski y cols., 2004; Slominski y cols., 2005). La expresión de MT1 y MT2 en la piel también se modifica por factores medioambientales, como la radiación ultravioleta, patologías como el cáncer de piel y por el background genético (Slominski y cols., 2005). Por ejemplo, la exposición a la luz ultravioleta induce la activación de la expresión de MT1 en los melanocitos de recién nacidos y la inhibe en el caso de los melanomas, mientras que esta misma exposición estimula la expresión de MT2 en melanocitos y fibroblastos en individuos adultos (Slominski y cols., 2005).

Como hemos mencionado anteriormente, la melatonina ejerce muchas de sus funciones a través de los receptores de membrana. Estos receptores participan en numerosos procesos y, por ejemplo, MT1 actúa en el mecanismo de regulación de los

ritmos circadianos en NSQ, su activación en PT en ratones induce una expresión de los genes reloj (Ekmekcioglu, 2006), y está implicado en la secreción de prolactina. La expresión de los receptores MT1 en los fotorreceptores del ojo humano indica que la melatonina actúa directamente en la vía de la transducción visual (Scher y cols., 2002). Esto sugiere la participación en la regulación del crecimiento y modulación de las fibras y las capas esclerales que afectan a la medida del ojo y a la refracción. Además, participa en la regulación de la secreción del humor acuoso y en el mantenimiento de la presión intraocular (Osborne y Chidlow, 1994). Estos receptores actúan también a nivel del sistema cardiovascular. A pesar de haber encontrado receptores de membrana en la pared ventricular, el proceso en el que participan no está claro, si bien se cree que podrían estar implicados en la modulación de receptores β -adrenérgicos mediados por cAMP o en la estimulación de canales de calcio activados por voltaje (Mei y cols., 2001). Diversos estudios indicaron que la melatonina puede tener efecto vasodilatador en los vasos sanguíneos si se activa MT2, mientras que si lo hace MT1 su efecto es vasoconstrictor. También se observó que estos receptores estaban implicados en procesos de termorregulación (Viswanathan y cols., 1990) y que actuaban disminuyendo la presión arterial en humanos (Arangino y cols., 1999), aunque no se conoce que tipo de receptor actúa en cada caso. En el sistema reproductor actúan modulando la contracción del útero e incrementan los niveles del receptor de la hormona luteinizante. También la melatonina ejerce diversas funciones en el sistema gastrointestinal ya que puede modular el transporte de iones y participar en la motilidad intestinal (Bubenik, 2002). Puesto que tras la ingesta se produce un aumento en la secreción de melatonina (Bubenik, 2008), ésta podría actuar disminuyendo la peristalsis, proporcionando así más tiempo al tracto intestinal para absorber los nutrientes. La melatonina también puede estimular la secreción calcio-dependiente de bicarbonato en

las células enterocromafines a través de MT2, ya que el luzindol y el antagonista N-pentanoil-2-benziltriptamina inhiben este efecto (Sjoblom y colbs., 2003). La melatonina actúa a través de sus receptores de membrana también en riñón, donde los protege de la inflamación (Quiroz y colbs., 2008) y regula la filtración glomerular (Drew y colbs., 1998). Se ha observado que también actúa en el hueso a través de MT1, aumentando la actividad osteoblástica y disminuyendo la osteoclástica (Cardinali y colbs., 2003). Por último, la melatonina ejerce sus propiedades antiproliferativas a través de estos receptores, como ocurre en cáncer de próstata, mama, ovario, colon y piel (Slominski y colbs., 2012; Pandi-Perumal y colbs., 2008; Garcia-Navarro y colbs., 2007).

Debido a las múltiples acciones que ejerce la melatonina a través de sus receptores, es importante conocer donde se localizan y la función que ejerce la melatonina a través de éstos, ya que nos permitirá la posibilidad de establecer terapias contra diversas patologías en las que se encuentran implicados.

Aunque MT3 no ha sido identificado en humanos, se ha observado su expresión en hámsters (Nosjean y colbs., 2001), donde los mayores niveles de expresión se encontraron en el hígado y riñón, seguido por el corazón, tejido adiposo y cerebro (Nosjean y colbs., 2001; Jaiswal, 1994; Long y Jaiswal, 2000). MT3 se caracteriza por presentar una baja afinidad por 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina (5-50 nM), al contrario que MT1 y similar a MT2; además no está acoplado a proteínas G y no está regulado por la presencia de Na⁺, Mg⁺² o Ca⁺² (Dubocovich, 1995). Posteriormente se identificó MT3 como la enzima quinona reductasa 2 (QR2), que pertenece a un grupo de reductasas que participan en la protección contra el estrés oxidativo previniendo la transferencia de electrones (Nosjean y colbs., 2000). Además, actúa detoxificando xenobióticos, ya que

se ha observado que tras la ruptura del gen de *qr2* se genera hiperplasia mieloide (Long y colbs., 2002).

GPR50 fue clonado en 1996 y clasificado en principio como miembro de la familia de receptores de melatonina, ya que presentaba un 45% de homología con MT1 y MT2 (Reppert, 1996) así como propiedades características de esta familia. A pesar de esta homología, la melatonina no se une a GPR50 y la identidad de su verdadero ligando permanece desconocida. Más de 15 años después de su descubrimiento, la función de GPR50 permanece desconocida, aunque recientes estudios genéticos están empezando a dilucidarla. Se ha observado que existen tres polimorfismos localizados en el exón 2 en humanos, los cuales inducen cambios en el extremo carboxilo terminal, uno de ellos concretamente es una delección de 4 aminoácidos (Thr-Thr-Gly-His) que se ha asociado a un incremento del riesgo de sufrir depresión o trastorno bipolar en mujeres escocesas (Thomson y colbs., 2005); sin embargo, los efectos de esta delección no se han manifestado en la población sueca (Alaerts y colbs., 2006). Recientemente se ha observado que GRP50 puede formar heterodímeros con MT1 y MT2, regulando la actividad de MT1 ya que inhibe la unión a su ligando, mientras que no modifica esta propiedad cuando se une a MT2 (Jockers y colbs., 2008), lo que lleva a una nueva línea de investigación sobre los mecanismos de acción de la melatonina.

4.2 Interacción con receptores nucleares

Los primeros indicios de la existencia de receptores nucleares para la melatonina se pusieron de manifiesto tras aislar melatonina en el núcleo celular, planteando que ésta podría modificar la expresión génica celular (Withyachumnarnkul y colbs., 1986). Posteriormente Menéndez-Peláez y colbs (1993) demostraron la presencia de melatonina en el núcleo y, mediante el uso de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina, Acuña-

Castroviejo y colbs demostraron su unión específica a la fracción proteica del núcleo de hígado de rata (Acuna-Castroviejo y colbs., 1993; Acuna-Castroviejo y colbs., 1994), lo que sugería la existencia de receptores nucleares para la melatonina.

En 1994 Becker-Andre y colbs (Becker-Andre y colbs., 1994) demostraron una acción genómica de la melatonina a través de los receptores nucleares ROR α . Existe cierta controversia actual sobre si los factores de transcripción ROR son verdaderos receptores nucleares de melatonina, aunque hay numerosas publicaciones avalando este punto de vista (Carrillo-Vico y colbs., 2005; Lardone y colbs., 2011).

La familia de receptores ROR se divide en tres subtipos, ROR α (Becker-Andre y colbs., 1993; Giguere y colbs., 1994; Giguere y colbs., 1995), ROR β (Andre y colbs., 1998a; Carlberg y colbs., 1994) and ROR γ (He y colbs., 1998; Hirose y colbs., 1994), localizados en los cromosomas 15q22.2, 9q21.13 y 1q21.3 respectivamente (Jetten, 2009). Cada gen posee varias isoformas debido a las variantes de splicing, diferenciándose sólo en su extremo amino terminal (Andre y colbs., 1998a; Giguere y colbs., 1994; Hamilton y colbs., 1996). En humanos se han encontrado 4 isoformas de ROR α (ROR α 1-4), mientras que en ratón sólo se han descrito las isoformas 1 y 4. De las dos isoformas que genera ROR β , en humanos sólo se expresa la 1 (Andre y colbs., 1998a) y en ambas especies se expresan las dos isoformas generadas por ROR γ (Hirose y colbs., 1994; He y colbs., 1998; Medvedev y colbs., 1996). La mayoría de las isoformas muestran una expresión específica de tejido y están implicadas en la regulación de diferentes procesos fisiológicos. Aunque la mayoría de las isoformas se encuentran bajo el control de diferentes promotores, apenas existe información sobre la regulación transcripcional de su expresión. ROR α se expresa prácticamente en todos los tejidos periféricos, como en tejido adiposo, piel, testículos, cartílago e hígado (Smirnov,

2001), ROR β en cerebro y retina (Andre y colbs., 1998b) y ROR γ en tejido adiposo, musculo esquelético, hígado, riñón y sistema inmune (Smirnov, 2001; Hirose y colbs., 1994; He y colbs., 1998).

La estructura de ROR es la típica de un receptor nuclear, la cual contiene 4 dominios funcionales: un dominio N-terminal, seguido por un dominio de unión al DNA (DBD) altamente conservado, un dominio bisagra y un dominio de unión a ligando (LBD) (Evans, 1988; Giguere, 1999; Moras y Gronemeyer, 1998; Jetten y colbs., 2001). El dominio DBD es un dominio muy conservado que contiene dos dedos de zinc los cuales reconocen específicamente al elemento de respuesta de ROR (RORE), el cual es una secuencia consenso (AGGTCA) precedida de una secuencia de 6 pares de bases rica en AT. A través de este elemento de repuesta, ROR regula la transcripción genética (Andre y colbs., 1998b; Carlberg y colbs., 1994; Giguere y colbs., 1994; Jetten y colbs., 2001). ROR se une al DNA como monómeros y reconocen a RORE (Andre y colbs., 1998a; Carlberg y colbs., 1994; Giguere y colbs., 1994; Moraitis y Giguere, 1999). Esta interacción está mediada por la P-box, situada entre las dos últimas cisteínas dentro del primer dedo de zinc y gracias a la cual se reconoce el núcleo de un motivo concreto situado en el surco mayor, y una extensión de 30 pares de bases del extremo C-terminal, situada por debajo de los dos dedos de zinc, y que interacciona con un segmento rico en AT de RORE presente en el surco menor (Andre y colbs., 1998a; Giguere y colbs., 1995; Jetten y colbs., 2001). El extremo amino terminal también participa confiriendo una alta especificidad en la unión de varias isoformas de RORs al DNA (Giguere y colbs., 1994; Andre y colbs., 1998a; Giguere y colbs., 1995; Sundvold y Lien, 2001). Además de la secuencia de RORE y del extremo amino terminal, el promotor puede determinar que ROR se una a un determinado RORE (Jetten, 2009).

En ciertas ocasiones, los receptores nucleares compiten entre ellos por el mismo elemento de respuesta, como se ha visto en el caso de ROR y Rev-ErbA α y Rev-ErbA β (Giguere y colbs., 1995; Burris, 2008). Rev-ErbA actúa como represor transcripcional, siendo capaz de inhibir ROR mediante su activación transcripcional por competición con ROR por el mismo elemento de respuesta (Austin y colbs., 1998; Bois-Joyeux y colbs., 2000; Downes y colbs., 1996; Jetten, 2009). Estudios recientes han identificado su significado fisiológico, ya que se observó que Rev-ErbA y ROR α reprime y activa, respectivamente, la transcripción de Bmal1, que codifica un factor de transcripción que regula el ritmo circadiano por competición con RORE en el promotor de Bmal1 (Akashi y Takumi, 2005; Albrecht, 2002; Gachon y colbs., 2004; Nakajima y colbs., 2004).

La expresión de los receptores nucleares depende del estado de desarrollo, tejido y estado endocrino. Por ejemplo, la expresión de ROR α es máxima a los 16 días de vida en el cerebelo, el tálamo y el bulbo olfatorio, mientras que en el hipocampo la máxima expresión ocurre a los 7 días (Sashihara y colbs., 1996) y la expresión en los testículos se detecta únicamente después de la maduración sexual del individuo (Steinmayr y colbs., 1998). En la actualidad, el mecanismo que regula dicha expresión permanece desconocido, aunque se cree que esta regulación puede ser mediada a través de sus ligandos o por diferentes quinasas.

Otros estudios sobre ROR han puesto de manifiesto su papel en numerosos procesos biológicos, regulando el desarrollo embrionario, los ritmos circadianos, procesos de diferenciación y proliferación celular, regulación del sistema inmune, y del metabolismo celular. La expresión de ROR γ -t protege a los hibridomas de células T contra la muerte mediante la inhibición de la unión al ligando Fas y la formación de IL-2, sugiriendo así la participación de ROR γ -t en la respuesta inmune (He y colbs., 1998).

La participación de ROR α en la respuesta inmune está relacionada con la inhibición de la enzima 5-lipooxigenasa, la cual participa en el proceso de biosíntesis de leucotrienos proinflamatorios en los linfocitos B humanos (Steinhilber y colbs., 1995). ROR α participa en la regulación del desarrollo del sistema nervioso central, ya que su déficit, ausencia o mutación (espontánea o inducida con el extremo carboxilo terminal truncando o sin dominio de unión al ADN), provoca que los animales presenten temblor cerebeloso, tamaño reducido, e incapacidad para mantener el equilibrio. El cerebelo de estos animales no se encontraba desarrollado, y el nivel de células de Purkinje era muy bajo (Dussault y colbs., 1998), siendo sus características electrofisiológicas diferentes a los ratones normales (Steinmayr y colbs., 1998). Además, también se encontraron diversas anormalidades tanto morfológicas como funcionales en el bulbo olfatorio (Monnier y colbs., 1999). En estos animales mutantes se observó también que los niveles de expresión de la apolipoproteína A-1 en el intestino delgado eran más bajos que en los controles, sugiriendo así su papel en la regulación del metabolismo lipídico. Como resultado, se manifestó una predisposición al desarrollo de aterosclerosis (Mamontova y colbs., 1998). ROR β participa en la formación de elementos encargados en el procesamiento de la información. La expresión de ROR β en células de la retina (procedentes de origen neuronal) se reduce cuando existe una mutación nula del gen *Chx10*, la cual induce un retraso en el desarrollo del ojo, mientras que la transfección de ROR β en las células progenitoras acelera su proliferación, sugiriendo su participación en el desarrollo ocular (Chow y colbs., 1998). La elevada expresión de ROR α y ROR γ en el músculo esquelético sugiere que deben participar en la regulación de la función muscular o en la miogénesis (Becker-Andre y colbs., 1993; Hirose y colbs., 1994; Lau y colbs., 1999). En este sentido, los ratones deficientes en ROR α sufren atrofia muscular, aunque el mecanismo por el que ocurre esta atrofia no se conoce.

4.3 Interacción con proteínas citosólicas

La melatonina puede interactuar con proteínas citosólicas como la calmodulina (Benitez-King y Anton-Tay, 1993), calreticulina (Macias y colbs., 2003), tubulina (Cardinali y Freire, 1975) y proteína quinasa C (PKC) (Benitez-King y colbs., 1996). La calmodulina es una proteína encargada de quelar el calcio, lo que le permite modular la actividad de muchas enzimas. Entre éstas se encuentran la fosfodiesterasa y la adenilato ciclasa (Cheung, 1970; Cheung y colbs., 1975). La unión melatonina-calmodulina inhibe la actividad fosfodiesterasa de forma concentración-dependiente, modulando así las señales intracelulares de calcio (Benitez-King y Anton-Tay, 1993; Benitez-King y colbs., 1996; Ouyang y Vogel, 1998). El complejo melatonina-calmodulina inhibe también la CaM quinasa II (Benitez-King y colbs., 1996) y la óxido nítrico sintasa neural (nNOS) (Hardeland, 1997; Bettahi y colbs., 1996; Leon y colbs., 2000). La melatonina activa la PKC de forma calcio-dependiente (Benitez-King y colbs., 1996). Todas estas proteínas participan en el metabolismo del calcio y participan en la modulación de la estructura del citoesqueleto (Benitez-King y Anton-Tay, 1993; Benitez-King, 2006).

4.4 Acción directa

La melatonina puede actuar como un potente antioxidante depurando diferentes especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Tan y colbs., 1993). La melatonina principalmente actúa sobre el radical OH^\bullet (Tan y colbs., 1993; Reiter y Tan, 2002), ROO^\bullet (Pieri y colbs., 1994) y oxígeno singlete (Cagnoli y colbs., 1995). También puede depurar el H_2O_2 (Tan y colbs., 2000) el radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Marshall y colbs., 1996; Zang y colbs., 1998) y el ácido hipocloroso (HOCl) (Marshall

y colbs., 1996). Cuando la melatonina interacciona con OH^\bullet le cede un electrón y se origina un radical indolil. Éste puede reaccionar con otro OH^\bullet y producir 3-hidroxi melatonina cíclica, eliminando dos OH^\bullet (Reiter y colbs., 2001), o puede reaccionar con O_2^- y formar AFMK. Puesto que ambos metabolitos (3-hidroxi melatonina cíclica y AFMK), se eliminan a través de la orina, su cuantificación sería una forma indirecta de medir el índice de estrés oxidativo del organismo (Tan y colbs., 1998).

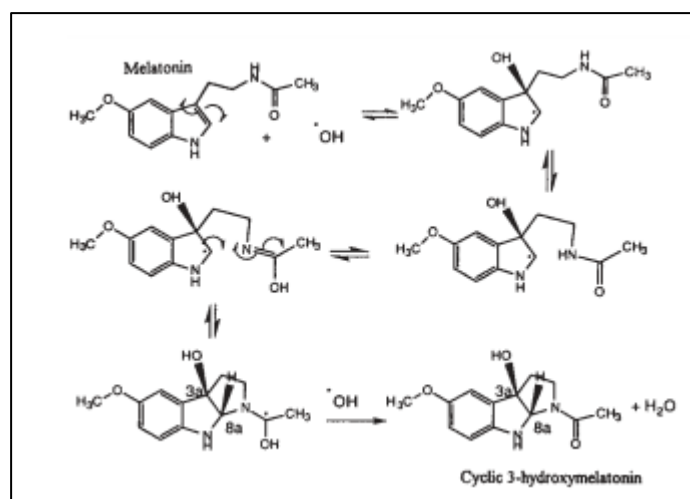


Figura 5. Ruta de eliminación de dos OH^\bullet por una molécula de melatonina.

La melatonina también puede depurar H_2O_2 produciendo AFMK (Tan y colbs., 2000). La interacción de la melatonina con el peróxido de hidrógeno puede ocurrir a través del intermediario dioxenato o a través de la epoxidación de un alqueno, seguido de la hidrólisis del diol que es la futura forma oxidada. Finalmente, el AFMK es enzimáticamente transformado a AMK por la catalasa.

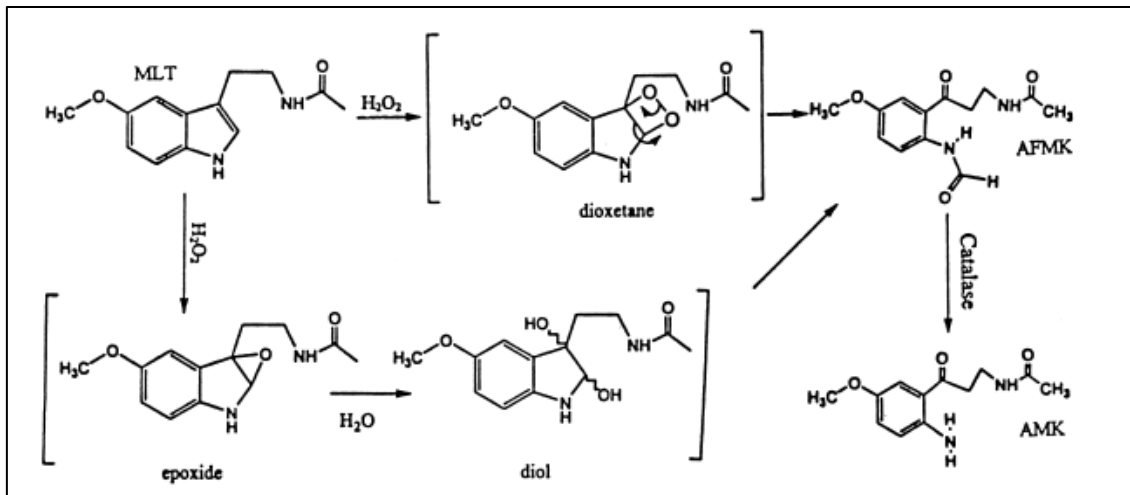


Figura 6. Ruta de eliminación de H_2O_2 por la melatonina.

Si la melatonina tiene o no algún papel importante en la depuración del radical $O_2^{\cdot-}$ está en debate. Se ha sugerido que el radical melatonil formado cuando la melatonina dona un electrón puede secundariamente depurar el anión superóxido (Hardeland y cols., 1993).

Aunque el oxígeno singlete no es un radical libre, es un potente oxidante y daña una amplia variedad de moléculas. Al igual que el proceso de neutralización del peróxido, la oxidación que la melatonina sufre en la neutralización genera el metabolito AFMK (de Almeida y cols., 2003).

La melatonina también tiene la capacidad de depurar HOCl. La melatonina reacciona con el HOCl protegiendo la catalasa de la oxidación (Marshall y cols., 1996). El producto de esta interacción es la 2-hidroximelatonina (2-OHM). La melatonina es una molécula muy lipofílica y su capacidad para eliminar HOCl depende

de la concentración de agua, por lo que el mecanismo por el que desactiva HOCl en porciones hidrofóbicas de las células permanece aún sin estar claro.

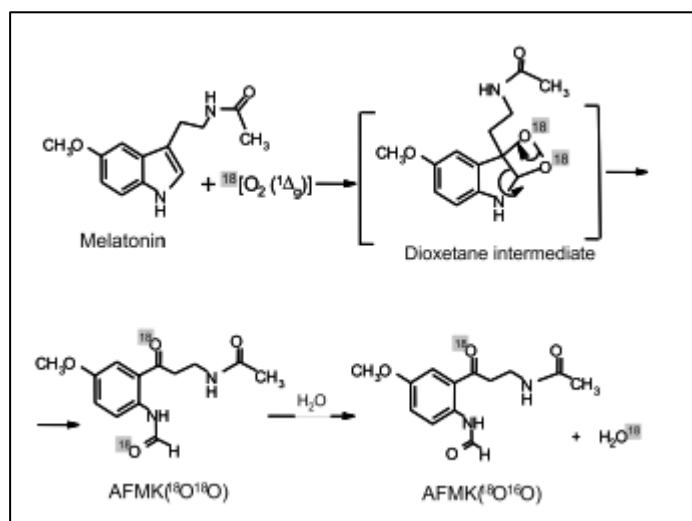


Figura 7. Mecanismo propuesto para la oxidación de melatonina por $^{18}\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Tras la interacción con peroxinitritos la melatonina se metaboliza a 6-hidroxi melatonina (Qi y colbs., 2000; Maharaj y colbs., 2003b; Maharaj y colbs., 2003a). Los peroxinitritos se descomponen en presencia de CO_2 o proteínas que contengan grupo hemo. Si en el medio hay iones bicarbonato como producto resultante aparece 2-hidroxi melatonina cíclica y 3-hidroxi melatonina cíclica.

La melatonina además actúa como antioxidante de acción indirecta. Es capaz de activar a diversos sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y reductasa (GRd) (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Leon y colbs., 2004; Reiter y colbs., 2003). Además estimula la expresión de la γ -

glutamilcisteína sintasa (Urata y cols., 1999), enzima limitante en la síntesis del glutatión. Y por último, estimula la síntesis de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P-DH), enzima clave a la hora de generar el NADPH requerido por la GRd (Pierrefiche y Laborit, 1995).

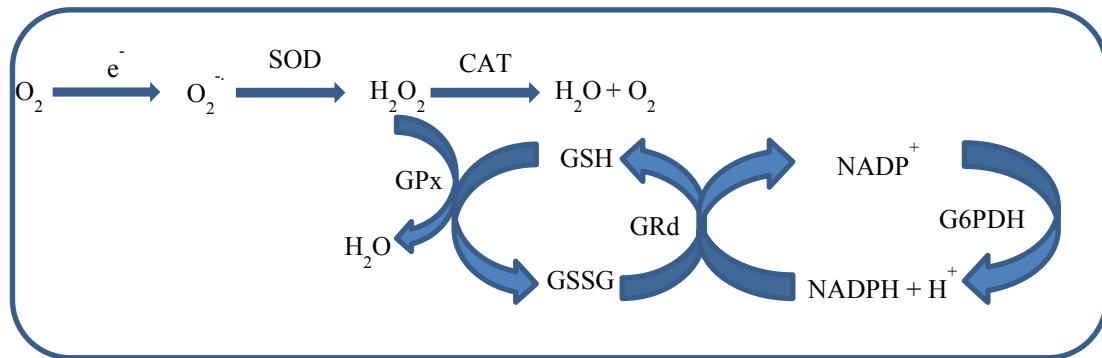


Figura 8. Sistema enzimático de defensa antioxidante.

La melatonina aumenta la eficiencia de otros antioxidantes naturales, ya que el grupo N-acetil posee una acción sinérgica con las vitaminas C y E (Tan y cols., 1993; Reiter y cols., 2003).

4.5 Efectos sobre la mitocondria

Se han encontrado dos lugares de unión específicos de la melatonina a la mitocondria, uno de alta ($K_d = 150 \text{ pM}$) y otro de baja afinidad ($IC_{50} = 0.8 \text{ } \mu\text{M}$), relacionados con el cluster sulfoferroso del complejo I y con el poro de transición mitocondrial, respectivamente. En primer lugar, la melatonina puede interactuar con el cluster sulfoferroso N2, localizado en la rampa anfipática del complejo I de la cadena

de transporte electrónico, actuando sobre el transporte de electrones y protones (Hardeland y cols., 2003; Hardeland, 2005). Como consecuencia de esta interacción, la melatonina puede reducir el flujo de electrones, la disipación de protones y la consecuente formación de especies reactivas a este nivel de la cadena electrónica (Hardeland R y Poeggeler, 2007). El cluster sulfoferroso es un componente clave de la fosforilación oxidativa que determina la eficacia de la utilización del oxígeno y el metabolismo energético por la mitocondria (Lenaz y cols., 2006). La melatonina puede aumentar la actividad del cluster sulfoferroso N2 y el potencial de membrana mitocondrial (Hardeland, 2005; Poeggeler, 2005). El segundo lugar de unión de la melatonina a la mitocondria estaría a nivel del poro de transición mitocondrial y su efecto sería una inhibición de su apertura, previniendo la liberación mitocondrial de citocromo c y, consecuentemente, la apoptosis (Andrabi y cols., 2004).

5. Melatonina extrapineal

Desde que Lerner identificó a la melatonina por primera vez hace cinco décadas, y hasta mediados de los setenta, la melatonina se consideró una hormona exclusiva de la glándula pineal. Durante las últimas décadas, se han publicado una serie de estudios que han hecho cambiar la concepción clásica de la melatonina como hormona (Tan y col., 2003). Una de las evidencias que distingue a la melatonina de una hormona clásica es su síntesis en diferentes órganos extrapineales no endocrinos.

Los primeros indicios acerca de la existencia de fuentes alternativas de melatonina extrapineales se debieron a los trabajos de Cardinali y Rosner, (1971) y de Vlahakes y Wurtman (1972), que identificaron la presencia de la ASMT en la retina (Cardinali y Rosner, 1971) y glándula de Harder (Vlahakes y Wurtman, 1972),

sugiriéndose así la síntesis de melatonina en dichos tejidos. Posteriormente, se observó la presencia de melatonina en retina, glándula de Harder y cerebelo en ratas pinealectomizadas (Bubenik y colbs., 1974; Reiter y colbs., 1983) que, junto con la detección de las enzimas AANAT y ASMT en dichos tejidos, sentaron las bases de la producción extrapineal de melatonina. En 1975, Raikhlin y colbs, identificaron melatonina en células enterocromafines de la mucosa intestinal humana. La concentración de melatonina en el tracto gastrointestinal (TGI) es más de 400 veces superior a la de la glándula pineal (Bubenik, 2002; Hardeland y Pandi-Perumal, 2005) y de 10-100 veces superior a la cuantificada en plasma. Una de las fuentes de esa elevada cantidad de melatonina en el TGI es derivada del plasma (Messner y colbs., 1998; Messner y colbs., 1999). Por otra parte, una cantidad considerable de melatonina se libera desde el intestino hasta el lumen (Messner y colbs., 1998). Por último, se describió un ciclo enterohepático de la melatonina, encontrándose también altas cantidades de esta hormona en la bilis (Tan y colbs., 1999; Bubenik y colbs., 1999). Además de la melatonina captada de la circulación por el TGI, la indolamina es captada también a partir de la dieta. Los niveles diurnos de melatonina aumentaron con dietas ricas en ella, mientras que estos niveles aparecen bajos cuando la dieta es pobre en melatonina (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005; Tan y colbs., 2003). Parece ser que las bacterias intestinales pueden contribuir a elevar los niveles de melatonina en el intestino, pero esta hipótesis no está aún confirmada (Hardeland y Poeggeler, 2003). La melatonina localizada en el TGI sigue un ritmo circadiano, aunque no está controlado por el fotoperiodo. La amplitud del pico es mucho más baja que la que presentan la glándula pineal y la retina y normalmente sólo duplica su amplitud e incluso a veces no es detectable (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005; Bubenik, 2002; Bubenik, 2001). En algunas aves y mamíferos, el pico de melatonina en el duodeno aparece antes que el de

la melatonina de la glándula pineal (Zeman y colbs., 2005; Stebelova y colbs., 2005; Poeggeler y colbs., 2005), demostrando una total independencia en la síntesis de melatonina entre el intestino y la glándula pineal. La melatonina gastrointestinal apenas pasa a la circulación, aunque puede liberarse como respuesta a la ingesta de comida (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005; Bubenik, 2001; Bubenik, 2002) y a una alta concentración de triptófano en la dieta (Konturek y colbs., 2007; Huether y colbs., 1992). El aumento de melatonina en plasma inducido por el triptófano es mayor que el producido por la liberación de melatonina de la glándula pineal y no se afecta por la pinealectomía, aunque disminuyó tras una ligadura parcial en la vena porta (Huether y colbs., 1992). A diferencia de la melatonina pineal, la gastrointestinal está controlada por la periodicidad de la ingesta (Raikhlin y colbs., 1975; Raikhlin y Kvetnoi, 1975). El significado fisiológico de porqué la melatonina se libera tras la ingesta permanece sin aclarar, pero en principio no estaría relacionado con su actividad cronobiótica. La melatonina del TGI puede actuar de manera paracrina, regulando la motilidad gastrointestinal (Bubenik, 2001; Bubenik, 2002). Un año después del descubrimiento de la melatonina gastrointestinal, Ozaki y Lynch detectaron melatonina en plasma y orina de ratas pinealectomizadas. Concretamente, la excreción diaria de melatonina en los animales pinealectomizados descendió un 80% y no presentaba ritmo circadiano (Ozaki y Lynch, 1976). Estos trabajos fueron el punto de partida de la “era de la melatonina extrapineal”. Más tarde se demostró mediante técnicas de PCR la expresión de AANAT y ASMT en una amplia variedad de tejidos: timo, bazo, corazón, músculo, hígado (Sanchez-Hidalgo y colbs., 2009), estómago, intestino, placenta, testículos, corteza cerebral, estriado, ovario humano (Itoh y colbs., 1999), piel (Slominski y colbs., 2005) y médula ósea (Conti y colbs., 2000) El resultado es que en todos aparecen estas dos

enzimas, por lo que se pone de manifiesto la síntesis de melatonina en estos tejidos (Stefulj y colbs., 2001).

Aunque la vía metabólica de síntesis de la melatonina en los territorios extrapineales es la misma que en la pineal, los mecanismos de su regulación son, por el momento, desconocidos (Hardeland, 2008).

En la retina, donde existe una similar ritmicidad entre la melatonina pineal y la sintetizada en dicho órgano, la regulación es totalmente diferente. Mientras que la melatonina sintetizada en la glándula pineal esta regulada por la liberación de noradrenalina controlada por el fotoperiodo, la biosíntesis de melatonina en la retina esta mediada por los receptores GABA_A y en menor medida GABA_B. Además, la luz deprime la melatonina de la retina vía receptores D1 y D4 (Zawilska y colbs., 1994; Zawilska y Nowak, 1994; Zawilska y colbs., 2004). Existen diferencias también en su metabolismo, ya que la melatonina de la retina es degradada mediante un proceso de deacetilación a 5-metoxitriptamina (5-MT), un compuesto que puede ser convertido en 5-metoxitriptofol (5-ML) o ácido 5-metoxiindolacético (5-MIAA) (Hardeland R y Fuhrberg, 1996; Hardeland R y colbs., 2007; Hardeland R y Poeggeler, 2007). Esta melatonina de la retina, al igual que la mayoría de la melatonina extrapineal, no es liberada a la circulación, por lo que no puede ser degradada en el hígado y, por tanto no forma parte de la 6-sulfatoximelatonina urinaria.

Mientras que el ritmo circadiano es típico de la glándula pineal y la retina, esto no ocurre en la glándula de Harder, donde los cambios diurnos son casi inexistentes (Buzzell y colbs., 1990; Djeridane y Touitou, 2001). Además, la melatonina no siempre está asociada a la oscuridad en vertebrados, ya que se observan variaciones en su síntesis dentro de los ciclos sexuales y estacionales, relacionados con los cambios en las

hormonas esteroideas (Buzzell y colbs., 1990; Menendez-Pelaez y colbs., 1991). Esas fluctuaciones están relacionadas con la reproducción estacional.

En el resto de tejidos la ausencia de variaciones rítmicas en la síntesis de melatonina tisular implica que existe una señal diferente a la de transmisión del fotoperiodo. Además, los tejidos poseen mayores cantidades de melatonina que las existentes en la circulación, por lo que esta melatonina debe tener una función diferente a la cronobiótica; ya que la melatonina posee una importante actividad antioxidante y antiinflamatoria, su papel en el tejido debe estar relacionada con una función de protección local (Hardeland, 2005; Hardeland R y Fuhrberg, 1996; Hardeland R y Poeggeler, 2007; Hardeland y Pandi-Perumal, 2005; Tan y colbs., 2003; Reiter y colbs., 2003; Acuna y colbs., 2011).

Uno de los aspectos más llamativos de la melatonina extrapineal es que, aun estando en concentraciones muy elevadas, no sale a la circulación. Porqué no se libera esta melatonina, una molécula anfipática, a la sangre es algo no resuelto (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005; Hardeland y colbs., 2003; Hardeland, 2005). Una posible respuesta es que la melatonina tisular se une a proteínas intracelulares (Hardeland R y Poeggeler, 2007), como calmodulina y calreticulina (Macias y colbs., 2003) y/o proteínas nucleares (Menendez-Pelaez y colbs., 1993), contribuyendo de esta manera al almacenamiento de la melatonina en el interior celular.

La ausencia de ritmo en algunos tejidos también puede resolver otra paradoja, porque el pico nocturno de melatonina ejerce un efecto protector en animales nocturnos y diurnos, mientras que las especies activas de oxígeno y nitrógeno son preferencialmente producidas durante las fases circadianas de la actividad motora y neural. Si no se expresa con ritmicidad, la fase circadiana pierde su relevancia en la

melatonina tisular, y solo la generación de intermediarios reactivos llega a ser decisiva para una fase de detoxificación (Hardeland, 2005; Hardeland y cols., 2003). En este sentido, podría ser el estado redox intracelular el regulador principal de la producción de melatonina tisular.

Hipótesis

Estudios preliminares han demostrado la presencia y síntesis de melatonina en una amplia variedad de órganos y tejidos diferentes a la glándula pineal. Otros estudios han observado una redistribución de esta melatonina extrapineal en núcleo y mitocondria. No obstante, no se conoce cual es el contenido real de melatonina extrapineal, si su producción cambia con la manipulación del fotoperiodo, y si se afecta por la melatonina exógena.

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de receptores de membrana y nucleares de melatonina en una amplia gama de tejidos y órganos, pero no se conoce si su expresión sigue un ritmo circadiano, y si dicha expresión está regulada por la melatonina extrapineal.

Teniendo en cuenta estas dos premisas, nuestra hipótesis es que, si bien el fotoperiodo parece no afectar a la producción de melatonina extrapineal, la melatonina circulante si podría tener un papel regulador en dicha síntesis, que podría estar relacionado con los cambios en la expresión de los receptores de membrana y nucleares de la indolamina.

Objetivos

1°. Evaluar la distribución subcelular y la existencia de cambios diarios en el contenido de melatonina en corteza cerebral e hígado de rata.

2°. Determinar si la inhibición de la producción pineal de melatonina afecta a su distribución subcelular.

3°. Examinar si la expresión de los receptores de membrana (MT1 y MT2) y nucleares (ROR α) de melatonina en hígado de rata sigue un patrón circadiano, y en su caso si se afecta por la inhibición de la melatonina pineal.

4°. Evaluar si el contenido subcelular de melatonina y/o la expresión de sus receptores se afecta por la administración exógena de melatonina.

Material y métodos

1. Grupos experimentales

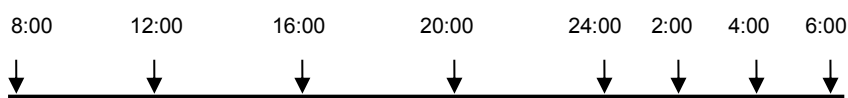
Para realizar el presente estudio se han utilizado ratas Wistar macho, proporcionadas por Harlan Laboratories (Barcelona, España). Los animales se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12:12 horas luz: oscuridad, a una temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ y con libre acceso a comida y agua. Las ratas se estudiaron a la edad de tres meses con un peso entre 220-250 gramos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las **guías española y europea de cuidado de los animales**.

Los animales se separaron en los siguientes grupos experimentales (6 ratas/grupo):

- Grupo control, con pinealectomía simulada (SPx).
- Grupo pinealectomizado (Px).
- Grupo expuesto a luz continua (CL) (Estas ratas fueron sometidas a luz continua durante los cinco días anteriores al experimento)
- Grupo tratado con luzindol (LZ).

2. Protocolo de estudio

Para el estudio de la distribución subcelular de melatonina, los grupos SPx y Px se sacrificaron a las siguientes horas:



Durante el período nocturno, los animales se sacrificaron bajo una luz roja para prevenir cualquier alteración en la producción endógena de melatonina.

Para evaluar la distribución subcelular de la melatonina y el efecto de la pinealectomía y la luz continua, los grupos SPx, Px y CL se trataron con melatonina a las 08:00 (10 mg/kg) y se sacrificaron 2 y 4 horas después de la inyección. Además, se

evaluó el efecto dosis-dependiente de la administración de melatonina exógena en su distribución subcelular mediante la inyección de la indolamina a dosis de 40, 100 y 200 mg/kg.

Asimismo, en los mismos grupos experimentales se determinó la expresión de los receptores de membrana MT1 Y MT2, y nucleares ROR α . Otros grupos de ratas SPx se trataron con luzindol media hora antes de los tratamientos anteriores (a las 7:30 h).

Para su uso, se preparó una solución extemporánea de melatonina en 1,2-propanodiol al 20% en suero salino y se administró intraperitonealmente. El luzindol se disolvió en agua-etanol 1:2 (v/v) y se inyectó a una dosis de 4,5 mg/kg 30 minutos antes de la administración de melatonina.

Previo al uso de cloroformo como anestesia, se hizo un estudio preliminar para valorar si ésta afectaba a las determinaciones posteriores de melatonina. Una vez descartada cualquier interferencia, los animales se anestesiaron rutinariamente con cloroformo, y se les extrajo sangre por punción cardíaca. A continuación, se extrajeron en frío el hígado y cerebro, que se lavaron en suero fisiológico frío y se congelaron a -80° C. La sangre se procesó y separó en alícuotas de plasma y hematíes, que se congelaron a -80° C.

3. Fraccionamiento subcelular: Aislamiento de mitocondrias, citosol y núcleos de hígado y corteza cerebral

Tras la descongelación de ambos tejidos, cerebro e hígado, se lavan en su correspondiente tampón de extracción, tampón A para el cerebro (10 mM Tris-HCl, 0,32 M sacarosa y 1 mM EDTA (k₂), pH 7,4) y tampón B para el hígado (5 mM Hepes,

250 mM manitol, 0,5 mM EGTA y 0,1% BSA, pH 7,4). A continuación se trocea el tejido mediante tijeras de disección, y se homogeniza en un homogenizador de teflón (Stuart Scientific, mod SS2) a 800 rpm durante 15 segundos.

El cerebro se procesó de la siguiente forma: tras la homogenización en 1 mL de tampón de extracción, se centrifuga a 1.330 g durante 3 minutos (Beckman Avanti™, rotor de ángulo fijo F1010), se pasa el sobrenadante a otro tubo, y el pellet se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Ambos sobrenadantes se juntan y el pellet se separa en frío para ***la extracción de núcleos*** (ver abajo). El sobrenadante se centrifuga a 21.200 g durante 10 minutos, separando este segundo sobrenadante para ***la extracción del citosol*** (ver abajo). El pellet se resuspende en 850 µL de una solución de percoll al 15 % en tampón A. Se prepara un gradiente de densidad de percoll en tubos de ultracentrífuga añadiendo 1 mL de percoll al 40% en tampón A, a continuación 1 mL de percoll al 23% en tampón A y por último se añaden encima los 850 µL que contenían resuspendida la muestra. Se centrifugan los tubos a 31.400 g durante 8 minutos (Beckman Coulter Optima™ L-90k, rotor de ángulo fijo 90 Ti). Se recoge la banda localizada entre 23-40% de percoll y se pasa a un tubo eppendorf, donde se completa hasta 1,5 mL con tampón de extracción y se centrifuga a 16.700 g durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante, se lava el pellet en 1 mL de tampón de extracción, y se centrifuga de nuevo a 6.900 g durante 10 minutos. El pellet que corresponde a la **fracción mitocondrial pura**, se guarda a -80° C.

El pellet que se había separado para la obtención de **núcleos** se resuspende en 3 mL de tampón C (10 mM Tris-HCl, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM dithiothreitol, 0,3 M sacarosa y 0,15% Triton X-100, pH 8), se vierte en un tubo de centrifuga conteniendo 3 mL de tampón D (10 mM Tris-HCl, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM dithiothreitol, 0,4 M sacarosa y 0,15% Triton X-100, pH 8) y se centrifuga a 2.500 g

durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 mL de tampón C, centrifugando de nuevo a 2.500 g durante 10 minutos. El pellet obtenido se guarda a -80° C.

El sobrenadante guardado para obtener **citósol** se centrifuga a 100.000 g durante 1 hora (Beckman Coulter Optima™ L-90k, rotor de ángulo fijo 90 Ti). El sobrenadante obtenido, que corresponde a la fracción citosólica pura se guarda a -80° C.

En el caso del hígado, el procesamiento se realizó de la manera siguiente: tras homogenizar el tejido en 6 mL de tampón B, se centrifuga a 600 g durante 5 minutos (Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F1010). El sobrenadante obtenido se pasa a otro tubo, se lava el pellet con otros 6 mL de tampón B, y se centrifuga de nuevo bajo las mismas condiciones. Este segundo pellet se separa en frío para la **extracción de núcleos** (ver abajo), mientras que el sobrenadante se junta con el obtenido en la primera centrifugación en otro tubo, y se centrifuga a 10.300 g durante 10 minutos. El sobrenadante procedente de esta nueva centrifugación se destina a la **obtención del citósol** (ver abajo) y se mantiene en frío. El pellet se resuspende en 500 µL de tampón B y se pasa a otro tubo conteniendo 1.400 µL de tampón E (manitol 225 mM, EGTA 1mM, Hepes 25 mM y BSA 0,1%, pH 7,4) y 600 µL de percoll. La mezcla se centrifuga a 95.000 g durante 30 minutos (Beckman Coulter Optima™ L-90k, rotor de ángulo fijo 90 Ti). Se recoge la fracción mitocondrial pura, situada entre el tampón E y el percoll y, tras resuspenderla en tampón B, se centrifuga a 10.300 g durante 10 minutos (centrifuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602). Se separa el sobrenadante, se resuspende de nuevo en el mismo volumen de tampón B, se centrifuga a 6.300 g durante 10 minutos, y se obtiene el pellet de **mitocondrias** que se congela a -80° C.

El pellet que se había separado para la obtención de **núcleos** se resuspende en 3 mL de tampón C (10 mM Tris-HCl, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM dithiothreitol, 0,3 M sacarosa y 0,15% Triton X-100, pH 8), se deposita en 3 mL de tampón D (10 mM Tris-HCl, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM dithiothreitol, 0,4 M sacarosa y 0,15% Triton X-100, pH 8) y se centrifuga a 2.500 g durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 mL de tampón C, volviéndose a centrifugar a 2.500 g durante 10 minutos. El pellet así obtenido se guarda a -80° C.

El sobrenadante guardado para obtener **citósol** se centrifuga a 100.000 g durante 1 hora (Beckman Coulter Optima™ L-90k, rotor de ángulo fijo 90 Ti). El sobrenadante obtenido, que corresponde a la fracción citosólica pura se guarda a -80° C.

4. Aislamiento de membranas de hígado y corteza cerebral

Una vez descongelado el tejido, se tritura con unas tijeras de disección y se lava 3 veces en 1 mM NaHCO₃. La mezcla se homogeniza en un homogenizador de teflón (Stuart Scientific, mod SS2) a 800 rpm durante 15 segundos en 2,7 mL de 1 mM NaHCO₃. El homogenado se centrifuga a 1.500 g durante 15 minutos (Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F1010). Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspende en una solución de sacarosa 71% (p/v) en 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, y se agita durante 15 minutos a 4° C en un agitador de balanceo. Se trasfiere a 4 tubos y se añade muy lentamente con una jeringa una capa de sacarosa 53% en 10 mM Tris-HCl, otra capa de sacarosa 42% en 10 mM Tris-HCl y una tercera capa de sacarosa 0,25 M. Se centrifuga la mezcla a 100.000 g durante 60 minutos (Beckman Coulter Optima™ L-90k, rotor de ángulo fijo 90 Ti) y se recoge la banda entre 42 y 53% en Tris-HCl 10 mM, la cual corresponde a la fracción de membranas celulares, congelándose a -80 °C hasta su uso (Meier y cols., 1984).

5. Extracción de melatonina en plasma y tejido y medida de melatonina por HPLC.

La extracción de melatonina en plasma y tejido tiene el mismo fundamento pero difiere en varios aspectos.

5.1. Extracción de melatonina en plasma

Tras descongelar el plasma, se mezclan 500 μ L de éste con 1 mL de cloroformo, se agita durante 1 minuto (Thermomixer confort, Eppendorf A G, 22331, Hamburgo, Alemania) y se centrifuga a 9.760 g durante un minuto (Beckman AvantiTM 30, rotor de ángulo fijo F3602). Desechamos la parte superior (acuosa). La fracción orgánica, inferior, se lava con 500 μ L de tampón bicarbonato (50 mM NaHCO₃, pH 10,25) dos veces. Se elimina la parte acuosa y se evaporan 500 μ L de la parte orgánica (SPD 2010 SpeedVac System, Fisher Scientific). El extracto seco se congela a -80° C.

5.2 Extracción de melatonina en tejido

Para todas las fracciones celulares se sigue el mismo procedimiento.

Una vez descongeladas dichas fracciones se homogenizan en 600 μ L de PBS (0,01 M fosfato potásico, 0,15 M NaCl, pH 7,4) y se sonicán. Se centrifugan durante 10 minutos a 3.000 g (Beckman AvantiTM 30, rotor de ángulo fijo F3602), y se recoge el sobrenadante en dos fracciones: un pequeño volumen para cuantificar proteínas, y el resto para cuantificar melatonina. De esta última se toman 500 μ L y se añade 1 mL de cloroformo, agitándose durante 20 minutos (Thermomixer confort, Eppendorf A G, 22331, Hamburgo, Alemania). Se centrifuga la mezcla a 9.000 g durante 10 minutos, eliminándose la parte acuosa superior. La fracción inferior (orgánica) se lava dos veces

con tampón carbonato (50 mM H₂CO₃/NaHCO₃, pH 10,25). Del último lavado se toman 500 µL de la fase orgánica y se evaporan (SPD 2010 SpeedVac^R System). El extracto seco obtenido se congela a -80° C.

5.3 Cuantificación de melatonina por HPLC

La medida de melatonina en plasma y tejido se realizó mediante HPLC con detección por fluorescencia (Shimadzu). Se utilizó una columna Waters Sunfire C18 5 µm de 4,6 x 150 mm (Waters Cromatografía SA, Cerdañola, España). Tras estabilizar la columna con la fase móvil, se procedió a inyectar las muestras (20 µL). La fase móvil utilizada está compuesta por 100 mM NaH₂PO₄, 0,1 mM EDTA-Na₂ y acetonitrilo al 25%, pH 5,2, permaneciendo el flujo constante a una velocidad de 1 mL/min. La detección de fluorescencia se realizó a una onda de excitación y emisión de 285 y 345 nm, respectivamente. Como estándar interno se usó 5-fluoro-triptamina.

Para el cálculo de las concentraciones de las muestras se usó una curva estándar con las siguientes concentraciones conocidas de melatonina: 4,45, 8,9, 17,9, 35,9, 71,6, 143,2 ng/L. El área del pico de melatonina es directamente proporcional a la concentración de la muestra, que se interpolan en la curva patrón para así obtener la concentración de melatonina de la muestra.

6. Preparación de las muestras para el análisis del contenido de proteína de los receptores MT1, MT2 y RORα por western blot.

6.1. Preparación de núcleos y homogenado

Una vez descongelado el tejido se lava en solución salina. Se tritura mediante tijeras de disección y se homogeniza en un homogenizador de teflón (Stuart Scientific,

mod SS2) a 800 rpm durante 15 segundos, en 2 mL de PBS/PIB (PBS 1x, pH 7,4, tampón inhibidor de fosfatasa conteniendo 125 mM NaF, 250 mM β -glicerolfosfato, 250 mM p-nitrofenil fosfato, 25 mM NaVO_3). Se centrifuga a 300 g durante 15 minutos (Beckman AvantiTM 30, rotor de ángulo fijo F1010) y se guarda el sobrenadante a -80 °C para el posterior análisis por western blot de MT1, MT2 y ROR α . El pellet se resuspende en 1 mL de tampón hipotónico (20 mM HEPES, 5 mM NaF, 0,5 NaMoO_4 y 0,1 mM EDTA, pH 7,5) y se incuba durante 15 minutos a 4° C. A continuación se añaden 50 mL de IGEPAL 10% y se agita la mezcla durante 10 segundos. Se centrifuga a 1.4000 g (Beckman AvantiTM 30, rotor de ángulo fijo F1010) durante 1 minuto, se elimina el sobrenadante, y se resuspende el pellet en 200 μL de tampón de lisis (20 mM HEPES, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl, 0,2 mM EDTA, 20 mM NaF, glicerol 20%, 0,5 mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina y 0,2 mM PMSF, pH 7,9) (los 3 últimos componentes se añaden al tampón en el momento de la extracción), procediéndose entonces a la incubación de las muestras a 4° C durante 30 minutos en agitación constante. A continuación se centrifuga a 14.000 g durante 10 minutos y el sobrenadante, que se corresponde a la fracción nuclear, se alícuota y congela a - 80 °C, para el western blot de ROR α .

6.2. Western-Blot de ROR α

Tras medir proteínas, las muestras se trataron con 2,5% SDS, 5% β -mercaptoetanol y 0,01% de azul de bromofenol; se calentó la mezcla a 99° C durante 5 minutos, y se incubó otros 5 minutos a 4° C.

Para realizar el western blot de ROR α en las fracciones citosólica y nuclear, se cargaron 15 μg de proteínas en 4 μL (3,75 mg/mL) por muestra, y se aplicaron en un gel

de poliacrilamida al 7,5% SDS-PAGE La electroforesis se realizó bajo las condiciones siguientes: paso 1.1: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 1vh; paso 1.2: 250 V, 1 mA, 3 W, 15 °C, 1 vh; paso 1.3: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 60 vh. Una vez finalizada, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond™-ECL™ nitrocellulose membrane, GH Healthcare Europe GmbH, Barcelona, España). Tanto la electroforesis como la transferencia se realizaron en el equipo Phastsystem (Phastsystem™ de GE Healthcare, Europe GmbH, Barcelona, España). Tras la transferencia, la membrana se bloqueó durante 4 horas a temperatura ambiente en tampón de bloqueo PBS-T (0,01 M fosfato potásico, 0,15 M NaCl, pH 7,4/0,01% Tween) más 5% de BSA. A continuación, se incubó toda la noche a 4° C en agitación constante con el anticuerpo primario (sc-28612, Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, USA, representado en España por Quimigen SL, Madrid). Tras la retirada del anticuerpo primario, se lavó la membrana 3 veces con PBS-T durante 10 minutos y se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-rabbit 31460, Thermo Fisher Scientific GmbH, Barcelona, España). Se volvió a lavar 3 veces con PBS-T durante 10 minutos y se añadió el reactivo de quimioluminiscencia (34075 Super Signal® West Dura, Thermo Fisher Scientific) para revelar la membrana.

6.3. Western blot de MT1 y MT2

Una vez descongelado el homogenizado se le añade un coctel de inhibidores de proteasas compuesto por leupeptina, PMSF y DTT. Tras la medida de proteínas, dicho homogenizado se trató con 2,5% SDS, 5% β-mercaptoetanol y 0,01% azul de bromofenol, se calentó a 99° C durante 5 minutos, y se incubó a 4° C durante 5 minutos.

Para realizar los western-blots de MT1 y MT2 se cargaron 5 mg/mL de proteínas por muestra y se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%

(Criterion™ Cell, Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) transfiriéndose (Criterion Blotter, Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) posteriormente a una membrana de nitrocelulosa (Hybond™-ECL™ Nitrocellulose membrane, GH Healthcare). Se bloqueó durante 2,5 horas a temperatura ambiente en 5% PBS-T BSA y se incubó toda la noche en agitación constante con el anticuerpo primario (sc-13186 para MT1 y sc-13177 para MT2, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Al día siguiente se lavó la membrana con PBS-T 3 veces durante 10 minutos, y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-goat sc-2020, Santa Cruz Biotechnology Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava 3 veces con PBS-T durante 10 minutos, y se añade el reactivo de quimioluminiscencia (RPN 2232 GE Healthcare).

La cuantificación de las bandas de proteínas obtenidas se realizó mediante el equipo Kodak Image Station 2000R (Carestream Molecular Imaging, Connecticut, USA, representado en España por Bionova Científica SL, Madrid).

7. Extracción de RNA y medida por RT-PCR

7.1. Extracción de RNA

La extracción se realiza mediante el kit comercial: Real Total ARN Spin Plus (Durviz SL, Valencia, España), siguiéndose el protocolo descrito por la casa comercial.

Se añaden 350 µL de solución de lisis y 3,5 µL de β-mercaptoetanol al tejido (hasta 30 mg de tejido), y se homogeniza la mezcla en un homogeneizador (Dispomix® System, Medic Tools AG, Lüsweg 8, Zug, Suiza) a 2.000 rpm durante 3 ciclos de 10 segundos. A continuación, se centrifuga a 2.500 g durante un minuto y el sobrenadante obtenido se deposita en una columna de filtración, centrifugándose a 11.000 g durante un minuto. El lisado se transfiere a un nuevo tubo de centrifuga, donde se añadirán 350

μL de etanol al 70%, procediéndose a la mezcla por agitación en vortex. Esta mezcla se deposita en una columna de unión a RNA y se centrifuga a 8.000 g durante 30 segundos. Seguidamente, se añaden 350 μL de tampón de desalado de membrana y se centrifuga a 11.000 g durante 1 minuto para secar la membrana. A continuación, se prepara la mezcla de reacción en un microtubo estéril, donde se mezclan 10 μL de DNasa I y 90 μL de tampón de reacción de DNasa I. Se aplican 95 μL de la mezcla de reacción de la DNasa directamente en el centro de la membrana de sílica de la columna y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añaden 200 μL de solución STOP/DNasa I a la columna y se centrifuga a 8.000 g durante 30 segundos, colocándose la columna en un nuevo tubo de recolección. A continuación, se añaden 600 μL de solución de lavado a la columna y se centrifuga a 8.000 g durante 30 segundos. Se desecha el contenido del tubo de recolección y se añaden 250 μL de la solución de lavado y se centrifuga 2 minutos a 11.000 g para secar completamente la columna. Se coloca la columna en un microtubo de 1,5 mL y se añaden 60 μL de agua libre de nucleasas, incubándose 1 minuto a temperatura ambiente. Por último, se centrifuga a 11.000 g durante 1 minuto. Una vez obtenido el ARN se cuantifica en el NanoDrop (NanoDrop ND-1000 V3.5.2, NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA) y se alícuota, guardándolo a -80°C para la realización de la RT-PCR.

7.2. RT-PCR

La RT-PCR se llevó a cabo con el kit Mesa Green qRT-PCR MasterMix Plus for SYBR (Eurogentec, Seraing, Liège, Bélgica). Las secuencias de los primers usados en la PCR se indican en la tabla 1 y se obtuvieron mediante el software Beacon Designer versión 4.0 (Premier Biosoft Int., Palo Alto, CA, USA).

Tabla 1: Secuencias de los primers usados para las PCRs de MT1, MT2 y ROR α , así como del GAPDH

Genes	Secuencias de los primers
MT1 forward	AGC CCT CTC CAC TAA TAA CC
MT1 backward	ACC CTG TAT CAC TTG TTT GC
MT2 forward	GTG TCA TTG GCT CTG TCT TC
MT2 backward	CAG TAT CCA TAT TCG CAG GTA G
RORα forward	CGA GGT ATC TCA GTC ACG AAG
RORα backward	GCC GAG GAC AGG AGT AGG
GAPDH forward	GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT
GAPDH backward	ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA

Cada una de las PCRs se realizó según las condiciones descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de PCR para MT1, MT2 y ROR α

Reactivo	MT1	MT2	RORα
Mesa Green	12,5 μ L	12,5 μ L	12,5 μ L
Enzima bloqueante	0,125 μ L	0,125 μ L	0,125 μ L
Primers forward	2 μ L (0,4 μ M)	2,5 μ L (0,2 μ M)	2,5 μ L (0,1 μ M)
Primers backward	2 μ L (0,4 μ M)	2,5 μ L (0,2 μ M)	2,5 μ L (0,1 μ M)
Agua libre de nucleasas	3,375 μ L	2,375 μ L	2,375 μ L
Muestra (RNA)	5 μ L (100 ng)	5 μ L (150 ng)	5 μ L (200 ng)

El programa de ciclos a los que se sometieron las muestras de RNA se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Programa de ciclos de RT-PCR

Nº de Ciclos	Etapas	Duración	Temperatura
1	Retrotranscripción	30 min	48° C
1	Desnaturalización	5 min	95° C
40	Replicación del ADN	15 s	95° C
		1 min	60° C
		1 min	72° C

El análisis de los receptores de melatonina se realizó mediante PCR a tiempo real en el equipo Stratagene 3005P (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y con el software de análisis MxPro™ QPCR Software versión 4,10 (Stratagene, La Jolla CA, USA).

8. Determinación de proteínas

Para esta determinación se usó el método de Bradford (Bradford, 1976). El análisis se realiza mediante un colorante hidrofóbico que, en presencia de ácido fosfórico muestra un color pardo pero que en un entorno hidrofóbico, vira a un color azul intenso que es proporcional a la cantidad de proteína presente y se puede medir espectrofotométricamente. Este método depende de la interacción relativamente inespecífica del colorante hidrofóbico y las proteínas. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se construye una curva estándar empleando albumina bovina de suero disuelta en Tris 20 mM a concentraciones entre 0,1 y 0,5 mg/mL.

En los respectivos pocillos de una microplaca se depositan 10 μL de tampón (blanco), 10 μL de cada concentración de la curva patrón, y 10 μL de cada muestra y se añaden 200 μL del reactivo de Bradford (dilución 1/5); se agita la placa y se deja en reposo durante 15 minutos. A continuación se mide la absorbancia en un espectrofotómetro de placa (Power-Wavex Microplate Scanning Spectrophotometer, BioTek Winooski, USA, representado en España por Izasa, Barcelona) a 595 nm, y los resultados se expresan en mg/mL.

9. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm error estándar. Se ha realizado un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido de un test de comparación múltiple Tukey. El análisis de cosinor se realizó mediante el software Time Series Analysis-Serial Cosinor 6,3 Lab View software (TSASC 6,3, Expert Soft Technologie Inc, BioMedical Computing and Applied Statistics Laboratory, Esvres, France). Se consideró un valor de $P < 0,05$ estadísticamente significativo.

Resultados

1. Resultados de la distribución subcelular de melatonina.

Los resultados de este apartado corresponden al trabajo n° 1:

Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Extrapineal melatonin: analysis of its cellular distribution and daily fluctuations. J Pineal Res 2012; 52: 217-227. Factor de Impacto: 5.855; Áreas: Physiology – Neurosciences – Endocrinology & Metabolism; Poscion/área: 5/77 – 27/237 – 15/116.

En este trabajo se ha analizado la distribución subcelular de melatonina en corteza cerebral e hígado de rata, con el fin de obtener información acerca de sus niveles y regulación. Los resultados más relevantes se indican a continuación:

La **figura 9** muestra los valores del contenido subcelular de melatonina en la corteza cerebral de la rata a lo largo de las 24 hr. Aunque existen ciertas oscilaciones a lo largo del día, el análisis de cosinor no reveló la existencia de un ritmo circadiano en este tejido. Los mayores niveles de melatonina se encontraron en mitocondria, seguido de membrana, núcleo y citosol, donde el contenido es muy bajo. En general, la pinealectomía produce un aumento del contenido de melatonina en las fracciones mencionadas, principalmente en membranas ($P < 0,001$).

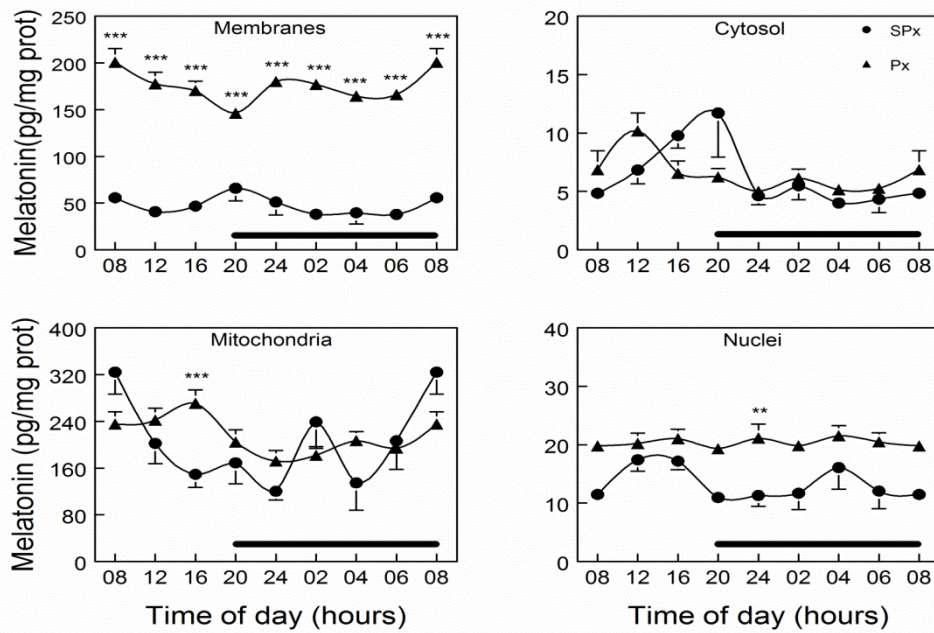


Figura 9: Niveles subcelulares de melatonina en membrana, citosol, mitocondria y núcleo de corteza cerebral a lo largo de 24 horas en los grupos SPx y Px. Las ratas se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12:12 luz/oscuridad y se sacrificaron a las horas indicadas. La barra negra indica el periodo nocturno. ** $P < 0,01$ and *** $P < 0,001$ vs SPx.

En hígado de rata, la distribución subcelular de melatonina a lo largo de las 24 horas tampoco se ajustó a un ritmo circadiano (**figura 10**). En este órgano, el contenido de melatonina fue mayor en membranas, seguido de la fracción mitocondrial, nuclear y citosólica. Al igual que ocurría en la corteza cerebral, los niveles más bajos de melatonina se detectaron a nivel citosólico. La pinealectomía, produjo un aumento en la concentración subcelular de melatonina, principalmente en membrana, citosol y núcleo ($P < 0,001$), y en menor medida a nivel mitocondrial.

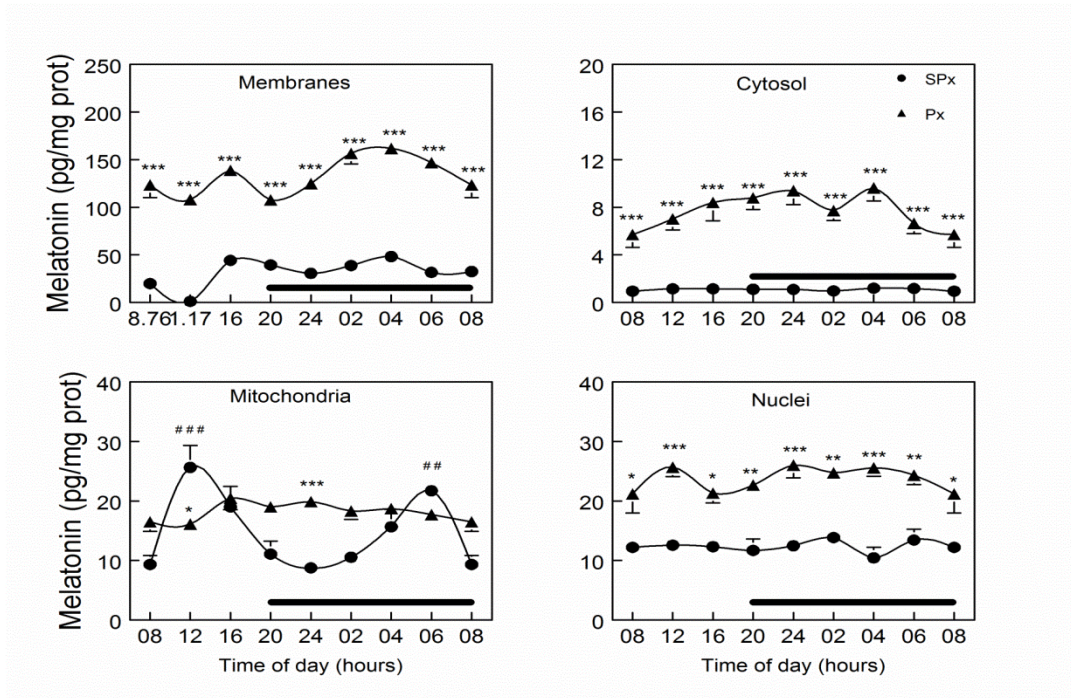


Figura 10: Niveles subcelulares de melatonina en membrana, citosol, mitocondria y núcleo de hígado a lo largo de 24 horas en los grupos SPx y Px. Las ratas se mantuvieron bajo un fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad y se sacrificaron a las horas indicadas. La barra negra indica el periodo nocturno. * $P < 0,5$, ** $P < 0,01$ and *** $P < 0,001$ vs SPx.

Las medias de los niveles de melatonina en ambos tejidos durante el periodo de 24 h en las diferentes fracciones celulares se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4. Media de las concentraciones de melatonina durante 24 hr en las fracciones estudiadas.

Tejido	SPx	Px
Cerebro		
Membranas	48,01 ± 3,27	176,09 ± 5,77***
Citosol	6,27 ± 0,9	6,46 ± 0,52
Mitocondria	207 ± 25,3	216 ± 10,6
Núcleo	13,31 ± 0,91	20,31 ± 0,25***
Hígado		
Membranas	37,76 ± 2,09	132,38 ± 6,58***
Citosol	1,09 ± 0,03	7,67 ± 0,5***
Mitocondria	14,57 ± 2,08	18,14 ± 0,52
Núcleo	12,36 ± 0,32	23,64 ± 0,68***

Los datos están expresados como la media ± SEM. *** $P < 0,001$ vs. SPx.

En la **figura 11** se muestran los niveles de melatonina presentes en la corteza cerebral en los grupos SPx, Px, CL, tratados con vehículo o melatonina, y en el grupo Lz. En todos los casos, las barras individuales muestran los niveles de melatonina medidos a las 12:00 hr, dos horas después de la administración de melatonina o vehículo. La pinealectomía ($P < 0,001$) y, en menor medida, la luz continua ($P < 0,01$), elevan los niveles de melatonina en membranas, pero no en el resto de las fracciones subcelulares. Después de la administración de 10 mg/kg de melatonina, los niveles de

melatonina aumentaron significativamente en SPx, CL, y, especialmente, en ratas pinealectomizadas ($P < 0,001$), mientras el pretratamiento con Lz no alteró los niveles de melatonina. Tras el tratamiento con vehículo, la pinealectomía y la luz continua no provocaron cambios significativos en el contenido de melatonina a nivel citosólico, si bien el patrón de dichos cambios fue similar al visto en membranas. Ambas condiciones experimentales tampoco modificaron los niveles de melatonina en mitocondria ni en núcleo. El tratamiento con melatonina aumentó notablemente los niveles subcelulares de esta indolamina, siendo el comportamiento de cada grupo experimental (SPx, Px, CL y Lz) similar al observado en el grupo tratado con vehículo ($P < 0,001$).

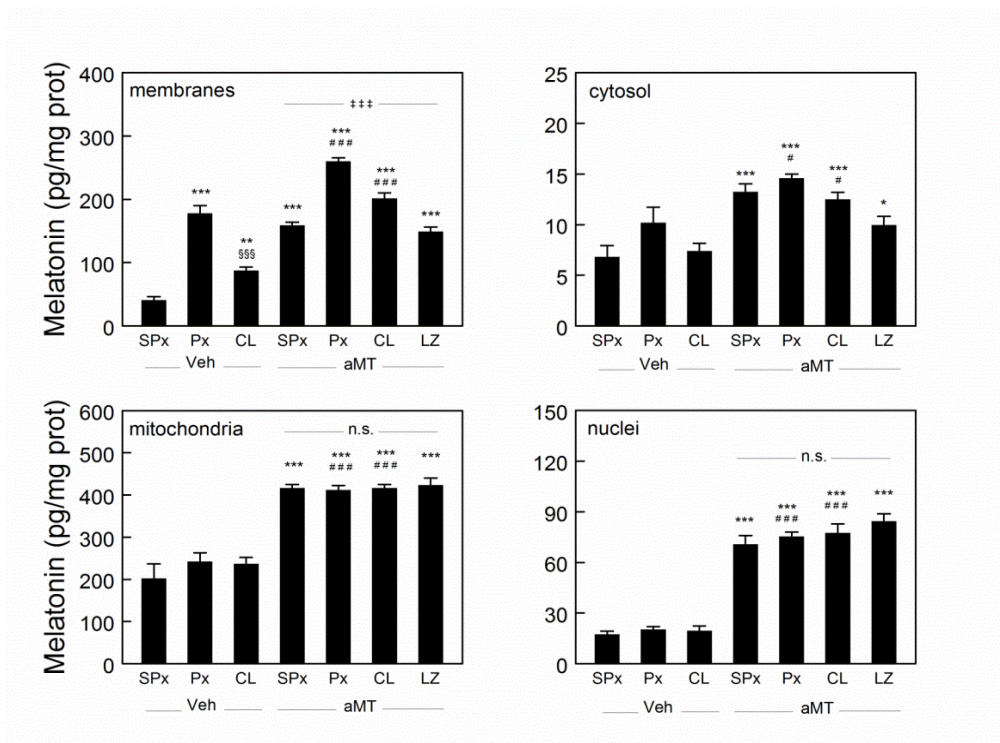


Figura 11: Efectos de la pinealectomía, luz continua o tratamiento con luzindol en la distribución subcelular de melatonina en corteza cerebral. Las ratas se sacrificaron a las 12 hr e inyectadas con melatonina o vehículo 2 hr antes del sacrificio. * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ vs SPx; # $P < 0,05$ ### $P < 0,001$ vs grupos con vehículo; §§§ $P < 0,001$ vs Px.

En la **figura 12** se representan los cambios en los niveles de melatonina en hígado en los grupos SPx, Px, CL, administrados con vehículo o melatonina, y Lz y

melatonina. La pinealectomía y la luz continua incrementaron los niveles de melatonina en membranas y citosol, mientras que los niveles de melatonina en núcleo sólo se vieron aumentados tras la pinealectomía ($P < 0,05$). La administración de melatonina (10 mg/kg) elevó sus niveles subcelulares en todos los grupos ($P < 0,001$), mientras que el pretratamiento con luzindol (LZ) no mostró ningún efecto.

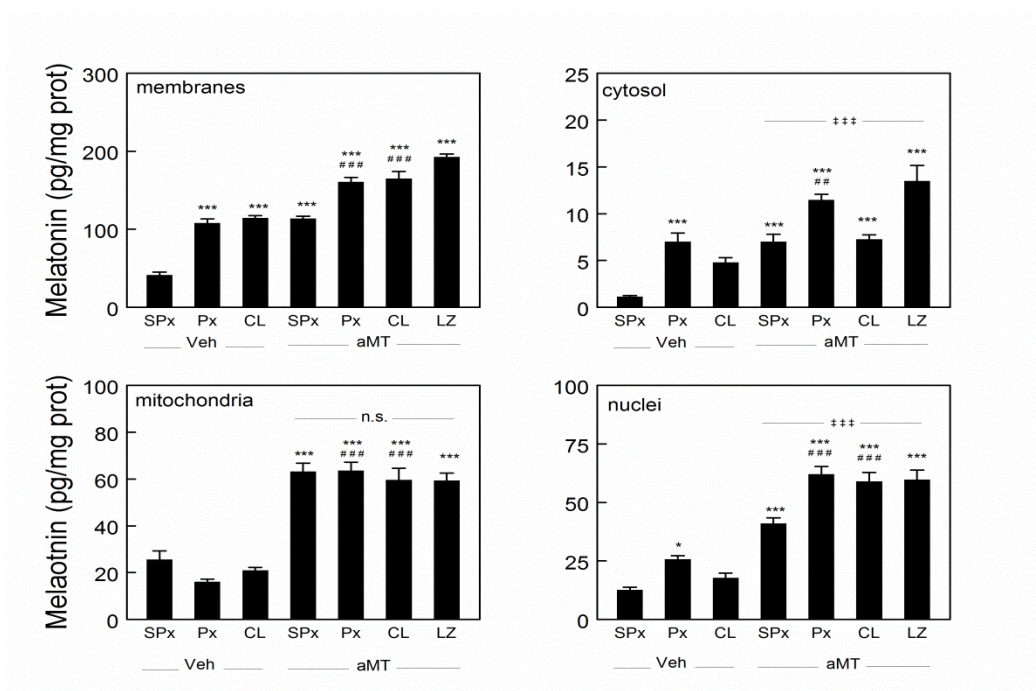


Figura 12: Efectos de la pinealectomía, luz continua o tratamiento con luzindol en la distribución subcelular de melatonina en corteza cerebral. Las ratas fueron sacrificadas a las 12 hr e inyectadas con melatonina o vehículo 2 hr antes del sacrificio. * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ vs SPx; # $P < 0,05$ y ### $P < 0,001$ vs grupos con vehículo; \$\$\$ $P < 0,001$ vs Px.

A las 4 horas de la administración de melatonina, los niveles subcelulares de ésta se vieron afectados de forma similar a lo expuesto para corteza cerebral e hígado (Tabla 5). Los datos representan los niveles de melatonina a las 12:00 hr. En este caso, los animales se inyectaron a las 8:00 hr y se sacrificaron 4 horas más tarde.

Tabla 5. Distribución subcelular de melatonina 4 hr después de la inyección intraperitoneal de 10 mg/kg de melatonina

	SPx	Px	CL	Melatonina		
				SPx	Px	CL
Cerebro						
Membranas	40,84 ± 5,66	177,77 ± 12,42	87,60 ± 5,42	124,34 ± 3,27	193,85 ± 4,83	149,92 ± 5,97
Citosol	6,88 ± 1,11	10,17 ± 1,55	7,39 ± 0,77	9,09 ± 0,57	11,30 ± 0,40	8,78 ± 0,43
Mitocondria	202 ± 34,8	242 ± 20,4	237 ± 15,3	311 ± 6,1	315 ± 4,3	328 ± 13,7
Núcleo	17,42 ± 1,92	20,22 ± 1,74	19,55 ± 2,87	46,34 ± 2,38	59,31 ± 2,69	59,83 ± 3,98
Hígado						
Membranas	41,80 ± 3,81	107,99 ± 5,13	114,38 ± 3,10	75,62 ± 2,79	134,46 ± 4,08	129,07 ± 4,02
Citosol	1,15 ± 0,13	7,02 ± 0,91	4,80 ± 0,51	4,26 ± 0,20	9,90 ± 0,61	5,65 ± 0,31
Mitocondria	17,55 ± 5,99	16,11 ± 1,07	20,39 ± 3,18	39,97 ± 1,73	49,32 ± 2,63	42,32 ± 2,59
Núcleo	12,58 ± 1,21	25,67 ± 1,58	17,72 ± 2,04	24,96 ± 1,86	36,01 ± 1,84	38,68 ± 3,88

Los valores están expresados como la media ± S.E.M.

La **figura 13** muestra el efecto dosis-respuesta en corteza cerebral de rata tras la inyección de 0, 10, 40, 100 y 200 mg/kg de melatonina. La melatonina se administró a las 08:00 hr, sacrificándose las ratas 4 horas después. Tanto las membranas celulares como el citosol muestran un aumento dosis-dependiente de melatonina. La administración de 10 mg/kg de melatonina eleva significativamente su contenido en membranas ($P < 0,01$), mitocondria ($P < 0,05$) y núcleo ($P < 0,001$), con cambios menores en su concentración citosólica. Dosis mayores de melatonina aumentan paralelamente sus concentraciones en la membrana y citosol, aunque las concentraciones en éste son unas 10 veces inferiores a las de la membrana. Mitocondrias y núcleo también muestran un aumento dosis-dependiente de los niveles de melatonina, saturándose a la dosis de 40 mg/kg, y dosis superiores ya no elevan su contenido en dichas fracciones ($P < 0,001$).

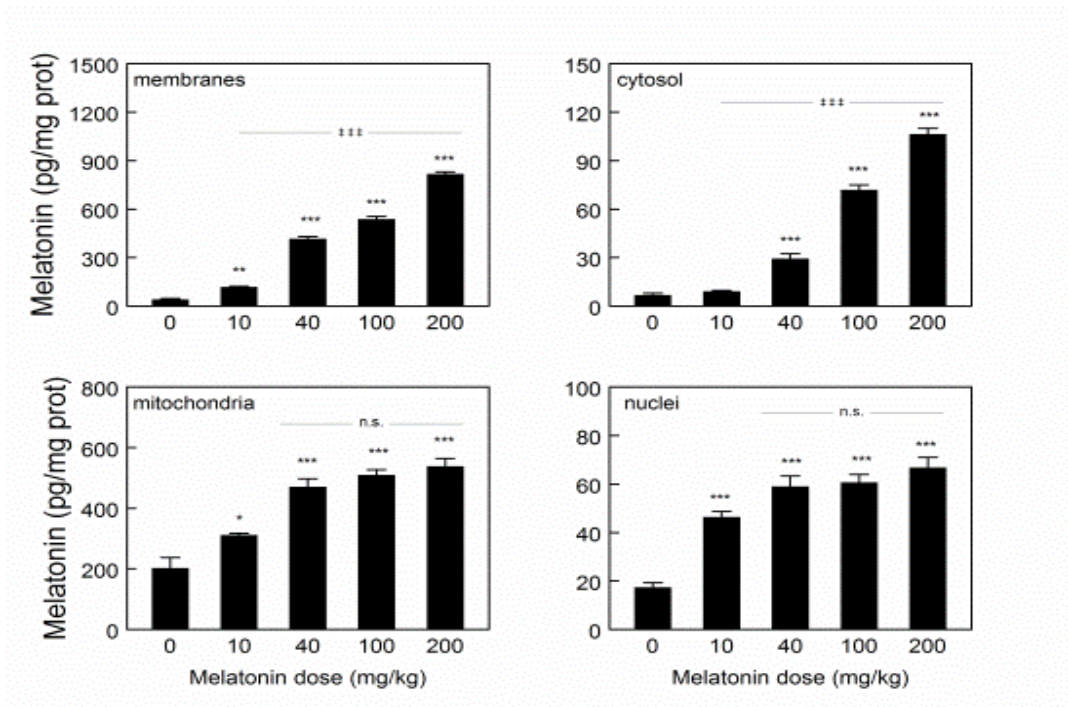


Figura 13: Distribución dosis-dependiente de melatonina en corteza cerebral de rata. Los animales controles fueron inyectados con vehículo (0) o 10, 40, 100 y 200 mg/kg de melatonina a las 8:00 hr y sacrificados 4 hr después. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs 0.

En la **figura 14** se observa el efecto dosis-respuesta en hígado de rata tras la inyección de distintas dosis de melatonina (0, 10, 40, 100 y 200 mg/kg). La melatonina se administró a las 08:00 hr y las ratas se sacrificaron 4 horas después. De forma similar a lo comentado para la corteza cerebral, se observa un aumento dosis-dependiente de melatonina que aumenta sus niveles en la membrana unas 10 veces más que en el citosol. Asimismo, las fracciones mitocondriales y nucleares se saturan a partir de 40 mg/kg.

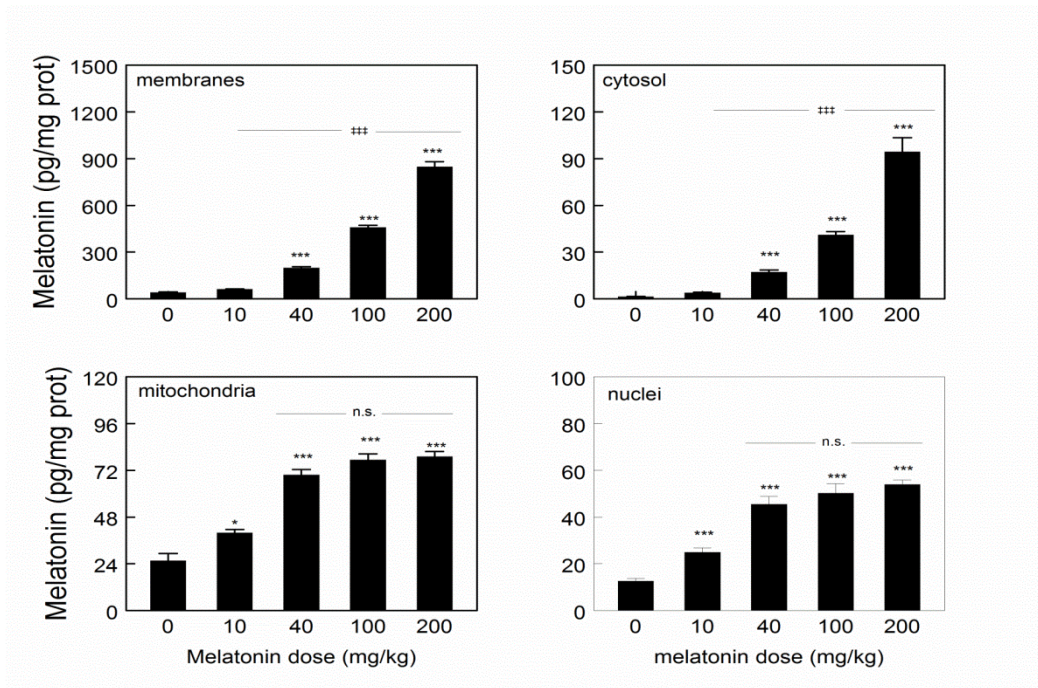


Figura 14: Distribución dosis-dependiente de melatonina en corteza cerebral de rata. Los animales controles fueron inyectados con vehículo (0) o 10, 40, 100 y 200 mg/kg de melatonina a las 8:00 hr y sacrificados 4 hr después. * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ vs 0.

2. Resultados de la distribución de receptores de melatonina.

Los resultados de este apartado corresponden al trabajo n° 2:

Venegas C, García JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in rat liver. J Pineal Res 2012, doi: 10.1111/jpi.12019. Factor de Impacto: 5.794; Áreas: Physiology – Neurosciences – Endocrinology & Metabolism; Posición/área: 5/77 – 27/237 – 15/116.

En este trabajo se ha analizado la presencia y distribución de los receptores de membrana (MT1/MT2) y nucleares (ROR α) de melatonina en hígado de rata, en el mismo modelo experimental que el utilizado en el trabajo anteriormente expuesto, con la intención de correlacionar los cambios en el contenido subcelular de melatonina a lo largo del día con los de sus receptores. Los resultados más relevantes se indican a continuación:

La **figura 15** muestra la expresión de mRNA y el contenido de proteína del receptor MT1 a lo largo de las 24 hr en hígado de ratas SPx y Px. El análisis de cosinor muestra que la distribución de MT1 en el grupo SPx se ajusta a un ritmo circadiano, con una acrofase a las $4:01 \pm 0,05$ hr para el mRNA y a las $5:17 \pm 0,5$ para la proteína MT1 (**Tabla 6**) ($P < 0,001$), mientras que la pinealectomía suprime totalmente dicho ritmo.

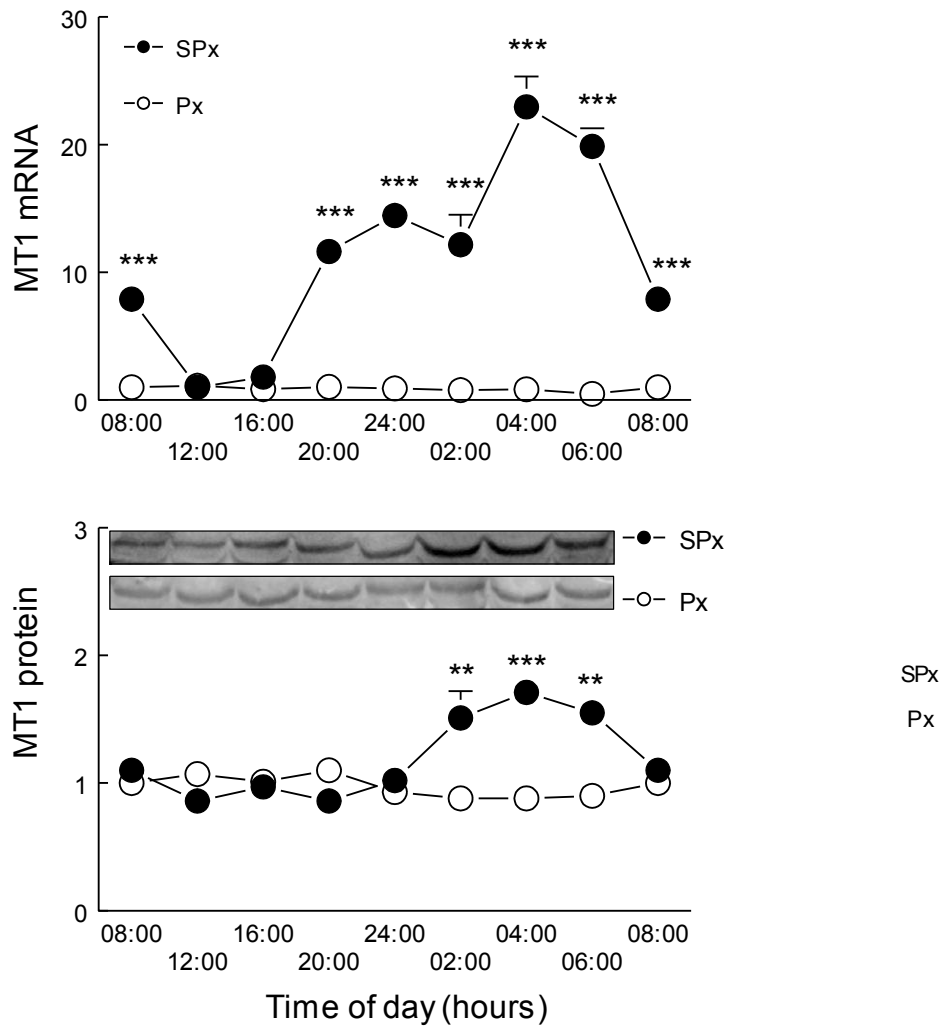


Figura 15: Distribución de los niveles de mRNA y densidad de MT1 en ratas SPx y Px a lo largo de 24 hr. Las ratas se mantuvieron en un ciclo de 12:12 luz/oscuridad y se sacrificaron a las horas indicadas. $**P < 0,01$ and $***P < 0,001$ vs SPx.

En la **figura 16** se observan los resultados de los niveles de mRNA y proteína durante 24 hr en hígado de rata en los grupos SPx y Px del receptor de membrana MT2. De forma similar a lo observado para el receptor MT1, nuestros resultados muestran la existencia de ritmo circadiano en el grupo SPx con su acrofase a las $4:02 \pm 0,08$ hr para

el mRNA, y una acrofase a las $5:10 \pm 0,07$ hr para la proteína MT2, mientras la pinealectomía suprime también este ritmo.

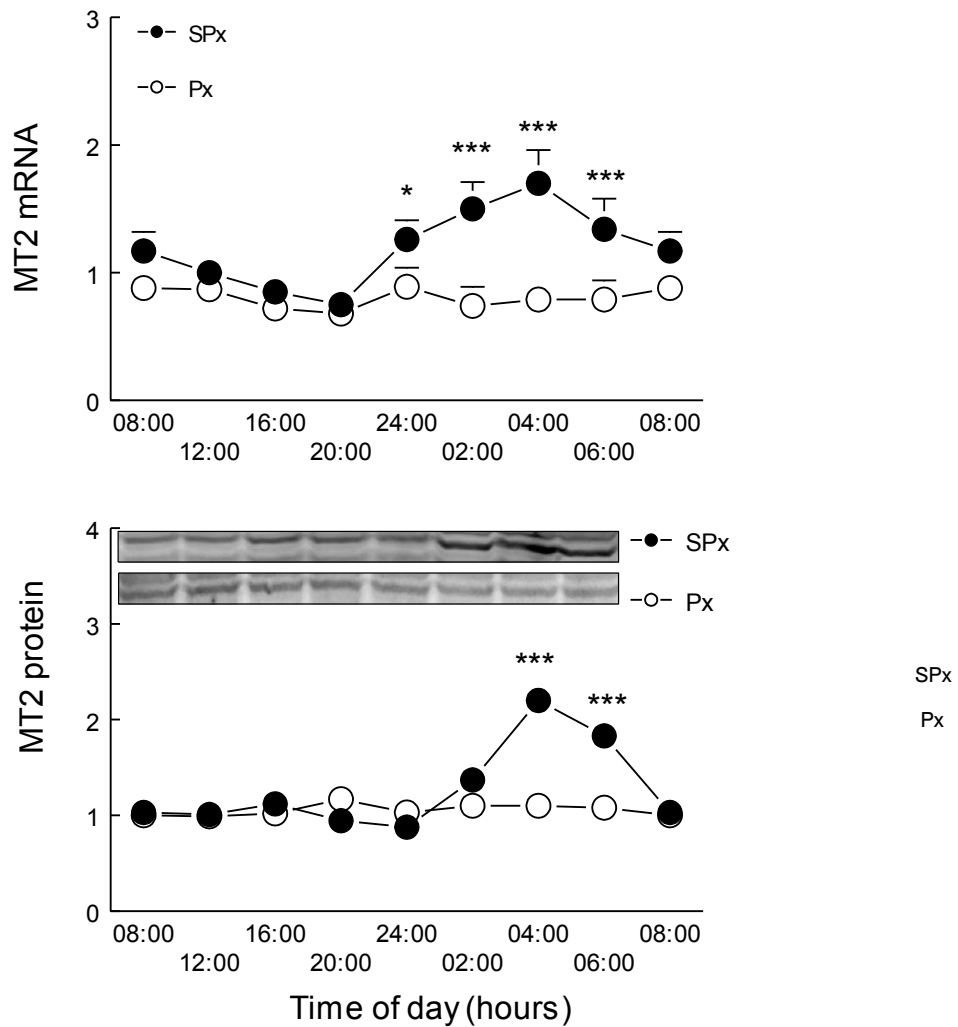


Figura 16: Distribución de los niveles de mRNA y densidad de MT2 en ratas SPx y Px a lo largo de 24 hr. Las ratas se mantuvieron en un ciclo de 12:12 luz/oscuridad y se sacrificaron a las horas indicadas. *** $P < 0,001$ vs SPx.

La **figura 17** muestra la distribución a lo largo de 24 hr de los niveles de mRNA, así como los de la proteína en el núcleo y el citosol del receptor nuclear ROR α en hígado de rata. El grupo SPx muestra oscilaciones diarias que se ajustan a un ritmo circadiano según el análisis de cosinor, para el contenido citosólico y nuclear del receptor, que presentan unas acrofases a las 13:45 hr y 1:28 hr respectivamente. En las ratas SPx, las oscilaciones de la expresión de mRNA no presentan un ritmo circadiano significativo. La pinealectomía aumenta tanto la expresión del mRNA del receptor ROR α como el contenido de la proteína, que se ajustan a un ritmo circadiano tras el análisis de cosinor con acrofases a las $3:32 \pm 0,1$ hr para el mRNA, $6:14 \pm 0,08$ hr para el contenido de la proteína en citosol, y $2:16 \pm 0,06$ hr para el nuclear.

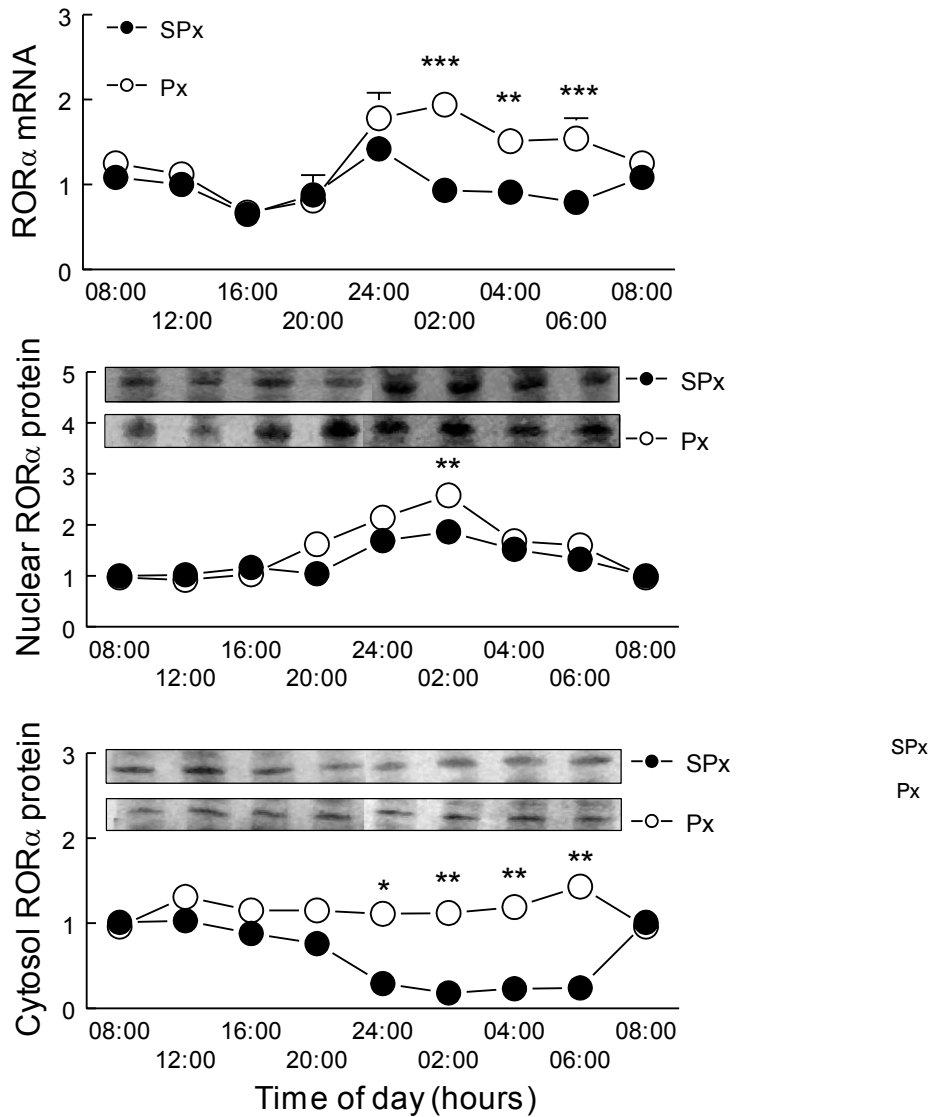


Figura 17: Distribución de los niveles de mRNA y densidad proteica en las fracciones nuclear y citosólica de ROR α en ratas SPx y Px a lo largo de 24 hr. Las ratas se mantuvieron en un ciclo de 12:12 luz/oscuridad y se sacrificaron a las horas indicadas. * $P < 0,5$, ** $P < 0,01$ and *** $P < 0,001$ vs SPx.

Los resultados completos del análisis de cosinor de los receptores MT1, MT2 y ROR α , se presentan en la **tabla 6**. Pueden observarse los valores de acrofase, amplitud y mesor de todos los ritmos estudiados. No se representan los correspondientes a MT1 y MT2 en los animales pinealectomizados ya que la Px hace desaparecer completamente el ritmo de esos receptores.

Tabla 6. Análisis de Cosinor de mRNA y proteínas de los receptores de melatonina MT1, MT2, y ROR α en hígado de rata.

Receptor	Acrofase	Amplitud	Mesor	Significance
MT1 mRNA				
SPx	4:01 \pm 0,05	8,80 \pm 0,09	9,69 \pm 0,65	<i>P</i> < 0,001
MT1 proteína				
SPx	5:17 \pm 0,5	0,37 \pm 0,07	1.12 \pm 0,05	<i>P</i> < 0,001
MT2 mRNA				
SPx	4:02 \pm 0,08	0,45 \pm 0,1	1,11 \pm 0,06	<i>P</i> < 0,001
MT2 proteína				
SPx	5:10 \pm 0,07	0,40 \pm 0,07	1,22 \pm 0,05	<i>P</i> < 0,001
ROR α mRNA				
SPx	1:28 \pm 0,03	0,12 \pm 0,07	0,94 \pm 0,05	n.s.
Px	3:32 \pm 0,1	0,59 \pm 0,01	1,11 \pm 0,08	<i>P</i> < 0,001
ROR α proteína (núcleo)				
SPx	1:28 \pm 0,04	0,39 \pm 0,04	1,28 \pm 0,03	<i>P</i> < 0,01
Px	2:16 \pm 0,06	0,75 \pm 0,06	1,47 \pm 0,04	<i>P</i> < 0,01
ROR α proteína (citosol)				
SPx	13:45 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02	0,66 \pm 0,03	<i>P</i> < 0,05
Px	6:14 \pm 0,08	0,37 \pm 0,05	1,28 \pm 0,04	n.s.

La acrofase se expresa como horas:minutos.

En la **figura 18** se muestran los cambios en los niveles de mRNA y proteína de los receptores MT1 y MT2 en los grupos SPx y Px (inyectados con vehículo o

melatonina) y el grupo tratado con Lz. Los niveles de expresión y proteína se midieron a las 12:00 hr, 4 hr después de la administración con melatonina o vehículo. En general, se observa que tras la administración de melatonina los niveles tienden a aumentar levemente, aunque las diferencias no son significativas.

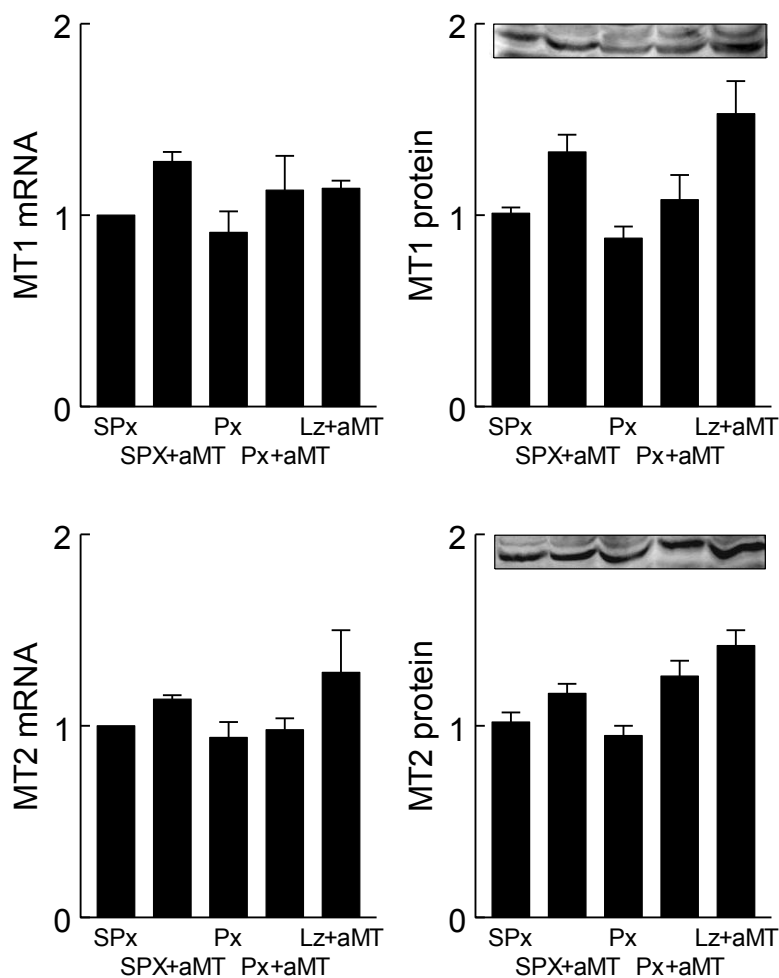


Figura 18: Efectos de la Px, Lz y aMT sobre los niveles de mRNA y proteína de los receptores de membrana MT1 y MT2. Las ratas se sacrificaron a las 12:00 hr y se inyectaron con vehículo (SPx and Px) o melatonina (SPx, Px y Lz) 4 hr antes.

En la **figura 19** se muestran los niveles de mRNA y proteína en las fracciones nuclear y citosólica de ROR α medidos a las 12:00 hr, 4 horas después de la administración de vehículo o melatonina. La pinealectomía causó un aumento en los niveles citosólicos de ROR α ($P < 0,001$), mientras que las restantes condiciones experimentales no mostraron efecto alguno sobre la expresión y niveles de ROR α .

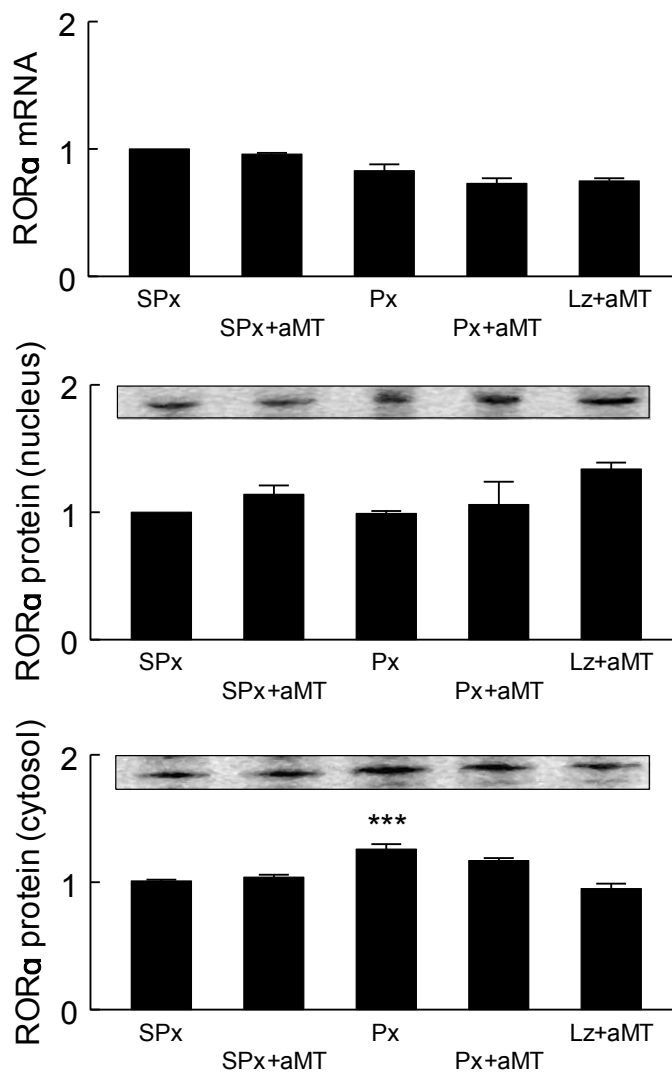


Figura 19: Efectos de la Px, Lz y aMT sobre los niveles de mRNA y proteína de los receptores ROR α . Las ratas se sacrificaron a las 12:00 hr y se inyectaron con vehículo (SPx and Px) o melatonina (SPx, Px y Lz) 4 hr antes. *** $P < 0,001$ vs SPx.

En la **figura 20** se muestran los niveles de expresión del mRNA y contenido de la proteína de los receptores MT1 y MT2 medidos a las 12 hr, 4 horas después de la administración de vehículo o melatonina. Tanto la expresión como los niveles de MT1 y MT2 mostraron un aumento significativo dosis-dependiente como consecuencia de la administración de melatonina.

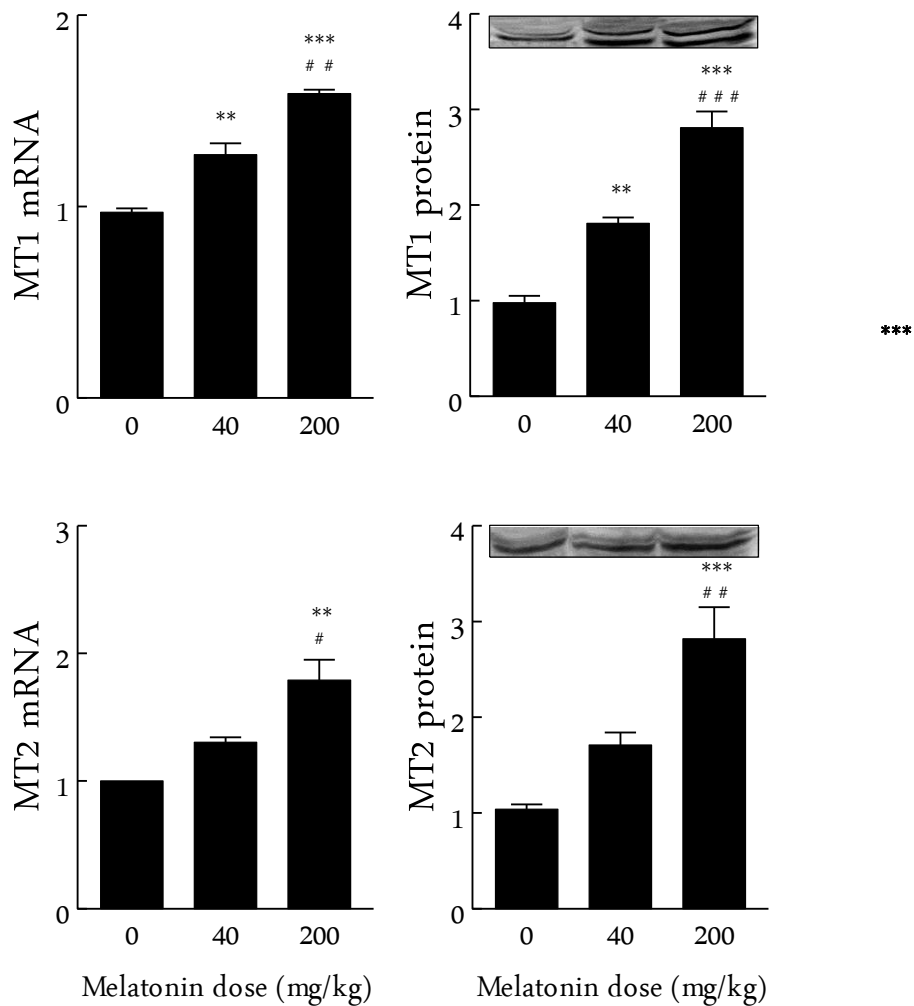


Figura 20: Cambios dosis dependiente en la mRNA y el contenido de MT1, MT2. Las ratas fueron inyectadas con vehículo (0), 40 y 200 mg/kg de melatonina a las 08:00 hr y sacrificadas 4 hr después. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ vs C; ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$ vs C-40.

A diferencia de lo comentado para MT1/MT2, los niveles de mRNA y proteína de las fracciones citosólicas y nuclear de ROR α no se afectaron por la administración de dosis crecientes de melatonina (**figura 21**).

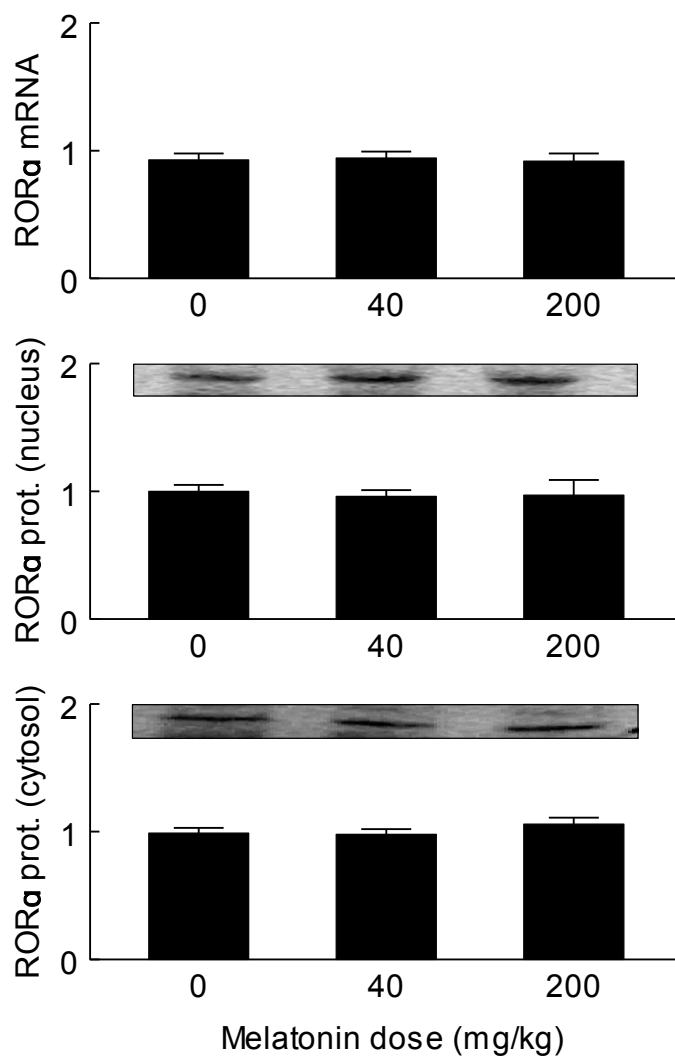


Figura 21: Cambios dosis dependiente en la mRNA y el contenido proteico de ROR α en las fracciones nuclear y citosólica. Las ratas fueron inyectadas con vehículo (0), 40 y 200 mg/kg de melatonina a las 08:00 hr y sacrificadas 4 horas después.

Discusión

3. Distribución subcelular de melatonina

Ante la evidencia de la síntesis extrapineal de melatonina, en este trabajo hemos estudiado diversos aspectos fisiológicos y farmacológicos referentes a la melatonina tisular, incluyendo tanto su patrón de distribución subcelular como los mecanismos que regulan su síntesis. Este estudio se ha realizado en cerebro e hígado de rata por la gran actividad metabólica de ambos tejidos y el elevado estrés oxidativo al que están sometidos, sobre todo el primero.

Además de cuantificar los niveles subcelulares de melatonina, nuestros resultados demuestran la existencia de oscilaciones en su concentración a lo largo del día en cerebro e hígado, aunque estas fluctuaciones no se ajustan a un ritmo circadiano a diferencia de la melatonina pineal. Existen notables diferencias respecto a los niveles de melatonina presentes tanto a nivel subcelular como entre ambos tejidos. En corteza cerebral, los mayores niveles de melatonina se registran en mitocondria, seguido de membrana celular, núcleo y citosol; en hígado, el mayor contenido de ésta se encuentra a nivel de la membrana celular, seguido por mitocondria, núcleo y citosol, donde, al igual que en la corteza cerebral, se obtienen los niveles subcelulares de melatonina más bajos. Nuestros resultados concuerdan con datos descritos anteriormente de manera indirecta, donde se observó que los niveles de melatonina en núcleo y mitocondria eran notablemente mayores que los encontrados en plasma (Menendez-Pelaez y cols., 1993; Menendez-Pelaez y Reiter, 1993; Acuna-Castroviejo y cols., 2003). Estas altas concentraciones de melatonina tisular respecto a la de origen pineal, junto a la ausencia de ritmo circadiano, nos podrían indicar que la melatonina extrapineal posee funciones diferentes a las de la pineal (Reiter, 1987).

Los resultados muestran cómo la pinealectomía provoca un aumento en los niveles intracelulares de melatonina, principalmente en membranas; en este sentido, si bien no existe ningún antecedente sobre el efecto de la pinealectomía en los distintos compartimentos celulares, datos previos muestran que, en tino de rata, la extracción quirúrgica de la glándula pineal aumenta significativamente la concentración de melatonina (Jimenez-Jorge y colbs., 2005). Asimismo, también se observa un aumento de los niveles intracelulares de melatonina tras someter a las ratas a un tratamiento con luz continua, procedimiento experimental que, de forma similar a la pinealectomía, inhibe la producción pineal de melatonina (Lynch y colbs., 1981; Brainard y colbs., 1984). En su conjunto, estos datos sugieren que la producción extrapineal de melatonina en hígado y corteza cerebral estaría constitutivamente inhibida por la melatonina circulante de origen pineal.

Las diferencias entre la distribución subcelular de melatonina en hígado y cerebro podrían estar estrechamente relacionadas con las funciones fisiológicas específicas de cada tejido. Por un lado, el cerebro es un órgano que posee una alta demanda energética ya que utiliza el 20% del oxígeno total consumido por el organismo, aunque sólo representa el 2% del peso total de un individuo (Silver y Erecinska, 1998). Este alto consumo de oxígeno se refleja en una alta actividad mitocondrial y la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), asociada al metabolismo oxidativo y síntesis de ATP (Acuna-Castroviejo y colbs., 2007; Acuna y colbs., 2011; Lopez y colbs., 2009). Mientras que a concentraciones fisiológicas estas ROS participan en numerosos procesos de señalización celular (entre ellos, la regulación redox de la respuesta inmune, el control del tono vascular, la detección de los cambios en la concentración de oxígeno o la producción regulada de óxido nítrico (Valko y colbs., 2007; Droge, 2002)), su acumulación a nivel mitocondrial

y celular provoca un estado de estrés oxidativo en el que se dañan todas las estructuras celulares y finalmente desemboca en un proceso de muerte celular. La situación descrita es especialmente importante en el cerebro debido no sólo a las altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados (Floyd y Hensley, 2002) y metales de transición como el hierro, implicados en la generación del peligroso radical hidroxilo (Hill y Switzer, III, 1984), sino también a una pobre protección antioxidante a nivel citosólico (Droge, 2003; Reiter, 1995), provocando que este tejido sea excesivamente vulnerable al daño oxidativo.

La presencia de altas concentraciones de melatonina en mitocondrias de cerebro constituye un mecanismo por el cual controla la homeostasis mitocondrial y mejora su eficiencia bioenergética, ya que estudios previos muestran que la melatonina puede aumentar la actividad de los complejos de la CTE y de la ATPasa al mismo tiempo que reduce la producción de ROS (Martin y colbs., 2000; Paradies y colbs., 2010; Acuna-Castroviejo y colbs., 2007; Acuna y colbs., 2011; Lopez y colbs., 2009; Lopez y colbs., 2006; Martin y colbs., 2002). En definitiva, nuestras observaciones parecen indicar que la existencia de una elevada concentración de melatonina en el cerebro podría haberse originado como consecuencia de una adaptación celular ante la elevada demanda energética, permitiendo de este modo el uso de altas cantidades de oxígeno por este tejido. De hecho, diversos estudios han comprobado que la susceptibilidad de las neuronas y la glía al daño oxidativo es prevenida por la acción de la melatonina (Jou y colbs., 2010; Dong y colbs., 2010; Kaur y colbs., 2010).

En el caso del hígado, la melatonina se distribuye homogéneamente en los distintos compartimentos celulares, aunque podemos observar que el contenido de ésta aumenta significativamente por la mañana y por la noche, coincidiendo con la mayor actividad metabólica de este órgano. De forma similar a lo propuesto por otros autores,

estos picos de melatonina pueden asociarse con el control circadiano de la actividad metabólica en el hígado (Bass y Takahashi, 2010).

Nuestros datos muestran que, tras la administración intraperitoneal de una dosis de 10 mg/kg de melatonina, las membranas de cerebro e hígado acumulan unos altos niveles de melatonina. La acumulación de melatonina en esta fracción celular no está influenciada en ningún momento por los distintos tratamientos (pinealectomía o luz continua), ya que en todos los grupos experimentales el aumento observado en los niveles de melatonina es proporcional respecto a sus respectivos valores basales. Asimismo, el tratamiento con luzindol, un antagonista selectivo de MT1 y MT2, no determina cambios significativos en los niveles de melatonina, sugiriendo que estos receptores no participan en el proceso de almacenamiento en las membranas celulares. En el resto de fracciones subcelulares los niveles de melatonina también aumentan después de su administración exógena, duplicando sus valores basales. Nuevamente, estos cambios en la concentración subcelular de melatonina se mantienen independientemente de los tratamientos experimentales realizados (pinealectomía, luz continua o luzindol).

Tras determinar la capacidad de la melatonina para almacenarse en las distintas fracciones subcelulares, especialmente a nivel de la membrana, nuestro próximo objetivo ha sido comparar si esta capacidad de las membranas celulares de cerebro e hígado para retener melatonina puede saturarse bajo condiciones de altos niveles extracelulares de melatonina, lo que provocaría la alteración de este mecanismo homeostático y la consecuente entrada libre de melatonina al interior celular. Tras administrar dosis crecientes de melatonina (40, 100 y 200 mg/kg), nuestros resultados muestran una acumulación no saturable y dosis-dependiente a nivel de la membrana celular, indicio que queda reflejado en unos niveles de melatonina 20 veces mayores,

tras una dosis de 200 mg/kg, con respecto a la situación basal. La acumulación de melatonina en membranas reflejada en nuestro estudio podría estar implicada en el mecanismo de depuración frente a los radicales acuosos y lipofílicos presentes en esta fracción subcelular (Ceraulo y cols., 1999), ofreciendo un alto nivel de protección *in situ* frente al ataque de ROS. Asimismo, nuestros datos sugieren una capacidad de las membranas celulares para actuar a modo de reservorio, limitando y regulando el acceso de la melatonina al interior celular según los requerimientos de la célula. No obstante, el mecanismo por el cual la célula puede regular este proceso permanece desconocido, aunque posiblemente pueda implicar la participación de transportadores específicos de membrana.

Otra consideración destacable de nuestro estudio es que, tras la administración de dosis crecientes de melatonina, las concentraciones mitocondriales y nucleares muestran un comportamiento diferente al observado en membranas y citosol. Así, mientras que la melatonina se acumula de forma dosis dependiente en membranas y citosol, la concentración alcanza el punto de saturación en núcleo y mitocondria tras la administración de 40 mg/kg de melatonina. Hasta el momento, todos los datos descritos en la bibliografía dotaban a la melatonina de una naturaleza altamente anfifílica, característica que le permite atravesar todas las barreras celulares y equilibrar su concentración a ambos lados de las membranas (Reiter, 1991a). Estos nuevos resultados cambiarían esta concepción clásica ya que sugieren la existencia de algún mecanismo de regulación presente en la membrana celular, mitocondrial y nuclear, capaz de modular la transferencia de melatonina desde la membrana al interior celular, así como desde el citosol a la mitocondria y núcleo. Además, si tenemos en cuenta que la melatonina actúa principalmente a nivel mitocondrial y nuclear, nuestros resultados sugieren que el rango para el uso terapéutico de melatonina en ratas debe oscilar entre 10 y 40 mg/kg. La

extrapolación de estos datos a la dosis equivalente en humanos, mediante la conversión de Reagan-Shaw (Reagan-Shaw y colbs., 2008), nos muestra que la dosis terapéutica efectiva para un adulto de unos 70 kg estaría entre 1,6 y 6,5 mg/kg, es decir, entre 112 y 455 mg, si bien estos datos aún deben someterse a las evaluaciones correspondientes.

Considerando los datos expuestos a lo largo de esta discusión, el mecanismo que regula la distribución de melatonina en el interior celular podría estar determinado por las actividades antioxidantes y anti-inflamatorias de la célula, actuando por tanto en respuesta a las necesidades tisulares específicas de cada momento. La melatonina es el principal antioxidante intracelular, propiedad que se refleja, entre otras consideraciones, por su capacidad para mantener la homeostasis del GSH actuando a través de varias vías: aumentando la síntesis de GSH mediante el aumento de la expresión y actividad de γ -glutamylcisteina sintasa (Urata y colbs., 1999); restableciendo los niveles de GSH a partir de glutathion oxidado (GSSG) a través de la inducción de la expresión y actividad de la glutathion reductasa (GRd) (Martin y colbs., 2000; Antolin y colbs., 1996; Carretero y colbs., 2009), y reduciendo el consumo de GSH debido a la alta capacidad de depurar radicales libres que posee la propia melatonina, disminuyendo así el estrés oxidativo celular (Tan y colbs., 1993; Acuna-Castroviejo y colbs., 2007; Acuna y colbs., 2011; Lopez y colbs., 2009; Tan y colbs., 2007; Reiter y colbs., 2009). El GSH es muy necesario para la célula, ya que participa en una serie de reacciones actuando frente a los radicales libres y eliminando xenobióticos mediante la acción de la enzima glutathion S-transferasa. Además, el GSH se encuentra también presente en el núcleo de la célula, donde tradicionalmente se ha relacionado con la protección del genoma (Sandstrom y Marklund, 1990). Numerosos estudios sugieren un papel clave del GSH en la homeostasis nuclear y en la proliferación celular, siendo la disminución en los niveles de este antioxidante la causa principal de fragmentación del ADN y apoptosis

observada tras un proceso de irradiación (Morales y cols., 1998). El GSH pasa al núcleo justo antes del inicio de la proliferación, regulando una serie de procesos necesarios para la división celular (Markovic y cols., 2010). Por tanto, unos niveles elevados de GSH en el núcleo celular están directamente relacionados con la proliferación celular. Para la prevención de un estado hiperreducido dependiente de GSH en el núcleo, las membranas celulares y nucleares podrían controlar la cantidad intracelular de melatonina. Este mecanismo podría relacionarse con las propiedades oncostáticas de la melatonina. De hecho, si la melatonina se distribuye homogéneamente en todos los compartimentos celulares, el estado redox de la célula cambiaría a un alto estado hiperreducido, alterando muchas reacciones redox.

Finalmente, los datos de este primer estudio revelan que la fisiología de la melatonina es más compleja de lo que se creía previamente. Las concentraciones de melatonina varían durante las 24 hr en los distintos compartimentos celulares, cambios que probablemente indican la capacidad para regular independientemente el estado redox en cada compartimento, así como su capacidad para acumularse en aquellas estructuras subcelulares donde sea requerida. En este sentido, la acción anti y proapoptótica de la melatonina en células normales y cancerígenas podrían ser resultado de la alteración en el mecanismo de regulación y la correspondiente disregulación de sus niveles subcelulares y libre acceso al interior celular. Por último, y desde un punto de vista terapéutico, la existencia de este mecanismo que controla la distribución subcelular de melatonina justifica no sólo la necesidad de usar altas dosis de melatonina para alcanzar un beneficio terapéutico, sino que explica también la baja toxicidad cuando es administrada bajo estas condiciones.

2. Distribución de receptores de membrana y nucleares

Los resultados obtenidos de nuestro segundo estudio muestran por primera vez la existencia de variaciones diarias tanto en los niveles proteicos como en la expresión de los principales receptores de melatonina presentes en la membrana (MT1 y MT2) y núcleo (ROR α) de hígado de rata. El posterior análisis de cosinor revela únicamente la existencia de ritmo circadiano en la expresión y niveles de los receptores de membrana, con niveles máximos durante el periodo nocturno coincidiendo con la máxima síntesis pineal de melatonina, pero no en las variaciones diarias manifestadas en ROR α . Además, la pinealectomía suprime el ritmo encontrado en MT1 y MT2, aunque por el contrario aumenta la expresión de ROR α ; finalmente, la administración de concentraciones crecientes de melatonina aumenta la síntesis de MT1 y MT2 de una forma dosis-dependiente, sin ejercer ningún efecto sobre ROR α . En conjunto, estos datos sugieren que los cambios diarios en la expresión y niveles de los receptores podrían estar regulados en parte por los niveles plasmáticos de melatonina de origen pineal, que alcanzan su máximo a media noche (Stehle y cols., 2011; Venegas y cols., 2012).

El aumento nocturno observado en la expresión de los receptores de membrana podría originarse como respuesta a la síntesis circadiana de melatonina, al ser ésta su ligando fisiológico. Las acrofases del RNA mensajero de MT1 y MT2 se sitúan alrededor de las 03:00 horas, y 2 horas después se detectan las acrofases del contenido proteico de ambos receptores. Tal y como hemos descrito con anterioridad en el mismo modelo experimental, la síntesis de melatonina pineal alcanza su pico máximo sobre las 02:00 hr, es decir, una hora antes de la máxima expresión de MT1 y MT2 (Venegas y cols., 2012). Estos datos nos permiten sugerir la existencia de una secuencia temporal

en la cual el aumento de los niveles plasmáticos de melatonina pineal provoca la expresión del RNA mensajero de sus receptores de membrana y su posterior transcripción proteica. Por lo tanto, en el periodo de tiempo comprendido entre las 03:00-05:00 hr, tanto MT1 como MT2 pueden ser activados por la melatonina y responder adecuadamente a sus niveles circulantes. Así, el descenso posterior en los niveles de melatonina circulante, con la consecuente represión sobre sus propios receptores, reduce notablemente la expresión y contenido proteico de MT1/MT2. Nuestra teoría sobre la implicación de la melatonina pineal en la regulación de sus receptores se ve apoyada por el hecho de que la pinealectomía suprime la expresión, y por tanto, el contenido de MT1 y MT2.

Si tenemos en cuenta que los niveles intracelulares de melatonina aumentan en hígado de rata tras la pinealectomía (Venegas y cols., 2012), la interacción entre melatonina y sus receptores de membrana puede explicarse en base a dos alternativas: a) la expresión de los receptores MT1 y MT2 se activa por la melatonina de origen pineal, así que la ausencia de melatonina circulante causada por la pinealectomía provocaría la desaparición de la señal que induce la expresión de los receptores, o b) el aumento en los niveles de melatonina intracelular causado por la pinealectomía es el factor responsable de la inhibición de dichos receptores. Con el fin de responder a tal interrogante, nuestros datos confirman que, tras la administración de dosis crecientes de melatonina, el contenido plasmático e intracelular, así como los niveles proteicos de MT1 y MT2, aumentan de una forma dosis dependiente. Bajo estas condiciones experimentales, la pinealectomía reduce la síntesis de los receptores MT1/MT2, mientras que la administración de melatonina aumenta este proceso. En definitiva, estos datos confirman la idea previa de que son los niveles de melatonina intracelular los únicos responsables de la regulación de la expresión de los receptores de membrana.

Además de los datos expuestos, la bibliografía nos ofrece resultados que avalarían nuestra hipótesis, observándose que tanto los niveles de melatonina tisular y pineal, así como la expresión de los receptores MT1/MT2 son parámetros que disminuyen con la edad, por lo que la expresión de estos receptores está directamente correlacionada con los niveles de melatonina.

Además de todos los aspectos destacados hasta el momento, nuestros resultados sugieren también que la regulación de los receptores de melatonina es un fenómeno variable en función del tejido u órgano estudiado. En este sentido, nuestras observaciones concuerdan con otros estudios realizados en pars tuberalis (PT), en los cuales se observa un aumento nocturno en los niveles de MT1 que se mantiene invariable a pesar de la pinealectomía (Guerrero y cols., 2000). Sin embargo, esta regulación mediada por la melatonina es específica de determinados órganos y/o tejidos ya que, por ejemplo, en el núcleo supraquiasmático la regulación de los receptores MT1 está mediada por el fotoperiodo, incluso en ratas pinealectomizadas (Masson-Pevet y cols., 1996). En intestino delgado, grueso y colon la expresión de los receptores no se ajusta a ningún tipo de ritmo, sino que es la ingesta diaria la que condiciona la expresión de los receptores de membrana (Sotak y cols., 2006). En otros casos, como ocurre en el estroma antimesometrial de las ratas, la expresión de los receptores MT1 está bajo el control de las hormonas ováricas (Zhao y cols., 2002). No obstante, en la mayoría de los tejidos la relación entre el contenido intracelular de melatonina y la expresión de sus receptores de membrana no ha sido estudiada en detalle.

Con respecto a ROR α , los niveles de RNAm y proteína muestran variaciones diarias en hígado de rata tanto a nivel nuclear como citosólico, si bien el posterior análisis de cosinor sólo revela la presencia de ritmo circadiano en los niveles de expresión en el grupo de ratas pinealectomizadas. Estos cambios descritos son similares

a los encontrados en otros tejidos periféricos, como por ejemplo hígado, corazón, estómago, riñón e intestino de ratón, tejidos en los cuales se observaron oscilaciones en los niveles de expresión de ROR α a lo largo del fotoperiodo (Akashi y Takumi, 2005); sin embargo, los estudios realizados en NSQ de rata muestran una distribución de ROR α ajustada a un claro ritmo circadiano (Agez y cols., 2007). En su conjunto, estos datos podrían sugerir que la expresión de ROR α no sólo depende del tejido sino también de la especie animal objeto de estudio. Asimismo, el descenso en los niveles citosólicos de ROR α durante el periodo nocturno, junto con el aumento en este mismo periodo en los niveles nucleares, puede indicarnos que la redistribución de ROR α desde el citosol al núcleo es un fenómeno controlado en última instancia por los niveles circulantes de melatonina. Nuestra hipótesis es soportada por los datos obtenidos tras la pinealectomía, ya que dicha condición experimental determina un aumento significativo tanto en los niveles de mRNA y proteína, ajustándose en este caso a un ritmo claramente circadiano con acrofases a las 2:92 y 3:46 hr, respectivamente. Por otro lado, la existencia de un transporte de ROR α hacia el núcleo se ve justificada por las notables diferencias existentes entre el contenido citosólico y nuclear de este receptor durante la noche; es decir, la distribución subcelular de ROR α muestra un carácter dinámico similar al descrito para otros receptores nucleares, como por ejemplo los receptores esteroideos (Guiochon-Mantel y cols., 1991), al tiempo que se caracteriza por ser un mecanismo dependiente de la dosis de melatonina empleada.

Estudios previos en células Jurkat indicaron que, tras la incubación con una dosis de 10 mg/kg de melatonina, se induce un descenso en la expresión de ROR α en el núcleo a los 5 minutos, efecto que se mantiene durante 85 minutos (Lardone y cols., 2011). También, se observó un leve transporte de ROR α desde el núcleo hacia el

citoplasma, resultados que avalan la mencionada participación de la melatonina en la redistribución de su receptor nuclear. Junto con la unión al ligando y mecanismos post-transcripcionales (fosforilación, acetilación y ubiquitinización), los eventos de importación/exportación nuclear juegan un papel clave a la hora de controlar la activación transcripcional de los receptores nucleares (Tremblay y colbs., 1999; Aschrafi y colbs., 2006; Komeili y O'Shea, 2000; Metivier y colbs., 2002; Wilson y colbs., 1993). Con el objetivo de analizar más en detalle la implicación de la melatonina sobre la activación de ROR α , analizamos los cambios en la distribución nuclear y citosólica de ROR α 4 horas después de la administración de melatonina. Tal como ya se había observado previamente en otros estudios tras la inyección de bajas dosis de melatonina (Agez y colbs., 2007), no hemos observado ningún cambio significativo tras realizar los procedimientos experimentales correspondientes. En base a estos resultados surge la posibilidad de que, o bien los cambios en la distribución entre núcleo y citosol ocurren antes de este momento, o bien la expresión de ROR α esta bajo control de un mecanismo más complejo que responde de una forma u otra en función de si la dosis de melatonina es fisiológica o farmacológica.

Analizando de forma conjunta los datos obtenidos para ROR α y MT1/MT2, podemos observar que el aumento en la expresión de ROR α precede al de MT1 y MT2, situación que sugiere una posible correlación, aunque pobremente definida, entre los receptores de membrana y nucleares. De forma sorprendente, las ratas pinealectomizadas mostraban una mejor ritmicidad tanto en la expresión como en los niveles de ROR α , sin que dichos cambios sean observados tras la administración exógena de melatonina. Considerando estos datos, así como el efecto que provoca la pinealectomía sobre los niveles extracelulares de melatonina, podemos decir que el

descenso de sus niveles plasmáticos dispara la señal para inducir la expresión de ROR α .

La administración de 10 mg/kg de melatonina en los grupos SPx y Px, así como el tratamiento con luzindol, no inducen cambio alguno en los niveles y expresión de los receptores de membrana y nucleares. Sin embargo, la administración de melatonina a altas dosis (40 y 200 mg/kg) sí provoca una inducción dosis dependiente en los niveles y expresión de sus receptores de membrana, llegándose a cuantificar un aumento del 50% con la dosis más alta. Estos datos no sólo verifican el papel de la melatonina sobre la expresión de los receptores MT1 y MT2, sino también que, cuando la melatonina se usa a altas dosis con un fin terapéutico, el efecto puede ser superior a lo esperado por la mencionada habilidad para inducir la expresión de sus propios receptores.

Nuestros trabajos ponen de manifiesto una conexión funcional entre los receptores nuclear y de membrana de la melatonina. Por un lado, los receptores de membrana MT1/MT2 modulan numerosos segundos mensajeros, principalmente cAMP, cGMP, calcio intracelular y fosfolípidos (Vanecek, 1998). La activación de los receptores de membrana deprime la concentración intracelular de calcio, lo que conlleva a una disminución de la actividad de la PKA y los cambios consecuentes en el estado fosforilado de sus proteínas diana, como CREB (Wiesenberg y cols., 1998). Al igual que CREB, ROR α es una fosfoproteína cuya actividad puede ser modulada por el cambio en su estado de fosforilación, por lo que la regulación de ROR α estaría mediada a través de los receptores de membrana sobre los que, a su vez actúan diferentes concentraciones de melatonina (Lardone y cols., 2009). Por lo tanto, en el grupo SPx, el aumento nocturno en los niveles de melatonina activa los receptores de membrana que van a disminuir los niveles de cAMP, eventos que se traducen en un cambio en el

estado de fosforilación de ROR α y un notable aumento de su actividad transcripcional. De esta forma, la melatonina puede actuar indirectamente como una señal que regula la actividad transcripcional de ROR α . Por su parte, la ausencia de melatonina circulante asociada a la pinealectomía permite la existencia de altos niveles de cAMP, causantes en última instancia de la fosforilación e inactivación transcripcional de ROR α . En base a esta relación, los altos niveles de ROR α encontrados tras la pinealectomía deben ser interpretados como un mecanismo compensatorio puesto en marcha por la célula que trata de contrarrestar la falta de actividad transcripcional dependiente de ROR α con una mayor síntesis de éste, evitándose así una profunda alteración de los numerosos procesos fisiológicos asociados a dicho receptor nuclear.

En resumen, los datos obtenidos en este segundo trabajo nos permiten concluir que la expresión de los receptores de melatonina se ajusta a una dinámica circadiana controlada por la propia indolamina. Asimismo, la inducción de los receptores de membrana tras la administración de altas dosis de melatonina refuerza el hecho de que los beneficios terapéuticos de la melatonina no se limitan a bajas dosis de melatonina.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente estudio podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La distribución subcelular de melatonina es distinta en corteza cerebral e hígado de rata, siendo su concentración mayor en la primera.
2. La melatonina tisular no manifiesta ritmo circadiano como ocurre con la melatonina de origen pineal.
3. La melatonina pineal ejerce una inhibición tónica sobre la síntesis de melatonina tisular, ya que tras la pinealectomía estos niveles de melatonina aumentan.
4. Los receptores de membrana, MT1 y MT2, no participan en la regulación de la distribución subcelular de melatonina, ya que ésta no se modifica al bloquear dichos receptores con luzindol.
5. Los receptores de membrana, MT1 y MT2, pero no los receptores nucleares ROR α , manifiestan un ritmo circadiano en hígado de rata. Sus ritmos dependen de la pineal, ya que la pinealectomía elimina el ritmo de los receptores de membrana, y aumenta las variaciones rítmicas de los receptores nucleares.
6. La melatonina no se distribuye uniformemente en la célula. La membrana plasmática posee una alta capacidad para almacenar melatonina, pudiendo actuar como reservorio de ésta para ser usada cuando la célula lo requiera. En consecuencia, debe existir un mecanismo que regule la entrada de melatonina desde la membrana al interior celular, probablemente un transportador específico de membrana.
7. Núcleo y mitocondria presentan unos niveles basales altos de melatonina que aumentan con su administración exógena, hasta 40 mg/kg, saturándose entonces sus depósitos. Estos datos indican la existencia de algún mecanismo en las membranas mitocondriales y nucleares que regule la transferencia de melatonina desde el citosol.

8. Teniendo en cuenta que núcleo y mitocondria son las dianas principales de la melatonina, se puede concluir que las dosis terapéuticas de ésta oscilan entre 10 y 40 mg/kg en la rata. Trasladando esas dosis a la clínica humana, se calculan unas dosis para el adulto entre 1,6 y 6,5 mg/kg de peso.

9. La administración de melatonina, hasta 200 mg/kg, provoca un aumento dosis-dependiente de la expresión y niveles de MT1 y MT2. Por tanto, el uso de altas dosis de melatonina con fines terapéuticos puede tener efectos adicionales al activar sus receptores.

Bibliografía

- Acuna C D, Lopez L C, Escames G, Lopez A, Garcia J A, Reiter R J. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 2011; 11(2): 221-240.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Leon J, Carazo A, Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 549-557.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Rodriguez M I, Lopez L C. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 2007; 12: 947-963.
- Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter R J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; 30(2): 65-74.
- Acuna-Castroviejo D, Pablos M I, Menendez-Pelaez A, Reiter R J. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 82(2): 253-256.
- Acuna-Castroviejo D, Reiter R J, Menendez-Pelaez A, Pablos M I, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 1994; 16(2): 100-112.
- Agez L, Laurent V, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 2007; 144(2): 522-530.
- Agozzino P, Avellone G, Bongiorno D, Ceraulo L, Filizzola F, Natoli M C, Livrea M A, Tesoriere L. Melatonin: structural characterization of its non-enzymatic mono-oxygenate metabolite. *J Pineal Res* 2003; 35(4): 269-275.
- Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(5): 441-448.
- Alaerts M, Venken T, Lenaerts A S, De Z S, Norrback K F, Adolfsson R, Del-Favero J. Lack of association of an insertion/deletion polymorphism in the G protein-coupled receptor 50 with bipolar disorder in a Northern Swedish population. *Psychiatr Genet* 2006; 16(6): 235-236.
- Albrecht U. Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes. *J Appl Physiol* 2002; 92(3): 1348-1355.
- Alonso R. *Fisiologia humana*. McGraw-Gill Interamericana, 891-901. 1999.
- Andrabi S A, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn T F. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* 2004; 18(7): 869-871.
- Andre E, Conquet F, Steinmayr M, Stratton S C, Porciatti V, Becker-Andre M. Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J* 1998a; 17(14): 3867-3877.
- Andre E, Gawlas K, Becker-Andre M. A novel isoform of the orphan nuclear receptor RORbeta is specifically expressed in pineal gland and retina. *Gene* 1998b; 216(2): 277-283.
- Antolin I, Rodriguez C, Sainz R M, Mayo J C, Uria H, Kotler M L, Rodriguez-Colunga M J, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10(8): 882-890.
- Arangino S, Cagnacci A, Angiolucci M, Vacca A M, Longu G, Volpe A, Melis G B. Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure

- in healthy men. *Am J Cardiol* 1999; 83(9): 1417-1419.
- Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman Hall, 201-285. 1995. London
- Aschrafi A, Meindl N, Firla B, Brandes R P, Steinhilber D. Intracellular localization of RORalpha is isoform and cell line-dependent. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763(8): 805-814.
- Austin S, Medvedev A, Yan Z H, Adachi H, Hirose T, Jetten A M. Induction of the nuclear orphan receptor RORgamma during adipocyte differentiation of D1 and 3T3-L1 cells. *Cell Growth Differ* 1998; 9(3): 267-276.
- Bailey M J, Coon S L, Carter D A, Humphries A, Kim J S, Shi Q, Gaildrat P, Morin F, Ganguly S, Hogenesch J B, Weller J L, Rath M F, Moller M, Baler R, Sugden D, Rangel Z G, Munson P J, Klein D C. Night/day changes in pineal expression of >600 genes: central role of adrenergic/cAMP signaling. *J Biol Chem* 2009; 284(12): 7606-7622.
- Baler R, Covington S, Klein D C. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem* 1997; 272(11): 6979-6985.
- Baler R, Klein D C. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. *J Biol Chem* 1995; 270(45): 27319-27325.
- Bass J, Takahashi J S. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 2010; 330(6009): 1349-1354.
- Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter J F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194(3): 1371-1379.
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat J H, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269(46): 28531-28534.
- Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 2006; 40(1): 1-9.
- Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993; 49(8): 635-641.
- Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1290(2): 191-196.
- Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter R J, Acuna-Castroviejo D, Guerrero J M. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 1996; 20(4): 205-210.
- Blanchard B, Pompon D, Ducrocq C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J Pineal Res* 2000; 29(3): 184-192.
- Bois-Joyeux B, Chauvet C, Nacer-Cherif H, Bergeret W, Mazure N, Giguere V, Laudet V, Danan J L. Modulation of the far-upstream enhancer of the rat alpha-fetoprotein gene by members of the ROR alpha, Rev-erb alpha, and Rev-erb beta groups of monomeric orphan nuclear receptors. *DNA Cell Biol* 2000; 19(10): 589-599.
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brainard G C, Richardson B A, King T S, Reiter R J. The influence of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Brain Res* 1984; 294(2): 333-339.

- Bubenik G A. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biol Signals Recept* 2001; 10(6): 350-366.
- Bubenik G A. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2002; 47(10): 2336-2348.
- Bubenik G A. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 2: 33-51.
- Bubenik G A, Brown G M, Uhler I, Grota L J. Immunohistological localization of N-acetylnorepinephrine in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Res* 1974; 81(2): 233-242.
- Bubenik G A, Hacker R R, Brown G M, Bartos L. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 1999; 26(1): 56-63.
- Burris T P. Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERB α and REV-ERB β are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol Endocrinol* 2008; 22(7): 1509-1520.
- Buzzell G R, Pangerl A, Pangerl B, Menendez-Pelaez A, Vaughan M K, Little J C, Hill S M, Vaughan G M, Reiter R J. Melatonin and porphyrin in the Harderian glands of the Syrian hamster: circadian patterns and response to autumnal conditions. *Int J Biochem* 1990; 22(12): 1465-1469.
- Cagnoli C M, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 1995; 18(4): 222-226.
- Cahill G M, Besharse J C. Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(3): 1098-1102.
- Cardinali D P, Freire F. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol* 1975; 2(5): 317-330.
- Cardinali D P, Ladizesky M G, Boggio V, Cutrera R A, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003; 34(2): 81-87.
- Cardinali D P, Rosner J M. Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology* 1971; 89(1): 301-303.
- Carlberg C, Hooft van H R, Staple J K, DeLamarter J F, Becker-Andre M. RZR α , a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 1994; 8(6): 757-770.
- Carretero M, Escames G, Lopez L C, Venegas C, Dayoub J C, Garcia L, Acuna-Castroviejo D. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Pineal Res* 2009; 47(2): 192-200.
- Carrillo-Vico A, Guerrero J M, Lardone P J, Reiter R J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27(2): 189-200.
- Ceraulo L, Ferrugia M, Tesoriere L, Segreto S, Livrea M A, Turco L, V. Interactions of melatonin with membrane models: partitioning of melatonin in AOT and lecithin reversed micelles. *J Pineal Res* 1999; 26(2): 108-112.
- Cheung W Y. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 38(3): 533-538.
- Cheung W Y, Bradham L S, Lynch T J, Lin Y M, Tallant E A. Protein activator of cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its

- adenylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 66(3): 1055-1062.
- Chik C L, Mackova M, Price D, Ho A K. Adrenergic regulation and diurnal rhythm of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the rat pineal gland. *Endocrinology* 2004; 145(11): 5194-5201.
- Chow L, Levine E M, Reh T A. The nuclear receptor transcription factor, retinoid-related orphan receptor beta, regulates retinal progenitor proliferation. *Mech Dev* 1998; 77(2): 149-164.
- Conkright M D, Canettieri G, Sreaton R, Guzman E, Miraglia L, Hogenesch J B, Montminy M. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell* 2003; 12(2): 413-423.
- Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni J M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000; 28(4): 193-202.
- Crosio C, Fimia G M, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis C D, Sassone-Corsi P. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 2002; 22(3): 874-885.
- de Almeida E A, Martinez G R, Klitzke C F, de Medeiros M H, Di M P. Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2(1\Delta g)$) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *J Pineal Res* 2003; 35(2): 131-137.
- Dellegar S M, Murphy S A, Bourne A E, DiCesare J C, Purser G H. Identification of the factors affecting the rate of deactivation of hypochlorous acid by melatonin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(2): 431-439.
- Djeridane Y, Touitou Y. Melatonin synthesis in the rat harderian gland: age- and time-related effects. *Exp Eye Res* 2001; 72(4): 487-492.
- Dong W, Huang F, Fan W, Cheng S, Chen Y, Zhang W, Shi H, He H. Differential effects of melatonin on amyloid-beta peptide 25-35-induced mitochondrial dysfunction in hippocampal neurons at different stages of culture. *J Pineal Res* 2010; 48(2): 117-125.
- Downes M, Burke L J, Muscat G E. Transcriptional repression by Rev-erbA alpha is dependent on the signature motif and helix 5 in the ligand binding domain: silencing does not involve an interaction with N-CoR. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(18): 3490-3498.
- Drew J E, Williams L M, Hannah L T, Barrett P, Abramovich D R. Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[125I]iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. *J Endocrinol* 1998; 156(2): 261-267.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1): 47-95.
- Droge W. Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol* 2003; 543: 191-200.
- Dubocovich M L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16(2): 50-56.
- Dubocovich M L, Hudson R L, Sumaya I C, Masana M I, Manna E. Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res* 2005; 39(2): 113-120.
- Dubocovich M L, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27(2): 101-110.
- Dubocovich M L, Shankar G, Mickel M. 2-[125I]iodomelatonin labels sites with identical pharmacological characteristics in chicken brain and chicken retina. *Eur J Pharmacol* 1989; 162(2): 289-299.
- Dubocovich M L, Takahashi J S. Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize

- melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(11): 3916-3920.
- Duncan M J, Takahashi J S, Dubocovich M L. 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 1988; 122(5): 1825-1833.
- Duncan M J, Takahashi J S, Dubocovich M L. Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology* 1989; 125(2): 1011-1018.
- Dussault I, Fawcett D, Matthyssen A, Bader J A, Giguere V. Orphan nuclear receptor ROR alpha-deficient mice display the cerebellar defects of staggerer. *Mech Dev* 1998; 70(1-2): 147-153.
- Ebisawa T, Karne S, Lerner M R, Reppert S M. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(13): 6133-6137.
- Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006; 60(3): 97-108.
- Evans R M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240(4854): 889-895.
- Fischer T W, Slominski A, Zmijewski M A, Reiter R J, Paus R. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp Dermatol* 2008; 17(9): 713-730.
- Floyd R A, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 2002; 23(5): 795-807.
- Foulkes N S, Borjigin J, Snyder S H, Sassone-Corsi P. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci* 1997; 20(10): 487-492.
- Fujiwara M, Shibata M, Watanabe Y, Nukiwa T, Hirata F, Mizuno N, Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Formation of L-kynurenine from L-tryptophan in cultured rabbit pineal gland. *J Biol Chem* 1978; 253(17): 6081-6085.
- Gachon F, Nagoshi E, Brown S A, Ripperger J, Schibler U. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* 2004; 113(3): 103-112.
- Ganguly S, Coon S L, Klein D C. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 2002; 309(1): 127-137.
- Garcia-Navarro A, Gonzalez-Puga C, Escames G, Lopez L C, Lopez A, Lopez-Cantarero M, Camacho E, Espinosa A, Gallo M A, Acuna-Castroviejo D. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *J Pineal Res* 2007; 43(2): 195-205.
- Gauer F, Masson-Pevet M, Stehle J, Pevet P. Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res* 1994; 641(1): 92-98.
- Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 1999; 20(5): 689-725.
- Giguere V, Beatty B, Squire J, Copeland N G, Jenkins N A. The orphan nuclear receptor ROR alpha (RORA) maps to a conserved region of homology on human chromosome 15q21-q22 and mouse chromosome 9. *Genomics* 1995; 28(3): 596-598.
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans R M, Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding

properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 1994; 8(5): 538-553.

Godson C, Reppert S M. The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1997; 138(1): 397-404.

Guerrero H Y, Gauer F, Schuster C, Pevet P, Masson-Pevet M. Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 2000; 71(3): 163-169.

Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Appianat M, Milgrom E. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J* 1991; 10(12): 3851-3859.

Hamilton B A, Frankel W N, Kerrebrock A W, Hawkins T L, FitzHugh W, Kusumi K, Russell L B, Mueller K L, van B, V, Birren B W, Kruglyak L, Lander E S. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 1996; 379(6567): 736-739.

Hardeland R, Fuhrberg B. Ubiquitous melatonin-presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp Biochem Physiol* 1996; 2: 25-45.

Hardeland R, Pandi-Perumal S R, Poeggeler B. Melatonin in plants-focus in a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Funct Plant Sci Biotechnol* 2007; 1: 32-45.

Hardeland R, Poeggeler B. Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism. *Central nervous system agents in medical chemistry* 2007; 7: 289-303.

Hardeland R. New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int J Biometeorol* 1997; 41(2): 47-57.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms

from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27(2): 119-130.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(13): 2001-2018.

Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int* 2003; 20(6): 921-962.

Hardeland R, Pandi-Perumal S R. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond)* 2005; 2: 22.

Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; 34(4): 233-241.

Hardeland R, Reiter R J, 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(3): 347-357.

He Y W, Deftos M L, Ojala E W, Bevan M J. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* 1998; 9(6): 797-806.

Hill J M, Switzer R C, III. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* 1984; 11(3): 595-603.

Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* 1974; 249(4): 1311-1313.

Hirose T, Smith R J, Jetten A M. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem*

- Biophys Res Commun 1994; 205(3): 1976-1983.
- Ho A K, Chik C L. Adrenergic regulation of mitogen-activated protein kinase in rat pinealocytes: opposing effects of protein kinase A and protein kinase G. *Endocrinology* 2000; 141(12): 4496-4502.
- Ho A K, Chik C L. Modulation of Aanat gene transcription in the rat pineal gland. *J Neurochem* 2010; 112(2): 321-331.
- Ho A K, Price D M, Terriff D, Chik C L. Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 252(1-2): 34-39.
- Horstman J A, Wrona M Z, Dryhurst G. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorg Chem* 2002; 30(5): 371-382.
- Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992; 51(12): 945-953.
- Ishii H, Tanaka N, Kobayashi M, Kato M, Sakuma Y. Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. *J Physiol Sci* 2009; 59(1): 37-47.
- Itoh M T, Ishizuka B, Kuribayashi Y, Amemiya A, Sumi Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(5): 402-408.
- Jaiswal A K. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase2. Gene structure, activity, and tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1994; 269(20): 14502-14508.
- Jetten A M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 2009; 7: e003.
- Jetten A M, Kurebayashi S, Ueda E. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 69: 205-247.
- Jimenez-Jorge S, Jimenez-Caliani A J, Guerrero J M, Naranjo M C, Lardone P J, Carrillo-Vico A, Osuna C, Molinero P. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *J Pineal Res* 2005; 39(1): 77-83.
- Jockers R, Maurice P, Boutin J A, Delagrèze P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 2008; 154(6): 1182-1195.
- Jou M J, Peng T I, Hsu L F, Jou S B, Reiter R J, Yang C M, Chiao C C, Lin Y F, Chen C C. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca²⁺-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 2010; 48(1): 20-38.
- Kanyo R, Price D M, Chik C L, Ho A K. Salt-inducible kinase 1 in the rat pinealocyte: adrenergic regulation and role in arylalkylamine N-acetyltransferase gene transcription. *Endocrinology* 2009; 150(9): 4221-4230.
- Kaur C, Sivakumar V, Ling E A. Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia. *J Pineal Res* 2010; 48(3): 185-193.
- Kim T D, Kim J S, Kim J H, Myung J, Chae H D, Woo K C, Jang S K, Koh D S, Kim K T. Rhythmic serotonin N-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation. *Mol Cell Biol* 2005; 25(8): 3232-3246.
- Kim T D, Woo K C, Cho S, Ha D C, Jang S K, Kim K T. Rhythmic control of AANAT translation by hnRNP Q in circadian

- melatonin production. *Genes Dev* 2007; 21(7): 797-810.
- Klein D C. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* 1985; 117: 38-56.
- Klein D C, Coon S L, Roseboom P H, Weller J L, Bernard M, Gastel J A, Zatz M, Iuvone P M, Rodriguez I R, Begay V, Falcon J, Cahill G M, Cassone V M, Baler R. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52: 307-357.
- Klein D C, Moore R Y, Reppert S M. Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock. In: 1991.
- Komeili A, O'Shea E K. Nuclear transport and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(3): 355-360.
- Konturek S J, Konturek P C, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Czesnikiewicz-Guzik M, Kwiecien S, Brzozowski T, Bubenik G A, Pawlik W W. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol* 2007; 58(3): 381-405.
- KOPIN I J, PARE C M, AXELROD J, WEISSBACH H. The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 1961; 236: 3072-3075.
- Krause D N, Dubocovich M L. Melatonin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1991; 31: 549-568.
- KVEDER S, McISAAC W M. The metabolism of melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) and 5-methoxytryptamine. *J Biol Chem* 1961; 236: 3214-3220.
- Kvetnoy I M, Ingel I E, Kvetnaia T V, Malinovskaya N K, Rapoport S I, Raikhlin N T, Trofimov A V, Yuzhakov V V. Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23(2): 121-132.
- Laitinen J T, Saavedra J M. Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology* 1990a; 126(4): 2110-2115.
- Laitinen J T, Saavedra J M. Differential sensitivity to cations of the melatonin receptors in the rat area postrema and suprachiasmatic nuclei. *J Neurochem* 1990b; 55(4): 1450-1453.
- Lardone P J, Carrillo-Vico A, Molinero P, Rubio A, Guerrero J M. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(3): 516-525.
- Lardone P J, Guerrero J M, Fernandez-Santos J M, Rubio A, Martin-Lacave I, Carrillo-Vico A. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J Pineal Res* 2011; 51(4): 454-462.
- Lau P, Bailey P, Dowhan D H, Muscat G E. Exogenous expression of a dominant negative RORalpha1 vector in muscle cells impairs differentiation: RORalpha1 directly interacts with p300 and myoD. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(2): 411-420.
- Lenaz G, Fato R, Genova M L, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757(9-10): 1406-1420.
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz R M, Mayo J C, Tan D X, Reiter R J. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004; 75(7): 765-790.
- Leon J, Escames G, Rodriguez M I, Lopez L C, Tapias V, Entrena A, Camacho E, Carrion M D, Gallo M A, Espinosa A, Tan D X, Reiter R J, Acuna-Castroviejo D. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain

- metabolite of melatonin. *J Neurochem* 2006; 98(6): 2023-2033.
- Leon J, Macias M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martin M, Espinosa A, Gallo M A, Acuna-Castroviejo D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenes. *Mol Pharmacol* 2000; 58(5): 967-975.
- Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. Structure of melatonin. *J A Chem Soc* 1959; 81: 6084-6085.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J A Chem Soc* 1958; 80: 2587-2592.
- Liu T, Borjigin J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res* 2005; 39(1): 91-96.
- Long D J, Iskander K, Gaikwad A, Arin M, Roop D R, Knox R, Barrios R, Jaiswal A K. Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity. *J Biol Chem* 2002; 277(48): 46131-46139.
- Long D J, Jaiswal A K. Mouse NRH:quinone oxidoreductase (NQO2): cloning of cDNA and gene- and tissue-specific expression. *Gene* 2000; 252(1-2): 107-117.
- Lopez A, Garcia J A, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez L C, Acuna-Castroviejo D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; 46(2): 188-198.
- Lopez L C, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27(5): 623-630.
- Lynch H J, Rivest R W, Ronsheim P M, Wurtman R J. Light intensity and the control of melatonin secretion in rats. *Neuroendocrinology* 1981; 33(3): 181-185.
- Ma X, Idle J R, Krausz K W, Gonzalez F J. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(4): 489-494.
- Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270(5): 832-840.
- Macias M, Rodriguez-Cabezas M N, Reiter R J, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 1999; 27(2): 86-94.
- Maharaj D S, Limson J L, Daya S. 6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation. *Life Sci* 2003a; 72(12): 1367-1375.
- Maharaj D S, Walker R B, Glass B D, Daya S. 6-Hydroxymelatonin protects against cyanide induced oxidative stress in rat brain homogenates. *J Chem Neuroanat* 2003b; 26(2): 103-107.
- Mamontova A, Seguret-Mace S, Esposito B, Chaniale C, Bouly M, Delhay-Bouchaud N, Luc G, Staels B, Duverger N, Mariani J, Tedgui A. Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circulation* 1998; 98(24): 2738-2743.
- Markovic J, Garcia-Gimenez J L, Gimeno A, Vina J, Pallardo F V. Role of glutathione in cell nucleus. *Free Radic Res* 2010; 44(7): 721-733.
- Maronde E, Schomerus C, Stehle J H, Korf H W. Control of CREB phosphorylation and its role for induction of melatonin synthesis in

- rat pinealocytes. *Biol Cell* 1997; 89(8): 505-511.
- Marshall K A, Reiter R J, Poeggeler B, Aruoma O I, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(3): 307-315.
- Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; 14(12): 1677-1679.
- Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(4): 348-357.
- Masson-Pevet M, Bianchi L, Pevet P. Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein. *J Neurosci Res* 1996; 43(5): 632-637.
- McCord CO, Allen EP. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917; 23: 207.
- Medvedev A, Yan Z H, Hirose T, Giguere V, Jetten A M. Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR gamma and characterization of its response element. *Gene* 1996; 181(1-2): 199-206.
- Mei Y A, Lee P P, Wei H, Zhang Z H, Pang S F. Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells. *J Pineal Res* 2001; 30(1): 13-21.
- Meier P J, Sztul E S, Reuben A, Boyer J L. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. *J Cell Biol* 1984; 98(3): 991-1000.
- Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter R J, Barlow-Walden L, Pablos M I, Tan D X. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 1993; 53(4): 373-382.
- Menendez-Pelaez A, Reiter R J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 1993; 15(2): 59-69.
- Menendez-Pelaez A, Rodriguez C, Dominguez P. 5-aminolevulinic synthase mRNA levels in the Harderian gland of Syrian hamsters: correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 80(1-3): 177-182.
- Messner M, Hardeland R, Rodenbeck A, Huether G. Tissue retention and subcellular distribution of continuously infused melatonin in rats under near physiological conditions. *J Pineal Res* 1998; 25(4): 251-259.
- Messner M, Hardeland R, Rodenbeck A, Huether G. Effect of continuous melatonin infusions on steady-state plasma melatonin levels, metabolic fate and tissue retention in rats under near physiological conditions. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 303-313.
- Metivier R, Gay F A, Hubner M R, Flouriot G, Salbert G, Gannon F, Kah O, Pakdel F. Formation of an hER alpha-COUP-TFI complex enhances hER alpha AF-1 through Ser118 phosphorylation by MAPK. *EMBO J* 2002; 21(13): 3443-3453.
- Monnier Z, Bahjaoui-Bouhaddi M, Bride J, Bride M, Math F, Propper A. Structural and immunohistological modifications in olfactory bulb of the staggerer mutant mouse. *Biol Cell* 1999; 91(1): 29-44.
- Moore R Y, Klein D C. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-

- acetyltransferase activity. *Brain Res* 1974; 71(1): 17-33.
- Moraitis A N, Giguere V. Transition from monomeric to homodimeric DNA binding by nuclear receptors: identification of RevErbAalpha determinants required for RORalpha homodimer complex formation. *Mol Endocrinol* 1999; 13(3): 431-439.
- Morales A, Miranda M, Sanchez-Reyes A, Biete A, Fernandez-Checa J C. Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42(1): 191-203.
- Moras D, Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(3): 384-391.
- Nakajima Y, Ikeda M, Kimura T, Honma S, Ohmiya Y, Honma K. Bidirectional role of orphan nuclear receptor RORalpha in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett* 2004; 565(1-3): 122-126.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin J M, Lefoulon F, Fauchere J L, Delagrangre P, Canet E, Boutin J A. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 2000; 275(40): 31311-31317.
- Nosjean O, Nicolas J P, Klupsch F, Delagrangre P, Canet E, Boutin J A. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(11): 1369-1379.
- Osborne N N, Chidlow G. The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye. *Exp Eye Res* 1994; 59(1): 3-9.
- Ouyang H, Vogel H J. Melatonin and serotonin interactions with calmodulin: NMR, spectroscopic and biochemical studies. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1383(1): 37-47.
- Ozaki Y, Lynch H J. Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. *Endocrinology* 1976; 99(2): 641-644.
- Pandi-Perumal S R, Trakht I, Srinivasan V, Spence D W, Maestroni G J, Zisapel N, Cardinali D P. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008; 85(3): 335-353.
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter R J, Ruggiero F M. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res* 2010; 48(4): 297-310.
- Paredes S D, Korkmaz A, Manchester L C, Tan D X, Reiter R J. Phytomelatonin: a review. *J Exp Bot* 2009; 60(1): 57-69.
- Peyrot F, Fernandez B O, Bryan N S, Feelisch M, Ducrocq C. N-Nitroso products from the reaction of indoles with Angeli's salt. *Chem Res Toxicol* 2006; 19(1): 58-67.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55(15): L271-L276.
- Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* 1995; 30(3-4): 213-227.
- Poeggeler B. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention, and therapy. *Endocrine* 2005; 27(2): 201-212.
- Poeggeler B, Cornelissen G, Huether G, Hardeland R, Jozsa R, Zeman M, Stebelova K, Olah A, Bubenik G, Pan W, Otsuka K, Schwartzkopff O, Bakken E E, Halberg F. Chronomics affirm extending scope of lead in phase of duodenal vs. pineal circadian melatonin rhythms. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 1: S220-S224.

- Qi W, Reiter R J, Tan D X, Manchester L C, Siu A W, Garcia J J. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. *J Pineal Res* 2000; 29(1): 54-61.
- Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F, Vaziri N D, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(2): F336-F344.
- Raikhlin N T, Kvetnoi I M. [5-Methoxy-N-acetyltryptamine (melatonin) in enterochromaffin cells]. *Tsitologiya* 1975; 17(9): 1047-1050.
- Raikhlin N T, Kvetnoy I M, Tolkachev V N. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* 1975; 255(5506): 344-345.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22(3): 659-661.
- Reiter R J. The melatonin message: duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci* 1987; 40(22): 2119-2131.
- Reiter R J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991a; 79(1-3): C153-C158.
- Reiter R J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991b; 12(2): 151-180.
- Reiter R J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9(7): 526-533.
- Reiter R J, Paredes S D, Manchester L C, Tan D X. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; 44(4): 175-200.
- Reiter R J, Richardson B A, Matthews S A, Lane S J, Ferguson B N. Rhythms in immunoreactive melatonin in the retina and Harderian gland of rats: persistence after pinealectomy. *Life Sci* 1983; 32(11): 1229-1236.
- Reiter R J, Tan D X. Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 957: 341-344.
- Reiter R J, Tan D X. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res* 2003; 34(1): 79-80.
- Reiter R J, Tan D X, Manchester L C, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34(2): 237-256.
- Reiter R J, Tan D X, Mayo J C, Sainz R M, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50(4): 1129-1146.
- Reppert S M, Godson C, Mahle C D, Weaver D R, Slaugenhaupt S A, Gusella J F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(19): 8734-8738.
- Reppert S M, Weaver D R, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; 13(5): 1177-1185.
- Roca A L, Godson C, Weaver D R, Reppert S M. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology* 1996; 137(8): 3469-3477.
- Roseboom P H, Coon S L, Baler R, McCune S K, Weller J L, Klein D C. 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(7): 3033-3045.

- Roseboom P H, Klein D C. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 1995; 47(3): 439-449.
- Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra C A, Carrascosa-Salmoral M P, Naranjo M C, Gomez-Corvera A, Caballero B, Guerrero J M. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol* 2009; 44(5): 328-334.
- Sandstrom B E, Marklund S L. Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide. *Biochem J* 1990; 271(1): 17-23.
- Sashihara S, Felts P A, Waxman S G, Matsui T. Orphan nuclear receptor ROR alpha gene: isoform-specific spatiotemporal expression during postnatal development of brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 42(1): 109-117.
- Scher J, Wankiewicz E, Brown G M, Fujieda H. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(3): 889-897.
- Screaton R A, Conkright M D, Katoh Y, Best J L, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates J R, III, Takemori H, Okamoto M, Montminy M. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 2004; 119(1): 61-74.
- Seltzer A, Viswanathan M, Saavedra J M. Melatonin-binding sites in brain and caudal arteries of the female rat during the estrous cycle and after estrogen administration. *Endocrinology* 1992; 130(4): 1896-1902.
- Silver I, Erecinska M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol* 1998; 454: 7-16.
- Sjoblom M, Safsten B, Flemstrom G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284(6): G1034-G1044.
- Slaugenhaupt S A, Roca A L, Liebert C B, Altherr M R, Gusella J F, Reppert S M. Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics* 1995; 27(2): 355-357.
- Slominski A, Fischer T W, Zmijewski M A, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, Slominski R M, Tobin D J. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 2005; 27(2): 137-148.
- Slominski A, Pisarchik A, Wortsman J. Expression of genes coding melatonin and serotonin receptors in rodent skin. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1680(2): 67-70.
- Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B, Tobin D J, Kauser S, Wortsman J. Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J Cell Physiol* 2003; 196(1): 144-153.
- Slominski A, Tobin D J, Zmijewski M A, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19(1): 17-24.
- Slominski R M, Reiter R J, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom R S, Slominski A T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012.
- Smirnov A N. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66(1): 19-26.
- Snyder S H, AXELROD J, FISCHER J E, Wurtman R J. NEURAL AND PHOTIC REGULATION OF 5-HYDROXYTRYPTOPHAN DECARBOXYLASE IN THE RAT PINEAL GLAND. *Nature* 1964; 203: 981-982.
- Sotak M, Mrnka L, Pacha J. Heterogeneous expression of melatonin receptor MT1

- mRNA in the rat intestine under control and fasting conditions. *J Pineal Res* 2006; 41(2): 183-188.
- Stankov B, Biella G, Panara 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(4): 2152-2159.
- Stebelova K, Zeman M, Cornelissen G, Bubenik G, Jozsa R, Hardeland R, Poeggeler B, Huether G, Olah A, Nagy G, Csernus V, Kazsaki J, Pan W, Otsuka K, Bakken E E, Halberg F. Chronomics reveal and quantify circadian rhythmic melatonin in duodenum of rats. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 1: S209-S212.
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, Liebmann P M. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; 30(4): 243-247.
- Stehle J H, Foulkes N S, Molina C A, Simonneaux V, Pevet P, Sassone-Corsi P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 1993; 365(6444): 314-320.
- Stehle J H, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebesteny T, Maronde E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res* 2011; 51(1): 17-43.
- Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen J P, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1995; 270(13): 7037-7040.
- Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N, Daniel H, Crepel F, Mariani J, Sotelo C, Becker-Andre M. staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(7): 3960-3965.
- Sugiyama K, Sugiura K, Hara T, Sugimoto K, Shima H, Honda K, Furukawa K, Yamashita S, Urano T. Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene* 2002; 21(20): 3103-3111.
- Sundvold H, Lien S. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287(2): 383-390.
- Szmuskowicz AW and Heinzelman RV. Synthesis of N-acetylmethoxytryptamine. *J Org Chem* 1960; 25: 287.
- Takemori H, Kajimura J, Okamoto M. TORC-SIK cascade regulates CREB activity through the basic leucine zipper domain. *FEBS J* 2007; 274(13): 3202-3209.
- Takemori H, Katoh Y, Horike N, Doi J, Okamoto M. ACTH-induced nucleocytoplasmic translocation of salt-inducible kinase. Implication in the protein kinase A-activated gene transcription in mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 42334-42343.
- Tan D X, Chen L.D., Poeggeler B. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57-60.
- Tan D X, Manchester L C, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo J C, Sainz R M, Reiter R J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* 2003; 34(1): 75-78.
- Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Plummer B F, Hardies L J, Weintraub S T, Vijayalaxmi, Shepherd A M. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo

- hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(3): 614-620.
- Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Plummer B F, Limson J, Weintraub S T, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(11): 1177-1185.
- Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Qi W, Hanes M.A., Farley N.J. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 1999; 65: 2523-2529.
- Tan D X, Manchester L C, Terron M P, Flores L J, Reiter R J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; 42(1): 28-42.
- Thomson P A, Wray N R, Thomson A M, Dunbar D R, Grassie M A, Condie A, Walker M T, Smith D J, Pulford D J, Muir W, Blackwood D H, Porteous D J. Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Mol Psychiatry* 2005; 10(5): 470-478.
- Tremblay A, Tremblay G B, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 1999; 3(4): 513-519.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(7-8): 838-847.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
- Vanecek J. The melatonin receptors in rat ontogenesis. *Neuroendocrinology* 1988; 48(2): 201-203.
- Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78(3): 687-721.
- Venegas C, Garcia J A, Escames G, Ortiz F, Lopez A, Doerrier C, Garcia-Corzo L, Lopez L C, Reiter R J, Acuna-Castroviejo D. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 2012; 52(2): 217-227.
- Viswanathan M, Laitinen J T, Saavedra J M. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(16): 6200-6203.
- Vlahakes G J, Wurtman R J. A Mg²⁺ dependent hydroxyindole O-methyltransferase in rat Harderian gland. *Biochim Biophys Acta* 1972; 261(1): 194-197.
- Wiesenberg I, Missbach M, Carlberg C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci* 1998; 12(2-3): 143-150.
- Wilson T E, Mouw A R, Weaver C A, Milbrandt J, Parker K L. The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 1993; 13(2): 861-868.
- Withyachumnarnkul B, Limpanawattanukul M, Trakulrunsi W. Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after 3H-melatonin administration. *Life Sci* 1986; 38(19): 1757-1765.
- Zang L Y, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1425(3): 469-477.

Zawilska J B, Berezinska M, Rosiak J, Skene D J, Vivien-Roels B, Nowak J Z. Suppression of melatonin biosynthesis in the chicken pineal gland by retinally perceived light - involvement of D1-dopamine receptors. *J Pineal Res* 2004; 36(2): 80-86.

Zawilska J B, Derbiszewska T, Nowak J Z. Clozapine and other neuroleptic drugs antagonize the light-evoked suppression of melatonin biosynthesis in chick retina: involvement of the D4-like dopamine receptor. *J Neural Transm Gen Sect* 1994; 97(2): 107-117.

Zawilska J B, Nowak J Z. Does D4 dopamine receptor mediate the inhibitory effect of light on melatonin biosynthesis in chick retina? *Neurosci Lett* 1994; 166(2): 203-206.

Zeman M, Jozsa R, Cornelissen G, Stebelova K, Bubenik G, Olah A, Poeggeler B, Huether G, Hardeland R, Nagy G, Czernus V, Pan W, Otsuka K, Halberg F. Chronomics: circadian lead of extrapineal vs. pineal melatonin rhythms with an infradian hypothalamic exploration. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 1: S213-S219.

Zhao H, Pang S F, Poon A M. Variations of mt1 melatonin receptor density in the rat uterus during decidualization, the estrous cycle and in response to exogenous steroid treatment. *J Pineal Res* 2002; 33(3): 140-145.

Anexos

Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations

Abstract: We studied the subcellular levels of melatonin in cerebral cortex and liver of rats under several conditions. The results show that melatonin levels in the cell membrane, cytosol, nucleus, and mitochondrion vary over a 24-hr cycle, although these variations do not exhibit circadian rhythms. The cell membrane has the highest concentration of melatonin followed by mitochondria, nucleus, and cytosol. Pinealectomy significantly increased the content of melatonin in all subcellular compartments, whereas luzindole treatment had little effect on melatonin levels. Administration of 10 mg/kg bw melatonin to sham-pinealectomized, pinealectomized, or continuous light-exposed rats increased the content of melatonin in all subcellular compartments. Melatonin in doses ranging from 40 to 200 mg/kg bw increased in a dose-dependent manner the accumulation of melatonin on cell membrane and cytosol, although the accumulations were 10 times greater in the former than in the latter. Melatonin levels in the nucleus and mitochondria reached saturation with a dose of 40 mg/kg bw; higher doses of injected melatonin did not further cause additional accumulation of melatonin in these organelles. The results suggest some control of extrapineal accumulation or extrapineal production of melatonin and support the existence of regulatory mechanisms in cellular organelles, which prevent the intracellular equilibration of the indolamine. Seemingly, different concentrations of melatonin can be maintained in different subcellular compartments. The data also seem to support a requirement of high doses of melatonin to obtain therapeutic effects. Together, these results add information that assists in explaining the physiology and pharmacology of melatonin.

Carmen Venegas^{1,2}, José A. García^{1,2}, Germaine Escames^{1,2}, Francisco Ortiz^{1,2}, Ana López^{1,2}, Carolina Doerrier^{1,2}, Laura García-Corzo^{1,2}, Luis C. López^{1,2}, Russel J. Reiter³ and Darío Acuña-Castroviejo^{1,2,4}

¹Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Granada, Spain; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain; ³Department of Cellular and Structural Biology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; ⁴Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Key words: brain, cytosol, liver, luzindole, melatonin, membrane, mitochondria, nucleus, pinealectomy, rat

Address reprint requests to Darío Acuña-Castroviejo, M.D., Ph.D., Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.
E-mail: dacuna@ugr.es

Received June 7, 2011;
Accepted July 29, 2011.

Introduction

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine, aMT) is a highly preserved molecule produced by most of the living organisms, including bacteria, macroalgae, plants, invertebrates, and mammals [1–3]. First isolated from the pineal gland [4], melatonin is now believed to be produced in a variety of other organs. Melatonin is synthesized from the amino acid tryptophan with the production of serotonin as an intermediate compound. The synthesis of melatonin is controlled by two main enzymes: *N*-acetyltransferase (NAT) and hydroxyindole-*O*-methyltransferase (HIOMT) (now known as acetylserotonin methyl transferase). Although NAT has been considered the rate-limiting enzyme in the synthesis of melatonin, there are now evidence supporting that HIOMT regulates its production under some circumstances [5].

The synthesis of pineal melatonin is strictly controlled by the light/dark cycle. The regulation is mediated through a multisynaptic pathway starting with the gan-

glion cells of the retina whose axons form the retinohypothalamic tract which projects to the suprachiasmatic nucleus. The information arrives at the pineal via peripheral postganglionic sympathetic fibers [6]. During darkness, norepinephrine released from the postganglionic sympathetic fibers binds to and activates both β - and α -adrenergic receptors in the membrane of the pinealocyte, increasing intracellular cAMP which in turn induces the transcription of NAT mRNA [7, 8]. During the day, light blunts the norepinephrine release to the pinealocyte, inhibiting NAT and melatonin production. This photoperiodic control of the pineal metabolic activity creates a day/night cycle in the melatonin synthesis as also reflected in the circadian rhythm of the blood melatonin levels. The day/night oscillation of melatonin in the blood represents a peripheral clock involved in the regulation of biological rhythms such as the sleep–wake cycle [9] and seasonal rhythms [10]. Besides its chronobiotic properties, melatonin is also a potent antioxidant and anti-inflammatory molecule [11–15].

Owing to its lipophilicity, melatonin crosses all biological barriers, acting on all subcellular compartments to prevent oxidative/nitrosative damage. Of note, melatonin is particularly important to maintain mitochondrial homeostasis [16–18]. The presence and effects of melatonin in the cell were initially thought to be related to its uptake from the blood. However, it has become apparent that many cells may have the enzymatic machinery also to produce melatonin [19]. Early indications of alternative sources of melatonin were shown by the presence of HIOMT in both the retina [20] and Harderian glands [21]. Melatonin was then identified in enterochromaffin cells of human intestinal mucosa, with concentrations of melatonin in the gastrointestinal tract more than 400 times higher than in the pineal gland, and 10–100 times higher than in plasma [22, 23]. Then, melatonin was found in the plasma and urine of pinealectomized rats [24]. Recently, the analysis of NAT and HIOMT mRNA expression using PCR revealed the existence of possible melatonin synthesis in a wide variety of tissues including thymus, spleen, heart, muscle, liver, stomach, intestine, placenta, testis, cerebral cortex, and striatum [19]. Most recently, melatonin in extrapineal tissue homogenates of thymus, spleen, liver, kidney, and heart has been measured [25]. The levels of melatonin in these tissues seem to be higher than the concentrations of indoleamine. Moreover, melatonin content in peripheral organs decreases with age, to a similar extent as the pineal melatonin production [26, 27].

Although preliminary studies have evaluated the subcellular distribution of extrapineal melatonin [28], the mechanism(s) that regulates its levels in subcellular organelle and whether its concentration varies with time of day are yet unknown. Thus, we examined the subcellular concentrations of melatonin and its daily distribution in rat liver and brain tissues in both normal and pinealectomized animals. Moreover, the participation of melatonin membrane receptors in the intracellular content of the indoleamine and the dose-dependent effects of melatonin on its subcellular accumulation were also analyzed.

Materials and methods

Reagents

Melatonin, EDTA- Na_2 , mannitol, EGTA, fatty acid-free BSA, and dithiothreitol (DTT) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Trichloromethane, sodium phosphate, acetonitrile, sucrose, and Tris-HCl were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Luzindole was purchased from Tocris (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA). All others reagents were of the highest purity available.

Animals and treatments

Three-month-old male Wistar rats were obtained from Harlan (Barcelona, Spain). They were housed in clear plastic cages and maintained under controlled photoperiods of 12:12-hr light/dark cycle (lights on at 7 hr) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and they were given regular chow and tap water, under the supervision of veterinarians. All experiments were

performed according to the Spanish Government Guide and the European Community Guide for animal care. Another group of animals was maintained at a continuous light regime for at least 7 days. The animals were grouped (six rats per group) as follows: (a) controls; (b) sham-pinealectomized (SPx) animals; (c) pinealectomized (Px) rats; and (d) continuous light-exposed (CL) animals; these rats were kept under CL for 5 days before tissue collections. The final group of rats (group e) was treated with the melatonin membrane receptor blocker, luzindole (LZ).

To study the circadian variations in the subcellular distribution of melatonin, groups of SPx and Px animals were sacrificed at 08:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00, 02:00, 04:00, and 06:00 hr under a 12:12 light/dark cycle. To test whether the pineal gland affects the subcellular distribution of exogenous melatonin, SPx, Px, and CL animals were i.p. injected with 10 mg/kg bw melatonin at 08:00 or 10:00 hr and sacrificed at 12:00 hr, i.e., 2 and 4 hr after the melatonin injection. Two additional groups of SPx animals were subjected to the same experimental protocol except for an injection of LZ at 07:30 hr. To study the dose-dependent effects of melatonin on the subcellular distribution of the indoleamine, groups of control rats were i.p. injected with 0, 10, 40, 100, or 200 mg/kg bw at 08:00 hr and sacrificed at 12:00 hr, i.e., 4 hr later. At night, the animals were sacrificed under red light.

Melatonin was dissolved in 20% 1,2-propanediol and injected intraperitoneally. LZ was dissolved in a water/ethanol 1:2 (v/v) and injected intraperitoneally at a dose of 4.5 mg/kg, 30 min prior melatonin administration. The pharmacokinetic study of plasma melatonin after i.p. administration of 10 mg/kg bw showed a half-life of 27 min (Fig. 1). Pinealectomy was performed after i.p. administration of 1 mL/kg bw equithesin anesthesia [29], and the animals were studied 5 days later. The greater reduced circulating melatonin levels after Px or CL are shown in the Fig. 2. At the end of experiments, rats were anesthetized with chloroform, and blood samples were

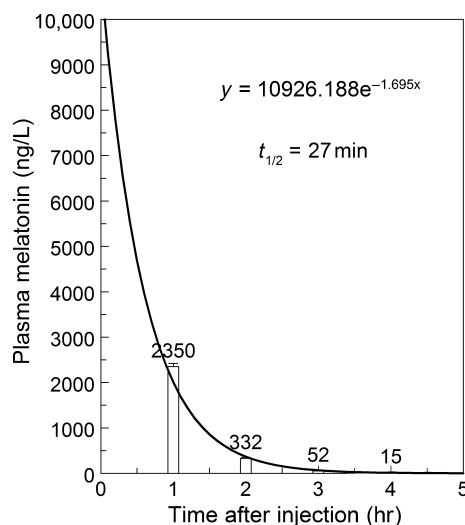


Fig. 1. Pharmacokinetics of plasma melatonin after an intraperitoneal injection of 10 mg/kg bw.

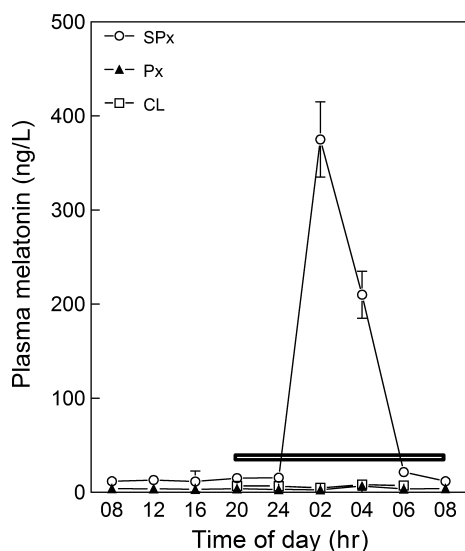


Fig. 2. Levels of plasma melatonin in sham-pinealectomized (SPx), pinealectomized (Px), and continuous light-exposed rats. Black bar indicates the dark period.

obtained via cardiac puncture. Then, the brain and liver were immediately removed, washed in cold saline, and stored at -80°C until their use. These procedures were performed under red light in those animals sacrificed at night. Blood samples were centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C , and plasma was frozen at -80°C for the determination of melatonin.

Isolation of pure mitochondria, nuclei, and cytosol from cerebral cortex and liver

Brain cerebral cortices and livers were washed with the corresponding extraction buffers A (10 mM Tris-HCl, 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA- K_2 , pH 7.4) and B (5 mM Hepes, 250 mM mannitol, 0.5 mM EGTA- K_2 , and 0.1% fatty acid-free BSA, pH 7.4), respectively. The tissues were minced with scissors, homogenized with the respective extraction buffer at 800 rpm with a Teflon pestle, and filtered.

Cerebral cortex was processed as follows: the filtered homogenate was centrifuged at 1330 g for 3 min at 4°C , and the pellet was resuspended in 0.5 mL extraction buffer A and centrifuged again in the same conditions. The pellet of this second centrifugation is used for nuclei preparation. Meanwhile, the supernatants of both centrifugations were mixed and centrifuged at 21,200 g for 10 min at 4°C . The supernatant of this step was used for cytosol preparation, whereas the mitochondrial pellet was suspended in 0.85 mL extraction buffer A containing 15% Percoll, poured into ultracentrifuge tubes containing a Percoll gradient formed by 1 mL 40% Percoll and 1 mL 23% Percoll in buffer A, and centrifuged at 22,500 g for 8 min at 4°C . Pure mitochondria, corresponding to the fraction between 23% and 40% Percoll, were collected, washed with buffer A, and centrifuged at 16,700 g for 10 min at 4°C . The pellet was washed again and centrifuged at 6900 g for 10 min at 4°C to remove any excess of Percoll, and the final pellet containing pure brain mitochondria was frozen at -80°C .

Rat liver was processed as follows: the homogenate was centrifuged at 600 g for 5 min at 4°C (twice). The pellet of the second centrifugation is used for nuclei preparation. Meanwhile, the supernatants of both centrifugations were mixed and centrifuged at 10,300 g for 10 min at 4°C . The supernatant of this step was used for cytosol preparation, whereas the mitochondrial pellets were suspended in 0.5 mL buffer B and poured into ultracentrifuge tubes containing 1.4 mL buffer C (225 mM mannitol, 1 mM EGTA, 25 mM Hepes, and 0.1% BSA) and 0.6 mL Percoll. The mixture was centrifuged at 105,000 g for 30 min at 4°C (Optima L-90K ultracentrifuge; Beckman Coulter, Madrid, Spain), and the fraction corresponding to the pure mitochondrial fraction was collected, washed with buffer B, and centrifuged at 10,300 g for 10 min at 4°C (Avanti 30; Beckman Coulter). The pellets were washed and centrifuged again at 6300 g for 10 min at 4°C to remove the Percoll and frozen at -80°C .

The pellets resulting from the second centrifugation during cerebral cortex or liver processing were resuspended in 3 mL buffer D (10 mM Tris-HCl, 3 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 0.3 M sucrose, 0.15% Triton X-100, pH 8); these were poured into tubes containing 3 mL buffer D plus 0.4 M sucrose and centrifuged at 2500 g for 10 min at 4°C . The resulting nuclear pellet was gently resuspended, without vortexing, in 1 mL of buffer A, centrifuged once again, and frozen at -80°C .

The supernatants resulting from the third centrifugation were used to obtain the cytosol fraction. These supernatants were centrifuged at 100,000 g for 1 hr (Optima L-90K ultracentrifuge; Beckman Coulter) and stored at -80°C .

Isolation of pure cell membranes from cerebral cortex and liver

Pieces from cerebral cortex and liver were washed in 1 mM NaHCO_3 buffer, pH 8, minced with scissors, homogenized in the same buffer at 800 rpm with a Teflon pestle, diluted to 8.1 mL with NaHCO_3 , and filtered. The filtered homogenates were centrifuged at 1500 g for 15 min at 4°C (Beckman Avanti 30 centrifuge, Madrid, Spain), resuspended in 1.8 mL 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 71% (w/v) sucrose, and stirred for 15 min. An aliquot of this suspension (0.45 mL) was transferred to ultracentrifuge tubes, at which were successively added 0.53 mL of 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing 53% (w/v) sucrose, 0.53 mL of 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing 42% (w/v) sucrose and, finally, 0.53 mL of a 0.25 M sucrose solution. These tubes were centrifuged at 100,000 g for 1 hr at 4°C (Optima L-90K ultracentrifuge; Beckman Coulter), to obtain the pure membrane fraction corresponding to the band between 42% and 53%, which was frozen at -80°C [30].

Determination of melatonin by HPLC

Melatonin in plasma and subcellular fractions was determined by HPLC with fluorescence detection following a method described elsewhere [31]. For plasma, 500 μL was extracted with 1 mL trichloromethane. The mixture was vortexed for 1 min at 1400 rpm and then centrifuged for

1 min at 5000 g. Aqueous phase was removed, and the organic phase was washed thrice with 500 μ L 50 mM NaHCO₃, pH 10.25. Finally, 500 μ L of sample was evaporated to dryness (Speed Vac System; Fisher Scientific, Madrid, Spain) for 33 min (SPD 2010 SpeedVac System; Fisher Scientific) at a vacuum pressure of 5.1 Torr, and the dry extracts obtained were frozen at -80°C until melatonin assay. On the day of the assay, dry extracts were resuspended in 100 μ L of mobile phase consisting of 100 mM sodium phosphate, 0.1 mM EDTA, and 25% acetonitrile.

Subcellular frozen samples from cerebral cortex and liver were thawed and sonicated in PBS, pH 7.4, and centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C . Aliquots of the supernatants were frozen at -80°C for protein determination or mixed (500 μ L) with 1 mL chloroform, shaken for 20 min, and centrifuged at 9000 g for 10 min at 4°C . The organic phase was washed twice with 0.05 M Na₂CO₃ buffer, pH 10.25, and 500 μ L of the samples was evaporated to dryness in a SPD 2010 SpeedVac System (Fisher Scientific). The residue was then dissolved in 100 μ L of mobile phase.

Plasma and tissue content of melatonin was then measured by HPLC (Shimadzu Europe GmbH, Duisburg, Germany) with a 150×4.5 mm Waters Sunfire C18 5 μ m column (Waters Chromatography, Barcelona, Spain). After stabilizing the column with the mobile phase, samples (20 μ L) were injected onto the HPLC system at a 1-mL/min flow rate, with 5-fluorotryptamine as internal standard, and the fluorescence of melatonin was measured in a fluorescence detector (Shimadzu RF-10A XL fluorescence detector) with an excitation and emission wavelength of 285 and 345 nm, respectively. Retention time was 8.9 min. A standard curve for melatonin was constructed with 4.45, 8.9, 17.9, 35.9, 71.6, and 143.2 ng/L, and the concentration of melatonin in the samples was calculated according to the peak area. Melatonin levels were expressed in nanogram per liter. 5-Fluorotryptamine was used as an internal

standard [32]. Protein levels were measured by Bradford method [33].

Statistical analysis

Data are expressed as the means \pm S.E.M. of six determinations. One-way ANOVA with a post-test was used. Cosinor analysis was performed with the Time Series Analysis-Serial Cosinor 6.3 Lab View software (TSASC 6.3; Expert Soft Technologie Inc, BioMedical Computing and Applied Statistics Laboratory, Evres, France). The level of statistical significance was taken as $P < 0.05$.

Results

Daily changes in the subcellular concentration of melatonin in the cerebral cortex are shown in Fig. 3. Although cosinor analysis did not reveal a significant circadian rhythm of melatonin, its levels oscillated over the 24-hr period. In mitochondria, SPx animals showed the highest melatonin levels throughout the 24-hr period. This was followed by membranes and nuclei, whereas the cytosol content of melatonin was the lowest. In general, Px produced an increase in melatonin content in these fractions, mainly in membranes ($P < 0.001$), with lower rises in mitochondria and nuclei. In liver, melatonin levels also did not exhibit a circadian rhythm, and they showed a different pattern of change (Fig. 4). In this tissue, the content of melatonin was higher in membrane than in mitochondria or nuclei, both of which had similar levels; the lowest concentration of melatonin was found in the cytosol. Px also increased the subcellular concentrations of melatonin in liver, mainly in membranes, cytosol, and nuclei ($P < 0.001$), and to a minor extent, in mitochondrion. Mean hepatic levels of melatonin over a 24-hr period in the different subcellular fractions are shown in Table 1. It is seen that the overall

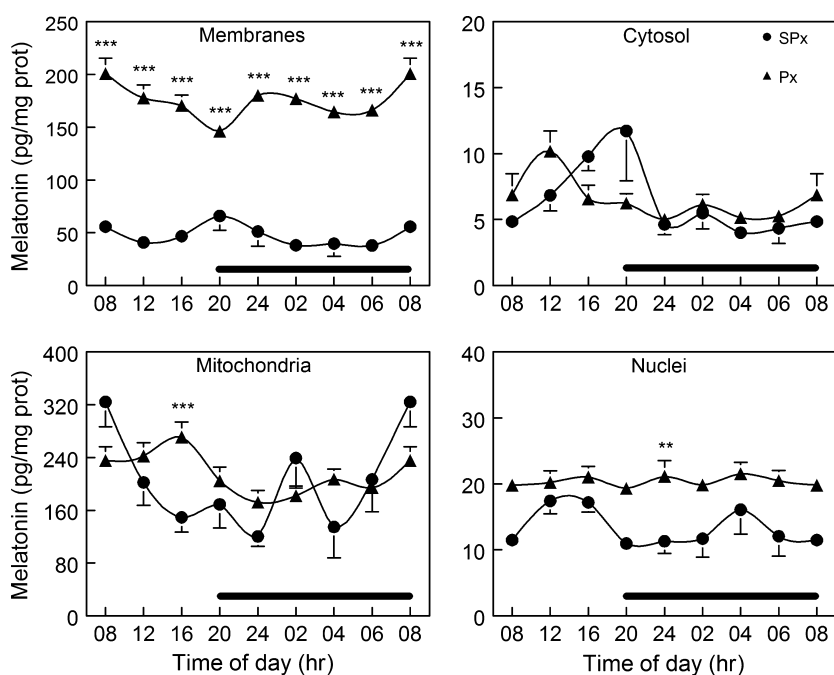


Fig. 3. Daily changes in the melatonin levels of membranes, cytosol, mitochondria, and nuclei of rat cerebral cortex of sham-pineactomized (SPx) and Px rats. Animals were maintained in a 12:12-hr cycle and sacrificed at the indicated hours. Black bar indicates the dark period. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus SPx.

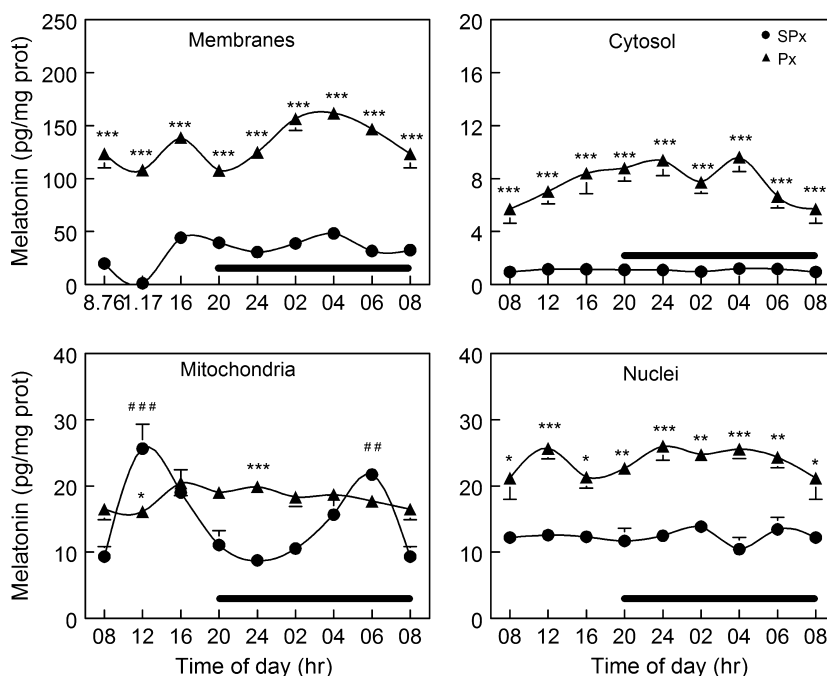


Fig. 4. Daily changes in the melatonin content of membranes, cytosol, mitochondria, and nuclei of rat liver of sham-pinelectomized (SPx) and Px rats. Animals were maintained in a 12:12-hr cycle and sacrificed at the indicated hours. Black bar indicates the dark period. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus SPx.

Table 1. Mean melatonin concentrations over a 24-hr cycle in the subcellular fractions studied

Tissue	SPx	Px
Brain		
Membranes	48.01 \pm 3.27	176.09 \pm 5.77*
Cytosol	6.27 \pm 0.9	6.46 \pm 0.52
Mitochondria	207 \pm 25.3	216 \pm 10.6
Nuclei	13.31 \pm 0.91	20.31 \pm 0.25*
Liver		
Membranes	37.76 \pm 2.09	132.38 \pm 6.58*
Cytosol	1.09 \pm 0.03	7.67 \pm 0.5*
Mitochondria	14.57 \pm 2.08	18.14 \pm 0.52
Nuclei	12.36 \pm 0.32	23.64 \pm 0.68*

SPx, sham-pinelectomy; Px, pinealectomy.

Data are expressed as means \pm S.E.M. * $P < 0.001$ versus SPx.

melatonin content significantly increased in membrane and nuclei in cerebral cortex and in all subcellular fractions in liver after Px. The largest increase in melatonin owing to Px was seen in liver cell membranes.

Fig. 5 shows the changes in the subcellular melatonin levels in the cerebral cortex induced by different manipulations. In all cases, the individual bars represent the levels of melatonin measured at 12:00 hr, i.e., 2 hr after vehicle or melatonin administration. Px ($P < 0.001$) and, to a lesser extent, CL ($P < 0.01$), increased melatonin levels in membranes, but not in the other subcellular fractions in vehicle-treated rats. After the administration of 10 mg/kg bw melatonin, melatonin values increased significantly in SPx, CL, and, specially, in Px rats ($P < 0.001$). Pretreatment with LZ did not alter melatonin levels in Px rats. Similar changes after melatonin treatment were found in the cytosol. Interestingly, mitochondria and nuclei behaved differently. Neither Px nor CL influenced the levels of melatonin in these fractions in vehicle-treated animals. Treatment with melatonin, however, increased its levels at

the same extent in SPx, Px, CL, and LZ groups ($P < 0.001$). In the case of liver (Fig. 6), Px and CL increased the melatonin levels in membranes and cytosol, as in the cerebral cortex, whereas Px also elevated nuclear melatonin levels ($P < 0.05$). In these fractions, melatonin administration (10 mg/kg bw) also increased its levels in all groups of rats ($P < 0.001$), whereas LZ pretreatment did not modify the effects of melatonin administration. In general, changes in cytosolic melatonin levels after its administration were similar to those described for the cerebral cortex cytosol. Changes in melatonin in liver mitochondria and nuclei were almost identical to those detected in the same brain subcellular fractions, i.e., melatonin treatment induced parallel rises in these fractions in SPx, Px, CL, and LZ groups ($P < 0.001$). A similar change was obtained in all groups at 4 hr after melatonin injection (Table 2). Again, the data represent the levels of melatonin found at 12:00 hr. In this case, however, animals were injected with melatonin at 08:00 hr and sacrificed 4 hr later.

To analyze the relationships between extracellular and intracellular melatonin levels, groups of control rats were injected i.p. with 0, 10, 40, 100, and 200 mg/kg bw melatonin at 08:00 hr and sacrificed 4 hr later. Fig. 7 shows the dose-response effects of melatonin injection in terms of the subcellular distribution in rat cerebral cortex. Cell membranes show a dose-dependent increase in melatonin concentration, reaching 10 times higher levels than in the cytosol. Moreover, whereas 10 mg/kg bw of melatonin significantly elevated the melatonin content in membranes ($P < 0.01$), cytosolic concentrations of melatonin did not change after the administration of 40 mg/kg bw melatonin ($P < 0.001$). Interestingly, mitochondria and nuclei show a saturation component: melatonin content in these compartments increased after the injection of 10 mg/kg bw melatonin ($P < 0.001$), but additional doses of the

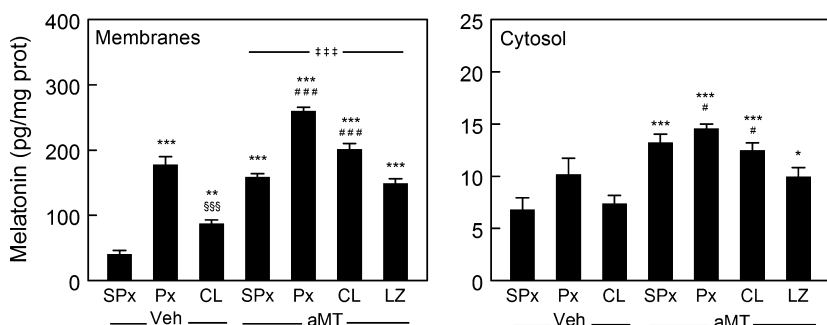


Fig. 5. Effects of Px, continuous light-exposed (CL), or luzindole (LZ) treatment on the cerebral cortical subcellular distribution of melatonin. Rats were sacrificed at 12:00 hr and injected with vehicle (sham-pinelectomized, SPx, Px, and CL), or melatonin (SPx, Px, CL, LZ) 2 hr earlier. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus SPx; # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ versus vehicle groups; \$\$\$ $P < 0.001$ versus Px.

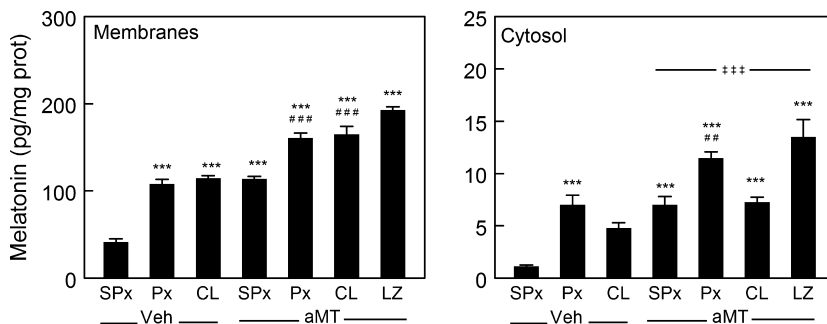
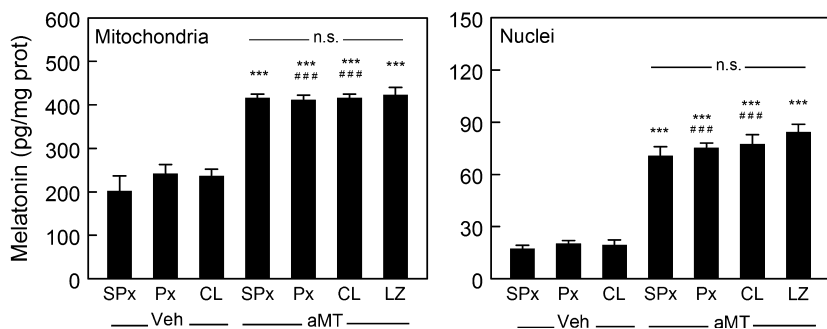
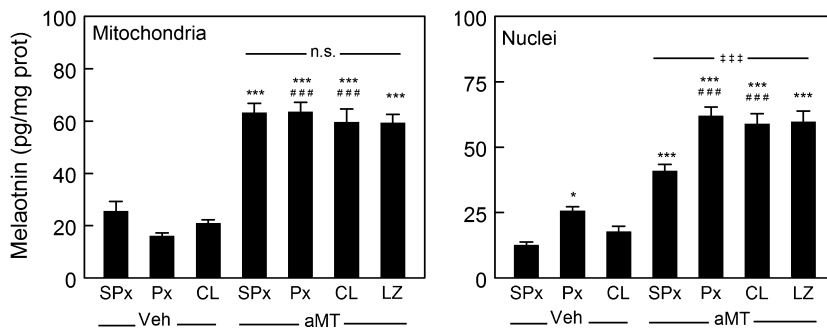


Fig. 6. Effects of Px, continuous light-exposed (CL), or luzindole (LZ) treatment on the liver subcellular distribution of melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine). Rats were sacrificed at 12:00 hr and injected with vehicle (Veh) (sham-pinelectomized, SPx, Px, and CL), or melatonin (SPx, Px, CL, LZ) 2 hr earlier. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus SPx; ## $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ versus vehicle groups.



indoleamine up to 200 mg/kg bw did not further increase the levels of melatonin in these cellular fractions. Similar pattern of behavior was found in liver (Fig. 8). Cellular membranes concentrate melatonin up to 10 times more than cytosol, whereas mitochondria and nuclei display comparable saturation mechanisms.

Discussion

The initial analysis of the results reveals new important aspects of melatonin physiology and pharmacology, which

can be summarized as follows: (i) the existence of different subcellular distributions of melatonin; (ii) an absence of circadian fluctuations in the intracellular melatonin; (iii) the presence of a constitutive inhibition of intracellular melatonin production by pineal melatonin; (iv) the lack of effects of membrane melatonin receptors MT1/MT2 on subcellular distribution of the indoleamine; (v) a greater capacity of cellular membranes to concentrate melatonin, thereby presumably controlling its access to the cell; and (vi) the existence of additional specific regulatory mechanisms in mitochondria and nuclei preventing the full access

Table 2. Subcellular distribution of melatonin 4 hr after the injection of 10 mg/kg melatonin intraperitoneally

	SPx	Px	CL	Melatonin			
				SPx	Px	CL	LZ
Brain							
Membranes	40.84 ± 5.66	177.77 ± 12.42	87.60 ± 5.42	124.34 ± 3.27	193.85 ± 4.83	149.92 ± 5.97	118.27 ± 3.34
Cytosol	6.88 ± 1.11	10.17 ± 1.55	7.39 ± 0.77	9.09 ± 0.57	11.30 ± 0.40	8.78 ± 0.43	7.39 ± 0.28
Mitochondria	202 ± 34.8	242 ± 20.4	237 ± 15.3	311 ± 6.1	315 ± 4.3	328 ± 13.7	323 ± 7.7
Nuclei	17.42 ± 1.92	20.22 ± 1.74	19.55 ± 2.87	46.34 ± 2.38	59.31 ± 2.69	59.83 ± 3.98	57.24 ± 1.77
Liver							
Membranes	41.80 ± 3.81	107.99 ± 5.13	114.38 ± 3.10	75.62 ± 2.79	134.46 ± 4.08	129.07 ± 4.02	156.73 ± 3.46
Cytosol	1.15 ± 0.13	7.02 ± 0.91	4.80 ± 0.51	4.26 ± 0.20	9.90 ± 0.61	5.65 ± 0.31	6.36 ± 0.64
Mitochondria	17.55 ± 5.99	16.11 ± 1.07	20.39 ± 3.18	39.97 ± 1.73	49.32 ± 2.63	42.32 ± 2.59	43.21 ± 0.88
Nuclei	12.58 ± 1.21	25.67 ± 1.58	17.72 ± 2.04	24.96 ± 1.86	36.01 ± 1.84	38.68 ± 3.88	38.18 ± 2.36

SPx, sham-pinealectomy; Px, pinealectomy; CL, continuous light exposure; LZ, luzindole treatment. Values are expressed as the mean ± S.E.M.

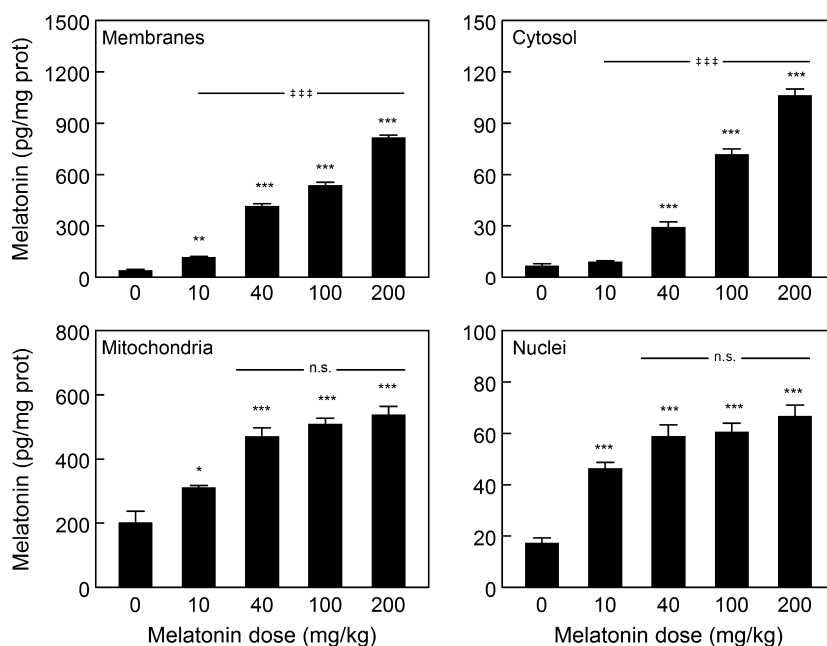


Fig. 7. Dose-dependent changes in the subcellular distribution of melatonin in rat cerebral cortex. Control rats were i.p. injected with either vehicle (0) or 10, 40, 100, and 200 mg/kg bw melatonin at 10:00 hr and sacrificed 2 hr later. * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, and *** $P < 0.001$ versus 0.

of melatonin to these organelles. Together, these data suggest that although biological membranes are permeable to melatonin, the indoleamine does not fully equilibrate within subcellular organelles, and specific mechanisms may regulate the amount of melatonin that can reach each subcellular compartment. The existence of these regulatory mechanisms reinforces the importance of melatonin in the biology of the cell, and it seems also to explain why high doses of melatonin are required to obtain sufficiently high intracellular levels for therapeutic purposes.

These results document the absence of circadian rhythms of extrapineal melatonin. Although there are fluctuations in melatonin concentrations over a 24-hr period in the different subcellular fractions, cosinor analysis indicated these rhythms were not circadian in nature. These data, together with the high concentration of intracellular versus extracellular melatonin, indicated that extrapineal melatonin functions different from the known pineal melatonin

message [34]. These results are consistent with others that report the levels of this indoleamine in nuclei and mitochondria may be higher than in plasma [28, 35, 36]. In addition, we also show here that subcellular melatonin concentrations further increased after Px, suggesting that the extrapineal melatonin production, i.e., in liver and brain, is constitutively inhibited by circulating melatonin of pineal origin. Further support of this observation was the finding that CL rats, a treatment that inhibits the pineal melatonin production [37, 38], also increase the intracellular levels of melatonin. Analysis of the NAT and HIOMT activities and/or expression will be necessary to assess whether intracellular synthesis of melatonin varies with these manipulations.

The current subcellular distribution studies revealed significant differences among the different compartments studied. In brain cerebral cortex, melatonin levels were higher in mitochondria, followed by membranes, nuclei,

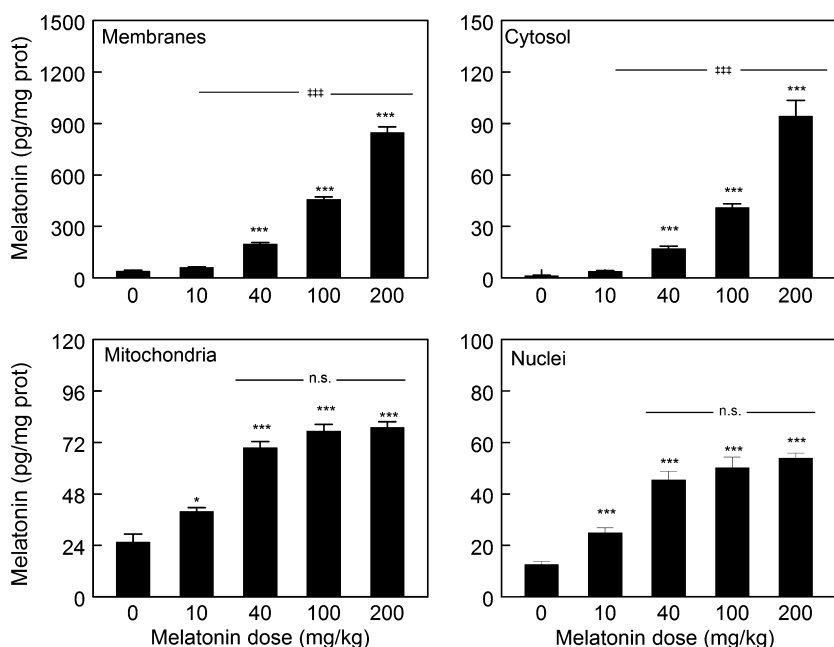


Fig. 8. Dose-dependent changes in the subcellular distribution of melatonin in rat liver. Control rats were i.p. injected with either vehicle (0) or 10, 40, 100, and 200 mg/kg bw melatonin at 10:00 hr and sacrificed 2 hr later. * $P < 0.05$, and *** $P < 0.001$ versus 0.

and cytosol. These differences appeared also in Px animals, although in this case, the levels of melatonin increased mainly in cell membranes. In liver, maximal amounts of melatonin were identical in cell membranes, followed by mitochondria, nuclei, and cytosol. Px again increased melatonin in all subcellular structures. Similar observations have been made on the thymus, where the melatonin levels of SPx rats were lower than those in Px animals [39], although in this case, the subcellular distribution of melatonin was not determined.

The different distribution of melatonin may be related to specific functions in the cell. The brain has a high energy demand; thus, it uses 20% of total oxygen consumed, but it is only 2% of the body weight [40]. This feature reflects a high mitochondrial metabolic rate which in turn yields highly elevated reactive oxygen species (ROS) production [41–43]. Free radicals are especially dangerous in the brain because it has high concentrations of polyunsaturated fatty acids [44] and elevated levels of transition metals such as iron, which is involved in the generation of hydroxyl radicals [45]. These conditions, together with a low levels of cytosolic antioxidants [46, 47], make the brain excessively vulnerable to oxidative damage.

The presence of high concentrations of melatonin in brain mitochondria may reflect the homeostatic control of mitochondrial function by the indoleamine, improving their bioenergetic efficacy and reducing their production of ROS [16, 18, 41–44, 48, 49]. The elevated amount of melatonin may depend on a cellular adaptation to brain energy demand, allowing the use of large amount of oxygen; by contrast, the susceptibility of neurons and glia to oxidative damage is known to be prevented by melatonin [50–52].

In the case of liver, melatonin distributes homogeneously along the subcellular compartments, although mitochondrial content significantly increases at morning and evening, coinciding with the metabolic activity of the liver. These hepatic peaks of melatonin may be associated with the

circadian control of the hepatic metabolic activity [53]. This hypothesis may be further supported by the observation that Px blunted these oscillations of melatonin.

As Px induces an accumulation of melatonin in cell membranes, we asked whether exogenous melatonin may also be accumulated in these structures. After the administration of 10 mg/kg bw, brain and liver cell membranes accumulated much of the circulating melatonin. Px, or CL exposure, both of which reduce significantly pineal melatonin production and thus, circulating melatonin [10], increased the amount of melatonin in these cell membranes in both vehicle- and melatonin-injected rats. Thus, it seems that the absence of circulating pineal melatonin modifies some feature of cell membrane enhancing its capacity to take up melatonin. Interestingly, LZ had little effect on these changes in melatonin, suggesting that MT1/MT2 membrane receptors of melatonin do not actively participate in the accumulation of melatonin by cell membranes. After melatonin administration, its concentration also increased in the cytosol, mitochondria, and nuclei, doubling the basal levels. These changes were generally independent of whether the animals were pinealectomized, subjected to continuous light, or treated with LZ. Thus, it seems that cell membranes act as a reservoir for melatonin, limiting the amount of melatonin available to the cell. The mechanism underlying these properties of the cell membrane remains unknown but probably may depend on specific membrane transporters.

We next asked whether the capacity of brain and liver cell membranes to retain melatonin could be saturated at high extracellular levels of the indoleamine, thus disrupting the homeostatic mechanism and allowing the free entry of melatonin into the cell. To address this question, rats were injected with different doses of melatonin 4 hr before their sacrifice. Our results show a dose-dependent accumulation of melatonin by the cell membranes, with no apparent saturation mechanism even at the highest dose used. At this

dose, i.e., 200 mg/kg bw, the amount of melatonin in cell membranes increased 20 times compared with their basal levels. Under these conditions, however, melatonin levels in mitochondria and nuclei increased only threefold, whereas in cytosol, melatonin concentration increased 15-fold. Hence, cytosolic concentrations of melatonin reached a final level 10 times lower than in cell membranes. These kinetic changes in cellular melatonin content were similar in both cerebral cortex and liver tissues. The interaction of melatonin with cell membranes has been evaluated, and it was suggested that it could easily scavenge both aqueous and lipophilic radicals [54]. The accumulation of melatonin in cell membranes reported in our data further supports this activity of the indoleamine, giving an *in situ* protection against free radical attack.

Another interesting observation was that at the dose of 40 mg/kg bw, the concentration of melatonin in mitochondria and nuclei of cerebral cortex and liver reached their maximal value. These findings were surprising because, to our knowledge, the amphiphilic properties of melatonin allowed it to cross all cell barriers, equilibrating on both sides [9]. In the light of the current findings, however, this point of view must be modified. The results suggest the existence of some regulatory mechanisms not only in the cell membrane, but also in the mitochondria and nuclei, which are able to modulate the transfer of melatonin from the membrane into the cell and from the cytosol to the nucleus and mitochondria. By regulating the intracellular concentration of melatonin, the cell membrane may act as a reservoir of melatonin, ready to be used by the cell whenever needed. Moreover, considering the intracellular effects of melatonin, mainly at nuclear and mitochondrial level, our results suggest that the therapeutical range of melatonin should be between 10 and 40 mg/kg bw in rats. To obtain similar therapeutical approach in humans, we can extrapolate these data to the human equivalent dose (HED) following the Reagan-Shaw et al. [55] conversion. This means that the human dose would oscillate between 1.6 and 6.5 mg/kg bw, i.e., 112 and 455 mg for an adult of 70 kg bw. Anyway, these doses in humans require further evaluation.

We next asked whether there exists a regulatory mechanism to control melatonin distribution into the cell. A response may come from the antioxidant and anti-inflammatory properties of melatonin. Melatonin is a major intracellular antioxidant, and this property is reflected, among other considerations, by its ability to maintain the glutathione (GSH) homeostasis by acting on several pathways: increasing GSH synthesis, augmenting the expression and activity of the γ -glutamylcysteine synthase [56], recovering GSH from oxidized glutathione (GSSG) through the induction of expression and activity of GSH reductase [16, 57, 58], and reducing the GSH consumption owing to the potent free radical scavenger ability of melatonin, thus decreasing the oxidative stress status [15, 41–43, 59–65]. GSH is necessary for a series of reactions in the cell leading to a defense against free radicals and detoxifying xenobiotics via GSH S-transferases. Additionally, GSH is also present in the cell nucleus, where it has been traditionally related to antioxidant protection of the genome [66]. Moreover, there is increasing evidence

suggesting a role of GSH in nuclear homeostasis and cell proliferation, and nuclear GSH depletion prior to irradiation causes DNA fragmentation and apoptosis [67]. GSH moves to the nucleus when the cell is ready to proliferate, regulating a series of events necessary for cell division [68]. Thus, high GSH levels in the nucleus are directly related to cell proliferation. In preventing a GSH-dependent hyper-reduced status in the nucleus, cell and nuclear membranes control the intracellular amount of melatonin. This mechanism should now be considered regarding the oncostatic properties of melatonin. The observation may be generalized to other cell compartments. In fact, if melatonin distributes homogeneously in all subcellular compartments, the intracellular redox status of the cell will move to a high hyper-reduced status, altering many redox reactions.

The data of this study reveal that melatonin physiology is more complex than previously supposed. Melatonin concentrations vary over a 24-hr period in distinct subcellular compartments, and these changes probably indicate that melatonin may regulate separately the redox status in each compartment. Thus, melatonin becomes a much more important intracellular antioxidant, because it can selectively change in those subcellular structures where it is required. Among other considerations, the anti- and proapoptotic actions of melatonin in normal and cancer cells, respectively, might be a consequence of the alteration in the regulatory mechanisms affecting subcellular melatonin distribution in the latter, allowing the free influx of melatonin into the cell, exerting its oncostatic and proapoptotic effects. Also, importantly from a therapeutic point of view, is the fact that our data support the use of high doses of melatonin, as they seem to be necessary to reach subcellular concentrations sufficient to exert pharmacological effects. Finally, the existence of mechanisms controlling subcellular melatonin distribution may also explain the low toxicity of the indoleamine when it is used even at high doses. It is clearly of major interest to gain information regarding the mechanism(s) involved in the cellular control of melatonin distribution.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (RD06/0013/0008, PI08-1664), and from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P07-CTS-03135 and CTS-101). The authors thank Araceli Puertas for their technical assistance.

References

1. PAREDES SD, KORKMAZ A, MANCHESTER LC et al. Phytomelatonin: a review. *J Exp Bot* 2009; **60**:57–69.
2. HARDELAND R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**:2001–2018.
3. HARDELAND R, POEGGELER B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; **34**:233–241.
4. LERNER AB, CASE JD, TAKAHASHI Y et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; **80**:2587–2592.

5. LIU T, BORJIGIN J. *N*-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res* 2005; **39**:91–96.
6. PERREAU-LENZ S, KALSBECK A, GARIDOU ML et al. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci* 2003; **17**:221–228.
7. KAROLCZAK M, KORF HW, STEHLE JH. The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. *Endocrine* 2005; **27**:89–100.
8. KLEIN DC. Arylalkylamine *N*-acetyltransferase: “the Timezyme”. *J Biol Chem* 2007; **282**:4233–4237.
9. REITER RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **79**:C153–C158.
10. REITER RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; **12**:151–180.
11. ACUNA-CASTROVIEJO D, MARTIN M, MACIAS M et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; **30**:65–74.
12. CRESPO E, MACIAS M, POZO D et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 1999; **13**:1537–1546.
13. ESCAMES G, LOPEZ LC, ORTIZ F et al. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* 2006; **41**:1165–1173.
14. ESCAMES G, LEON J, MACIAS M et al. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; **17**:932–934.
15. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**:57–60.
16. MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G et al. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; **14**:1677–1679.
17. MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res* 2000; **28**:242–248.
18. PARADIES G, PETROSILLO G, PARADIES V et al. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res* 2010; **48**:297–310.
19. STEFULJ J, HORTNER M, GHOSH M et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; **30**:243–247.
20. CARDINALI DP, ROSNER JM. Retinal localization of the hydroxyindole-*O*-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology* 1971; **89**:301–303.
21. VLAHAKES GJ, WURTMAN RJ. A Mg²⁺ dependent hydroxyindole *O*-methyltransferase in rat Harderian gland. *Biochim Biophys Acta* 1972; **261**:194–197.
22. RAIKHLIN NT, KVETNOY IM, TOLKACHEV VN. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* 1975; **255**:344–345.
23. MESSNER M, HUETHER G, LORF T et al. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life Sci* 2001; **69**:543–551.
24. OZAKI Y, LYNCH HJ. Presence of melatonin in plasma and urine or pinealectomized rats. *Endocrinology* 1976; **99**:641–644.
25. SANCHEZ-HIDALGO M, DE LA LASTRA CA, CARRASCOSA-SALMORAL MP et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol* 2009; **44**:328–334.
26. REITER RJ, RICHARDSON BA, JOHNSON LY et al. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 1980; **210**:1372–1373.
27. SANCHEZ-HIDALGO M, GUERRERO MONTAVEZ JM, CARRASCOSA-SALMORAL MP et al. Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. *J Pineal Res* 2009; **46**:29–35.
28. MENENDEZ-PELAEZ A, POEGGELER B, REITER RJ et al. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 1993; **53**:373–382.
29. HOFFMAN RA, REITER RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat Rec* 1965; **153**:19–21.
30. MEIER PJ, SZTUL ES, REUBEN A et al. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. *J Cell Biol* 1984; **98**:991–1000.
31. CHAHBOUNI M, ESCAMES G, VENEGAS C et al. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res* 2010; **48**:282–289.
32. SASTRE TJ, RIJN-BIKKER P, MERKUS P et al. Quantitative determination of melatonin in human plasma and cerebrospinal fluid with high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 2000; **14**:306–310.
33. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248–254.
34. REITER RJ. The melatonin message: duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci* 1987; **40**:2119–2131.
35. ACUNA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, LEON J et al. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* 2003; **527**:549–557.
36. MENENDEZ-PELAEZ A, REITER RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 1993; **15**:59–69.
37. LYNCH HJ, RIVEST RW, RONSHEIM PM et al. Light intensity and the control of melatonin secretion in rats. *Neuroendocrinology* 1981; **33**:181–185.
38. BRAINARD GC, RICHARDSON BA, KING TS et al. The influence of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Brain Res* 1984; **294**:333–339.
39. JIMENEZ-JORGE S, JIMENEZ-CALIANI AJ, GUERRERO JM et al. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *J Pineal Res* 2005; **39**:77–83.
40. SILVER I, ERECIŃSKA M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol* 1998; **454**:7–16.
41. ACUNA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, RODRIGUEZ MI et al. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 2007; **12**:947–963.
42. ACUNA CD, LOPEZ LC, ESCAMES G et al. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 2011; **11**:221–240.
43. LOPEZ A, GARCIA JA, ESCAMES G et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; **46**:188–198.

44. FLOYD RA, HENSLEY K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 2002; **23**:795–807.
45. HILL JM, SWITZER RC III. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* 1984; **11**:595–603.
46. DROGE W. Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol* 2003; **543**:191–200.
47. REITER RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; **9**:526–533.
48. MARTIN M, MACIAS M, LEON J et al. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; **34**:348–357.
49. LOPEZ LC, ESCAMES G, ORTIZ F et al. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; **27**:623–630.
50. JOU MJ, PENG TI, HSU LF et al. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca(2+)-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 2010; **48**:20–38.
51. DONG W, HUANG F, FAN W et al. Differential effects of melatonin on amyloid-beta peptide 25-35-induced mitochondrial dysfunction in hippocampal neurons at different stages of culture. *J Pineal Res* 2010; **48**:117–125.
52. KAUR C, SIVAKUMAR V, LING EA. Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia. *J Pineal Res* 2010; **48**:185–193.
53. BASS J, TAKAHASHI JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 2010; **330**:1349–1354.
54. CERAULO L, FERRUGIA M, TESORIERE L et al. Interactions of melatonin with membrane models: portioning of melatonin in AOT and lecithin reversed micelles. *J Pineal Res* 1999; **26**:108–112.
55. REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; **22**:659–661.
56. URATA Y, HONMA S, GOTO S et al. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**:838–847.
57. ANTOLIN I, RODRIGUEZ C, SAINZ RM et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; **10**:882–890.
58. CARRETERO M, ESCAMES G, LOPEZ LC et al. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Pineal Res* 2009; **47**:192–200.
59. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; **42**:28–42.
60. MUKHERJEE D, ROY SG, BANDYOPADHYAY A et al. Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms. *J Pineal Res* 2010; **48**:251–262.
61. ROSENSTEIN RE, PANDI-PERUMAL SR, SRINIVASAN V et al. Melatonin as a therapeutic tool in ophthalmology: implications for glaucoma and uveitis. *J Pineal Res* 2010; **49**:1–13.
62. TAN DX, MANCHESTER LC, BURKHARDT S et al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001; **15**:2294–2296.
63. XU SC, HE MD, ZHONG M et al. Melatonin protects against nickel-induced neurotoxicity in vitro by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function. *J Pineal Res* 2010; **49**:86–94.
64. MILCZAREK R, HALLMANN A, SOKOLOWSKA E et al. Melatonin enhances antioxidant action of alpha-tocopherol and ascorbate against N. *J Pineal Res* 2010; **49**:149–155.
65. REITER RJ, PAREDES SD, MANCHESTER LC et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; **44**:175–200.
66. SANDSTROM BE, MARKLUND SL. Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide. *Biochem J* 1990; **271**:17–23.
67. MORALES A, MIRANDA M, SANCHEZ-REYES A et al. Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; **42**:191–203.
68. MARKOVIC J, GARCIA-GIMENEZ JL, GIMENO A et al. Role of glutathione in cell nucleus. *Free Radic Res* 2010; **44**:721–733.

Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver

Abstract: Melatonin membrane (MT1 and MT2) and nuclear (ROR α) receptors have been identified in several mammalian tissues, including the liver. The mechanisms regulating hepatic melatonin receptors are yet unknown. This study investigated whether these receptors exhibit daily changes and the effects of melatonin on their levels. Our results show that mRNAs for MT1/MT2 receptors exhibit circadian rhythms that were followed by rhythms in their respective protein levels; the acrophases for the two rhythms were reached at 04:00 and 05:00 hr, respectively. Pinealectomy blunted the rhythms in both mRNAs and protein levels. In contrast, mRNA and protein levels of nuclear receptor ROR α increased significantly after pinealectomy. The cycles of the latter receptor also exhibited circadian rhythms which peaked at 03:00 and 03:45 hr, respectively. Melatonin administration (10–200 mg/kg) increased in a dose-dependent manner the protein content of MT1/MT2 receptors, with no effects on ROR α . Lurzindole treatment, however, did not affect melatonin receptor expression or content of either the membrane or nuclear receptors. Together with previously published findings which demonstrated the intracellular distribution of melatonin in rat liver, the current results support the conclusion that the circadian rhythms of MT1/MT2 and ROR α receptors are under the control of the serum and intracellular melatonin levels. Moreover, the induction of MT1/MT2 receptors after the administration of high doses of melatonin further suggests that the therapeutic value of melatonin may not be restricted to only low doses of the indoleamine.

Carmen Venegas^{1,2}, José A. García^{1,2}, Carolina Doerrier^{1,2}, Huayqui Volt^{1,2}, Germaine Escames^{1,2}, Luis C. López^{1,2}, Russel J. Reiter³ and Darío Acuña-Castroviejo^{1,2,4}

¹Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain; ³Department of Cellular and Structural Biology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; ⁴Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Key words: circadian rhythms, melatonin, MT1, MT2, rat liver, ROR α

Address reprint requests to Darío Acuña-Castroviejo, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.
E-mail: dacuna@ugr.es

Received July 23, 2012;

Accepted September 21, 2012.

Introduction

Two mammalian membrane receptors, Mel 1_A and Mel 1_B (MT1 and MT2, respectively), were cloned and characterized previously [1, 2]. Both belong to the G-protein-coupled receptor (GPCR) superfamily of membrane receptors and share high homology (about 60%) [3]. Expressions of MT1 and MT2 are somewhat different: MT1 is expressed in brain (hypothalamus, cerebellum, SCN, hippocampus, substancia nigra, and ventral tegmental area) [4–8], immune system cells, testes, ovary, skin, liver, kidney, adrenal cortex, placenta, breast, retina, pancreas, and spleen [7–12], whereas MT2 is expressed in the brain (hypothalamus, suprachiasmatic nucleus), immune system cells, retina, pituitary, blood vessels, testes, kidney, gastrointestinal tract, mammary glands, adipose tissue, and the skin [2, 10, 12–14]. While the distribution of these receptors in various tissues has been well studied, the regulation of their densities has been sparingly examined.

In recent years, studies on the processes that modulate the concentration of melatonin membrane receptors have been examined in brain regions, especially in the suprachiasmatic nucleus (SCN) and pars tuberalis (PT). It was observed that the expression of these receptors varies with the species, location, light/dark cycle, time of the day,

stage of neural development, and endocrine status [15]. For example, the density of melatonin receptors decreases 10-fold at 30 days of birth in the rat pars distalis (PD) [15], whereas the PT receptors are under the influence of melatonin [16]. Similar changes seem not to occur in other brain areas of the rat. Hamsters show significant daily changes in the SCN melatonin membrane receptor density, changes that are controlled by the photoperiod [17]. In contrast, the brain of other species including the salmon (*Salmo salar* L.) does not display changes in its melatonin receptors [18]. An age-dependent reduction in melatonin binding sites in the cerebral arteries [15] and decreases in 2-[125]-iodomelatonin binding and MT1 receptors in the SCN of rats and mice [19, 20] have been also reported, consistent with aging being a factor that determines melatonin receptor density.

In addition to the membrane receptors, nuclear melatonin receptors, or at least nuclear binding sites for melatonin, have been shown. These nuclear binding sites were initially pharmacologically characterized [21, 22], and soon thereafter, they were cloned and identified as belonging to the RZR/ROR orphan receptor subfamily, which includes the products of three genes: ROR α and its splicing variants (ROR α 1, ROR α 2, ROR α 3 and ROR α) ROR β (ROR β 1, ROR β 2) and ROR γ (ROR γ 1, ROR γ 2) [23–26]. The ROR

subfamily exhibits a distinct spatiotemporal expression pattern, suggesting that the members of this family have different functions. ROR_{α} is distributed in adipose tissue, skin, testes, cartilage, and liver [27]; ROR_{β} has been detected in neural tissues and in the retina [25], and ROR_{γ} is expressed in skeletal muscle, liver, kidney, adipocytes, and the immune system [26–28]. The expression of nuclear receptors also changes with the developmental state, tissue, and endocrine status. While in the mouse, the expression of ROR_{α} receptors is maximal at 16th day of life in cerebellum, thalamus, and olfactory bulb neurons, and at 7th day in the hippocampus [29], their expression in testes was detected only after sexual maturation [30].

We recently analyzed the daily changes, subcellular distribution, and melatonin levels in the organelles of rat hepatocytes. The melatonin concentration of different subcellular organelles of liver varies with time of day, pinealectomy, and after the exogenous administration of melatonin [31]. As follow-up to this study, we considered it worthwhile to examine the daily changes in the mRNAs and protein expression of MT1, MT2, and ROR_{α} receptors in liver of rats, along with their relationship to the changes in melatonin levels under the same conditions.

Materials and methods

Animals and treatments

Three-month-old male Wistar rats were obtained from Harlan (Barcelona, Spain). They were housed under controlled temperature conditions ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) and maintained on a light/dark (LD) cycle of 12:12 hr (lights on at 07:00 hr). All experiments were performed according to the Spanish Government Guide and the European Community Guide for animal care. Animals were divided into four groups: (i) controls, (ii) sham-pinealectomized (SPx), (iii) pinealectomized (Px), and (iv) rats treated with the melatonin membrane receptor blocker, luzindole (Lz).

To study the circadian variations in the melatonin receptors, subgroups of SPx and Px rats ($n = 6$ animals/subgroup) were sacrificed at 08:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00, 02:00, 04:00, and 06:00 hr. The sacrifice of animals at night was performed under a dim red light which does not influence endogenous melatonin production [32]. To test whether exogenous melatonin influences melatonin receptor expression or protein levels, sham-pinealectomized (SPx) and pinealectomized (Px) animals ($n = 6$ animals/dose) were intraperitoneally (i.p.) injected with 10, 40 or 200 mg/kg bw melatonin at 08:00 hr and sacrificed 4 hr later at noon. Some melatonin-treated animals received an i.p. injection of luzindole (4.5 mg/kg) at 07:30 hr, and the livers were collected at noon.

Melatonin was dissolved in 20% 1,2-propanediol and injected intraperitoneally, whereas luzindole was dissolved in water/ethanol 1:2 (v/v) and administered 30 min before melatonin injection. Pinealectomy was performed under equithesin anesthesia (1 mL/kg bw) following a procedure previously published [33], and the liver of these animals were studied 5 days later. Rats were sacrificed and liver was removed, washed in cold saline, and stored at -80°C until their use.

Isolation of nuclei from liver

Rat livers were washed with $1 \times$ PBS (0.01 M phosphate buffer containing 0.15 M NaCl, 0.27 mM KCl, pH 7.5), minced with scissors, homogenized in PBS/PIB 1:20 (v/v) ($1 \times$ PBS/phosphatase inhibitor buffer containing PBS plus 125 mM NaF, 250 mM α -glycerolphosphate, 250 mM p-nitrophenyl phosphate and 25 mM NaVO_3 , pH 7.5) at 800 rpm with a Teflon pestle, and filtered. The homogenate was centrifuged at 300 g for 5 min at 4°C , and 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 0.5 mM DL-dithiothreitol (DTT), and $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin were added to supernatants and stored at -80°C until its use for Western blot of MT1, MT2, and ROR_{α} .

For Western blot analysis of nuclear ROR_{α} content, the pellet obtained from the above centrifugation was resuspended in 1 mL hypotonic buffer (20 mM HEPES containing 5 mM NaF, 0.5 mM NaMoO_4 , and 0.1 mM EDTA, pH 7.5) and incubated for 15 min at 4°C . Then, $50 \mu\text{L}$ of I-GEPAL was added to the sample, vortex for 10 s, and centrifuged at 14,000 g for 1 min at 4°C . The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 0.2 mL lysis buffer (20 mM HEPES containing 20% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 20 mM NaF, 0.5 mM DTT, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, and 0.2 mM PMSF, pH 7.9). The samples were incubated for 30 min at 4°C in constant agitation and centrifuged at 14,000 g for 10 min at 4°C . The supernatants were frozen at -80°C until their use for Western blot of ROR_{α} .

Western blot analysis

For MT1 and MT2 Western blot analysis, aliquots of the cytosol homogenates were thawed and diluted up to $25 \mu\text{g}$ of protein ($45 \mu\text{L}$), and electrophoresized on 10% SDS-polyacrylamide gels, transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Barcelona, Spain), and blocked in 5% PBS-T BSA (0.01 M phosphate buffer containing 0.15 M NaCl, 0.1% v/v Tween-20, pH 7.4) for 2:30 hr. Membranes were incubated overnight with antibodies against MT1 and MT2 (1:200) (sc-13186 and sc-13177, respectively; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 4°C in agitation, washed thrice with PBS-T for 10 min, and incubated with an anti-goat secondary antibody (sc-2020; Santa Cruz Biotechnology) during 1 hr at room temperature. For ROR_{α} , aliquots of both nuclei and cytosol homogenates were thawed and diluted up to $15 \mu\text{g}$ protein ($15 \mu\text{L}$) and electrophoresized on 7.5% SDS-polyacrylamide gels, transferred onto nitrocellulose membranes, and blocked in 5% PBS-T BSA for 4 hr at room temperature. Then, the membranes were overnight incubated with the ROR_{α} antibody (1:500) (sc-28612; Santa Cruz Biotechnology) at 4°C in agitation, washed thrice with PBS-T for 10 min, and incubated with an anti-rabbit secondary antibody (1:5000) (31460; ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain) during 1 hr at room temperature. In both cases, that is, MT1/MT2, and ROR_{α} , the membranes were washed thrice with PBS-T for 10 min, and the immunodetection was performed with a commercial chemiluminescence detection kit (34075 Super Signal West Dura; Thermo Scientific). The blots were then analyzed and

quantified with a Kodak ImageStation 2000R (Easmant Kodak Company, Rochester, NY, USA). Bradford method was used for protein measurement [34].

Reverse transcription-polymerase chain reaction

RNA was isolated from rat liver using the RNA isolation kit Real Total Spin Plus (Durviz, S.L., Valencia, Spain). RT-PCR was performed in a Stratagene 3005P system. Primer sequences (Table 1) were designed using the Beacon Designer software (Premier Biosoft Int., Palo Alto, CA, USA). RT-PCRs were carried with a final volume of 25 μ L of reaction mixture containing 100, 150, and 200 ng of RNA (for MT1, MT2, and ROR α , respectively), 12.5 μ L of 2 \times MESA GREEN MasterMix Plus (Eurogentec, Seraing, Liège, Belgium), 0.4, 0.2, and 0.1 μ M of specific gene primers for MT1, MT2, and ROR α , respectively, and RNase-free water. PCR conditions were as follows: 5 min at 95 $^{\circ}$ C followed by 40 thermal cycles at 95 $^{\circ}$ C of 15 s each one, 1 min at 60 $^{\circ}$ C, plus 1 min at 72 $^{\circ}$ C. Data were analyzed according to the standard curves constructed with 500, 50, 5, 0.5, and 0.05 ng of RNA from MT1, MT2, and ROR α and were normalized by GAPPH expression.

Statistical analysis

Data are expressed as the means \pm S.E.M. One-way ANOVA with a post test was used. Cosinor analysis was performed with the Time Series Analysis-Serial Cosinor 6.3 Lab View software (TSASC 6.3; Expert Soft Technologie Inc, BioMedical Computing and Applied Statistics Laboratory, Esvres, France). Statistical significant differences were accepted when $P < 0.05$.

Results

Fig. 1 represents the daily changes in rat liver MT1 receptors. SPx animals exhibited a circadian rhythm in both MT1 mRNA and protein levels with peaks at 04:00 hr ($P < 0.001$). Pinealectomy blunted these rhythms, and the mRNA expression and protein levels of MT1 receptor remain constant through the 24 hr. Analysis of the daily MT2 receptor changes reveals similar results (Fig. 2). Indeed, SPx rats show circadian variations in the mRNA expression and protein level of MT2, reaching the maximal values at 04:00 hr ($P < 0.001$). Pinealectomy also

Table 1. Sequence of the primers used for real-time PCR analysis of melatonin receptors

Genes	Sequences primers
GAPDH forward	GGC ACA GTC AAG GCT GAC AAT
GAPDH backward	ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA
MT1 forward	AGC CCT CTC CAC TAA TAA CC
MT1 backward	ACC CTG TAT CAC TTG TTT GC
MT2 forward	GTG TCA TTG GCT CTG TCT TC
MT2 backward	CAG TAT CCA TAT TCG CAG GTAG
ROR α forward	CGA GGT ATC TCA GTC ACG AAG
ROR α backward	GCC GAG GAC AGG AGT AGG

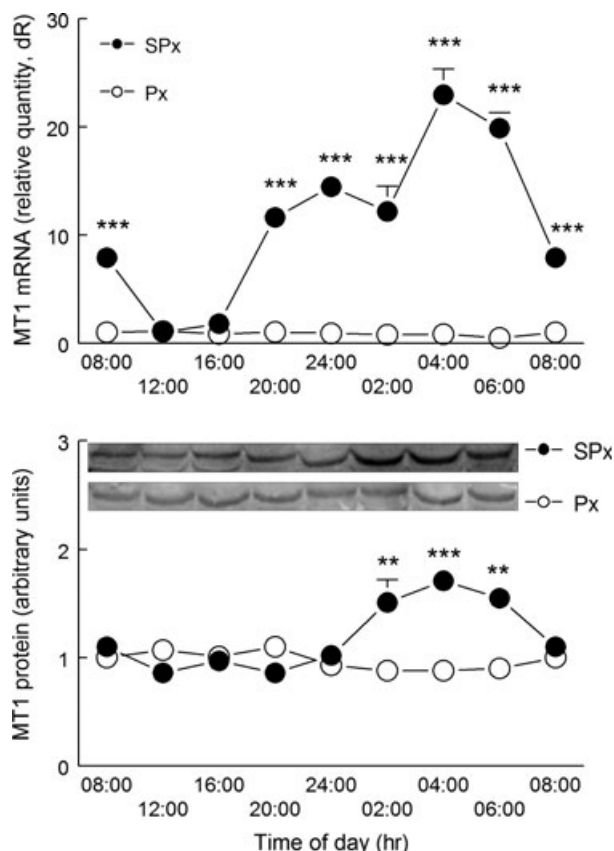


Fig. 1. Daily changes in mRNA expression (upper panel) and protein levels (lower panel) of MT1 melatonin receptor in liver of sham-pinealectomized (SPx) and pinealectomized (Px) rats. ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus Px.

blunted the circadian variation in MT2 receptor. When the daily changes in ROR α receptor were analyzed, the results were opposite to those of MT1 and MT2 (Fig. 3). We observed that SPx animals display minor changes in the daily mRNA expression and protein content of ROR α receptor with Px increasing them.

Cosinor analysis of the MT1, MT2, and ROR α rhythms in mRNAs and protein levels is shown in (Table 2). In all cases, mRNA expression precedes the maximal protein content for each receptor type.

Fig. 4 shows the mRNA expression and protein levels of MT1 and MT2 receptors after melatonin (10 mg/kg bw) and/or luzindole (4.5 mg/kg bw) administration. In all cases, the mRNA expression was measured at 12:00 hr, that is, 4 hr after that vehicle or melatonin administration. In general, it can be observed that melatonin administration enhances MT1/MT2 mRNA and protein levels, an effect augmented in the presence of luzindole. In the case of ROR α (Fig. 5), the effects of Px, melatonin, and/or luzindole administration were not significant, except for the ROR α protein content in the cytosol of pinealectomized animals ($P < 0.001$).

The subsequent experiments were done to assess whether high doses of melatonin modified the expression of hepatic melatonin receptors. In this case, groups of control rats were i.p. injected with 40 and 200 mg/kg bw

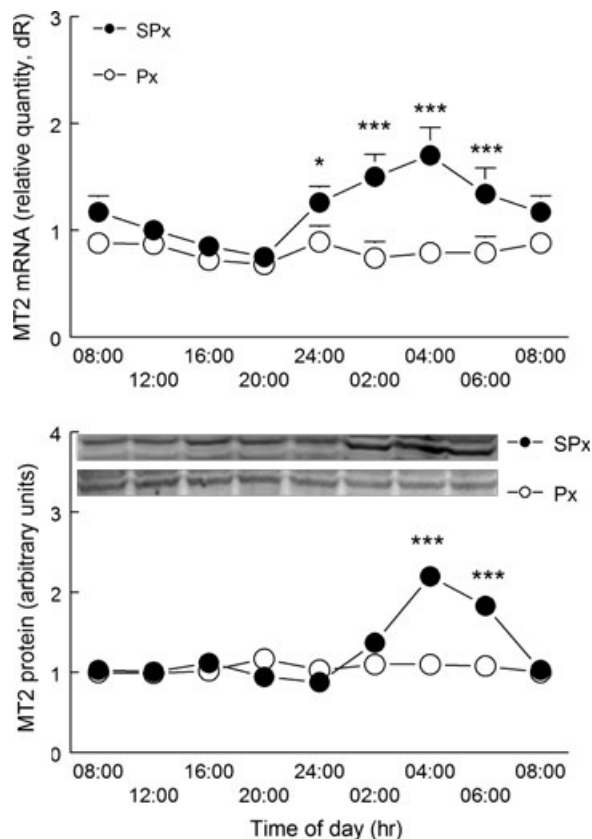


Fig. 2. Daily changes in mRNA expression (upper panel) and protein levels (lower panel) of MT2 melatonin receptor in liver of sham-pinelectomized (SPx) and pinealectomized (Px) rats. * $P < 0.05$, and *** $P < 0.001$ versus Px.

melatonin at 8:00 hr, and sacrificed 4 hr later. Fig. 6 shows that 40 mg/kg bw melatonin significantly increased MT1 mRNA expression ($P < 0.01$) and protein content ($P < 0.01$), an effect further increased with 200 mg/kg melatonin ($P < 0.001$). Melatonin administration, however, did not influence the ROR α mRNA or protein levels (Fig. 7).

Discussion

The current data show, for the first time, the existence of daily variations in the mRNA and protein levels of MT1, MT2, and ROR α melatonin receptors in rat liver. A cosinor analysis revealed the existence of significant rhythms for both mRNAs and protein levels. Pinealectomy blunted the rhythms of MT1 and MT2 receptors and enhanced the rhythm of ROR α , whereas melatonin administration increased the MT1/MT2 protein levels in a dose-dependent manner. These data suggest that the daily changes in melatonin receptors may be under the control of blood melatonin levels derived from the pineal gland; blood levels of melatonin exhibit a nocturnal rise with highest values at 02:00 hr [31, 35].

The events leading to maximal melatonin receptor expression would be expected to be related to the circadian rhythm of melatonin, its physiologic ligand. The acrophases

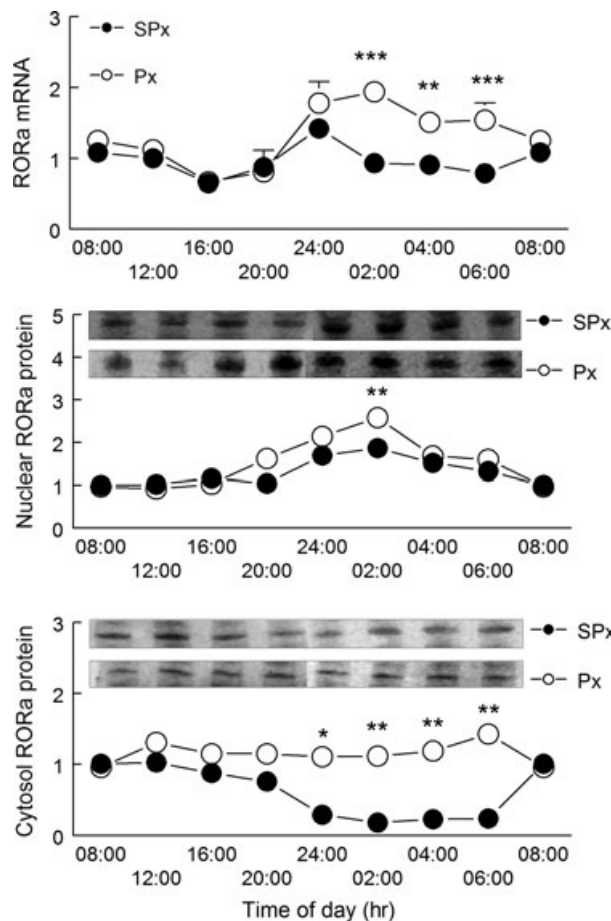


Fig. 3. Daily changes in mRNA expression (upper panel) and protein levels (lower panel) of ROR α melatonin receptor in liver of sham-pinelectomized (SPx) and pinealectomized (Px) rats. See (Fig. 1) for Y-axis units. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus Px.

Table 2. Cosinor analysis of the changes in the expression of mRNA and in protein levels of MT1, MT2, and ROR α melatonin receptors in rat liver

Receptor	Acrophase	Amplitude	Mesor	Significance
MT1 mRNA				
SPx	4:01 \pm 0.05	8.80 \pm 0.09	9.69 \pm 0.65	$P < 0.001$
MT1 protein				
SPx	5:17 \pm 0.5	0.37 \pm 0.07	1.12 \pm 0.05	$P < 0.001$
MT2 mRNA				
SPx	4:02 \pm 0.08	0.45 \pm 0.1	1.11 \pm 0.06	$P < 0.001$
MT2 protein				
SPx	5:10 \pm 0.07	0.40 \pm 0.07	1.22 \pm 0.05	$P < 0.001$
ROR α mRNA				
SPx	1:28 \pm 0.03	0.12 \pm 0.07	0.94 \pm 0.05	n.s.
Px	3:32 \pm 0.1	0.59 \pm 0.01	1.11 \pm 0.08	$P < 0.001$
ROR α protein (nucleus)				
SPx	1:28 \pm 0.04	0.39 \pm 0.04	1.28 \pm 0.03	$P < 0.01$
Px	2:16 \pm 0.06	0.75 \pm 0.06	1.47 \pm 0.04	$P < 0.01$
ROR α protein (cytosol)				
SPx	13:45 \pm 0.02	0.45 \pm 0.02	0.66 \pm 0.03	$P < 0.05$
Px	6:14 \pm 0.08	0.37 \pm 0.05	1.28 \pm 0.04	n.s.

Acrophase is expressed as hr:min.

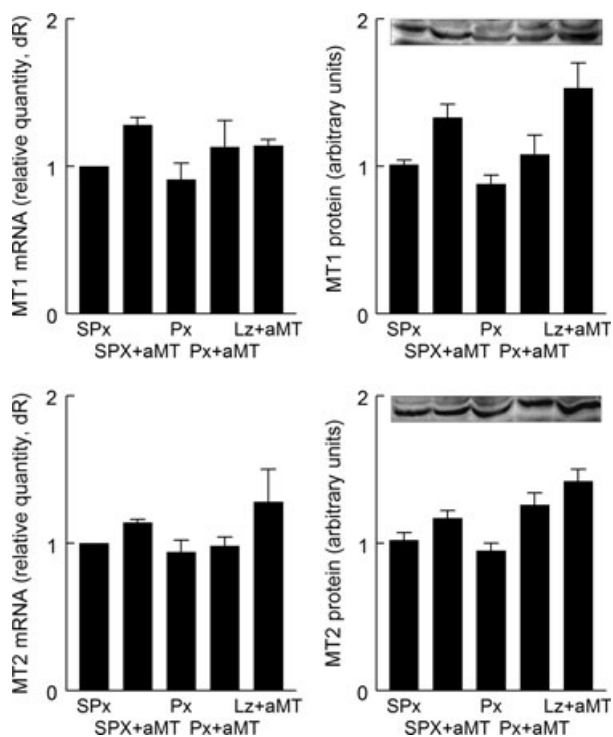


Fig. 4. Effects of sham (SPx) or pinealectomy (Px) alone or in combination with melatonin (aMT) and luzindole (Lz) plus melatonin on the MT1 and MT2 mRNA expression and protein levels in rat liver. Rats were sacrificed at 12:00 hr after being injected with vehicle (SPx and Px) or melatonin (SPx, Px and Lz) 4 hr earlier. Luzindole was given 30 min before melatonin.

of the MT1 and MT2 mRNAs expression peaked near to 03:00 hr, and 2 hr later the acrophases of the MT1/MT2 protein contents reached their maximal. In the same experimental model, we recently reported that plasma melatonin peaks at 02:00 hr, that is, 1 hr earlier than the MT1/MT2 mRNAs peak [31]. Thus, it can be suggested that the rises in the mRNAs and protein may be induced by the nocturnal plasma melatonin increase, following by MT1/MT2 mRNAs expression. At this time, that is, 03:00–05:00 hr., MT1/MT2 receptors are then activated by and respond to circulating melatonin. Soon thereafter, the reduction in circulating melatonin levels, with its ability to down-regulate its own receptors, reduce both the mRNAs expression and protein content of both MT1/MT2 receptors. If similar rhythms related to the receptors are common to many tissues, it is likely that the regulation of the melatonin rhythm by the light/dark cycle determines its ability to synchronize a variety of internal rhythms [36, 37]. This hypothesis is supported by the observation that greatly reduced plasma melatonin after pinealectomy blunted both MT1 and MT2 receptors expression.

Considering that the intracellular melatonin levels in rat liver increase after pinealectomy [31], two alternatives for melatonin–melatonin receptor interactions exist: (i) the expression of MT1/MT2 receptors is up-regulated by melatonin of pineal origin; thus, when circulating melatonin levels drop after pinealectomy, the signal to induce the mRNA expression of these receptors is lost, and (ii) increased

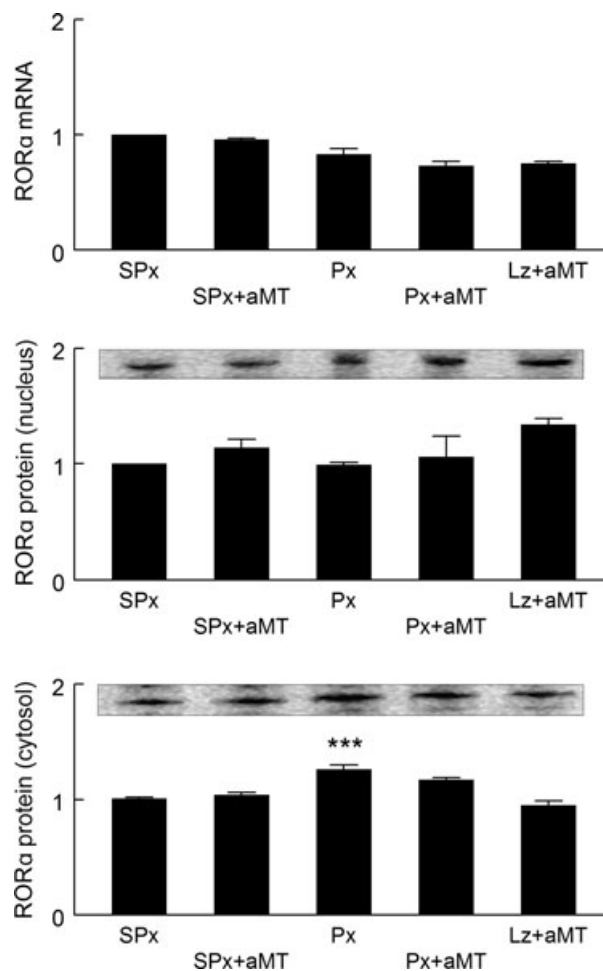


Fig. 5. Effects of sham (SPx) or pinealectomy (Px) alone or in combination with melatonin (aMT) and luzindole (Lz) plus melatonin on the ROR α mRNA expression and the protein levels in rat liver cytosol and nucleus. Rats were sacrificed at 12:00 hr after being injected with vehicle (SPx and Px) or melatonin (SPx, Px, and Lz) 4 hr earlier. Luzindole was given 30 min before melatonin. See (Fig. 1) for Y-axis units. *** $P < 0.001$ versus SPx, Px+aMT, Lz+aMT.

intracellular melatonin levels after pinealectomy are responsible for the inhibition of MT1/MT2 receptors, suggesting that elevated intracellular melatonin content causes the inhibition on the mRNAs expression of these receptors. In an attempt to resolve this question, we found that after melatonin administration to rats, which increased the intracellular content of the indoleamine [31], the MT1/MT2 protein content significantly increased in a dose-dependent manner. So, whereas pinealectomy reduces plasma melatonin and increases its intracellular levels, melatonin administration increases both plasma and intracellular levels of the indoleamine. In these conditions, pinealectomy reduces and melatonin administration increases MT1/MT2 receptors. Thus, these observations are consistent with the idea that the intracellular melatonin levels are responsible for the regulation of MT1/MT2 receptor expression. In support of this assumption, it was reported that aging is followed by a reduction in both pineal and tissue melatonin levels and MT1/MT2 receptors [38–40].

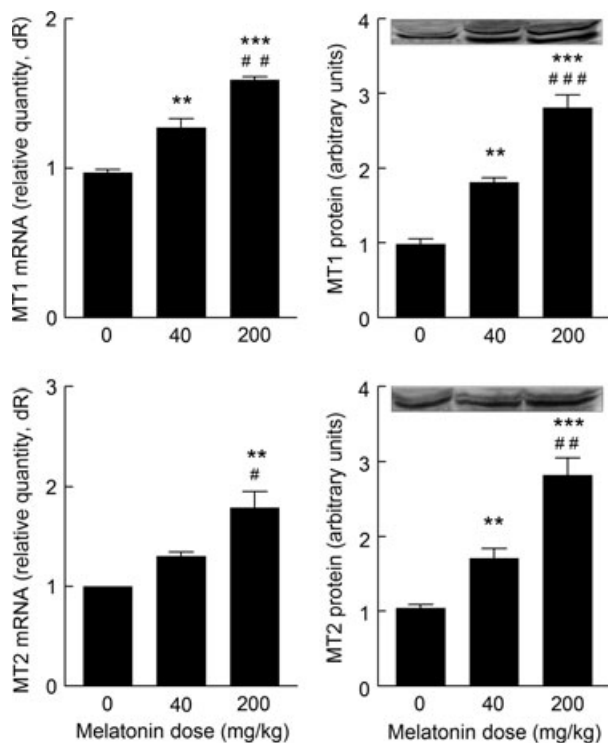


Fig. 6. Dose-dependent effects of melatonin administration on MT1 and MT2 mRNA expression and protein levels in rat liver. Rats were i.p. injected with either vehicle (0) or 40 or 200 mg/kg bw at 8:00 hr and sacrificed 4 hr later. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus vehicle; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, and ### $P < 0.001$ versus the 40 mg/kg dose.

The regulation of melatonin receptors may vary with the organ or tissue examined. Our results are consistent with data obtained in rat pars tuberalis (PT), which shows a nocturnal rise in MT1 receptors that is not changed by pinealectomy [16]. However, in the SCN, the regulation of MT1 receptors involves the light/dark cycle even in pinealectomized rats [41]. In other tissues including the intestine and colon, melatonin receptors do not display a diurnal rhythm, with fasting being a signal that triggers the expression of their mRNA [42]. Other examples of melatonin receptor regulation include those in the rat uterine antimesometrial stroma, where MT1 receptors are under the control of ovarian hormones [43]. In the majority of tissues, the relationship between intracellular melatonin content and MT1/MT2 mRNA expression has not been explored; the current results indicate an examination of these interactions may be informative.

Regarding the ROR α nuclear melatonin receptor, we also found the presence of daily variations in the mRNA and protein levels in rat liver nucleus and cytosol, although the cosinor analysis only revealed a significant rhythm in mRNA expression in pinealectomized rats. Similar results were reported in other peripheral tissues including liver, heart, stomach, kidney, and lung of mice, where a slight oscillation in mRNA levels was detected at different photoperiods [44]. The rat SCN, however, exhibits a ROR α mRNA circadian rhythm [45]. These data indicate that the expression of ROR α depends not only

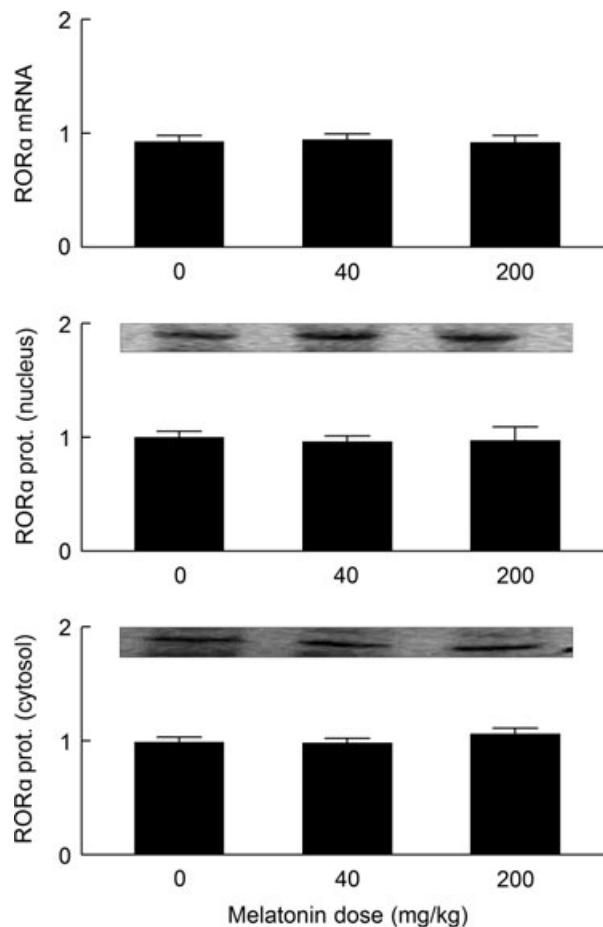


Fig. 7. Dose-dependent effects of melatonin administration on ROR α mRNA expression and protein levels in rat liver. Control rats were i.p. injected with either vehicle (0) or 40 or 200 mg/kg bw at 8:00 hr and sacrificed 4 hr later. See Fig. 1 for Y-axis units.

the tissue but possibly on the species studied. The decrease in ROR α protein levels in cytosol together with its rise in the nucleus during the dark period in control rats, when the melatonin peak occurs, suggests that the melatonin may control the shuttle between cytosol and nucleus. This hypothesis is further supported by the data in pinealectomized rats where both the mRNA expression and nuclear protein content of ROR α increased significantly with the acrophases occurring at 02:92 and 03:46 hr, respectively. The finding that the content of ROR α protein in cytosol at night did not increase to the same degree as in the nucleus further supports a movement of this protein toward the nucleus. Thus, there may exist a dynamic sub-cellular distribution of ROR α similar to that of steroid receptors [46]. A melatonin-dependent induction in ROR α mRNA expression was observed in Jurkat cell nuclei with a slight movement of ROR α to the cytoplasm, which may depend on melatonin itself [47]. Balancing nuclear export/import [48] is one of the mechanisms involved in the trans-activation of nuclear receptors in addition to ligand binding, phosphorylation, acetylation, and ubiquitinylation [49, 50]. The current findings, however, did not show changes in the nuclear-cytosol distribution of ROR α

receptors at 4 hr after melatonin administration, in agreement with previous studies which used lower doses of melatonin [45]. Thus, changes in ROR α distribution in the nucleus and cytosol occurred in advance of the time we investigated the relationship and/or the expression of ROR α may be dose dependent.

That mRNA of ROR α increased before that of MT1/MT2 receptors indicates a potential crosstalk between nuclear and membrane receptors, although the exact relationship, if any, between these events remains to be clarified. Unexpected, however, pinealectomy enhanced the rhythm of both mRNA and protein content of ROR α receptors. Considering the above discussion on the melatonin control of MT1/MT2 receptors, for the ROR α , we found that pinealectomy, which reduces plasma melatonin and increases its intracellular levels, induces ROR α while exogenous melatonin administration had no effect on ROR α receptors. Hence, it seems that the reduction in plasma melatonin levels triggers the signal to induce ROR α expression.

Administration of 10 mg/kg melatonin to SPx and Px rats did not induce significant changes in the mRNAs and protein levels of either MT1/MT2 or ROR α receptors. Moreover, luzindole treatment was also without effect of these receptors. However, a significant, dose-dependent induction of the expression of mRNA and protein of MT1/MT2 receptors was seen after the administration of 40 and 200 mg/kg of melatonin, with the later dose increasing their expression by 50%. This means that when melatonin is used in high doses for therapeutic purposes, there may be increased effects of the indoleamine due to this important induction of its receptors.

A connection between membrane and nuclear receptors for melatonin seems to exist. Melatonin receptors modulate several second messengers, including cAMP, cGMP, intracellular calcium (Ca²⁺), and phospholipids [12, 15, 51]. The activation of membrane receptors by melatonin decreases the intracellular levels of cAMP, resulting in a lowered activity of PKA that results in changes of the phosphorylation status of target proteins such as CREB [52]. Besides the cAMP-dependent cascade, melatonin receptors can couple to a stimulation of PLC-dependent signal transduction cascades and can activate PKC [53]. As CREB, ROR α is a phosphoprotein and its high constitutive activity can be modulated by a change of its phosphorylation state, so regulation of ROR α would be mediated through membrane receptor gene regulation by melatonin [54]. Under normal conditions, the nocturnal rise of melatonin, which is accompanied by an increase in its membrane receptors, binds to and activates them, decreasing the intracellular levels of cAMP. This results in a reduction in ROR α phosphorylation and a rise of its transcriptional activity. By this means, melatonin may regulate the transcriptional activity of ROR α . The reduction in the MT1/MT2 expression after pinealectomy, with the absence of circulating melatonin, increases cAMP levels, with the subsequent phosphorylation of ROR α and the reduction in its transcriptional activity. After pinealectomy we found that ROR α expression increases, a finding that may be compensation for the reduced melatonin. These observations agree with the fact that high levels of

melatonin, as produced after its administration to rats, did not influence ROR α expression.

In summary, our data show the presence of circadian rhythms in membrane and nuclear melatonin receptors, which are under the control of melatonin. The induction of the membrane receptors for melatonin after the administration of high doses of the indoleamine reinforces the fact that the therapeutic benefits of melatonin are not restricted to a low doses of this important molecule but may likely be achieved with a wide range of doses.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (RD06/0013/0008, PI08-1664), and from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P07-CTS-03135 and CTS-101).

References

1. REPERT SM, WEAVER DR, EBISAWA T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; **13**:1177–1185.
2. REPERT SM, GODSON C, MAHLE CD et al. 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.
3. REPERT SM, WEAVER DR, EBISAWA T et al. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett* 1996; **386**:219–224.
4. ZISAPEL N, LAUDON M. Dopamine release induced by electrical field stimulation of rat hypothalamus in vitro: inhibition by melatonin. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **104**:1610–1616.
5. SAVASKAN E, OLIVIERI G, MEIER F et al. Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J Pineal Res* 2002; **32**:59–62.
6. UZ T, ARSLAN AD, KURTUNCU M et al. The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; **136**:45–53.
7. DUBOCOVICH ML, MARKOWSKA M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; **27**:101–110.
8. AL-GHOUL WM, HERMAN MD, DUBOCOVICH ML. Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *NeuroReport* 1998; **9**:4063–4068.
9. FISCHER TW, SLOMINSKI A, ZMIJEWSKI MA et al. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp Dermatol* 2008; **17**:713–730.
10. SLOMINSKI A, FISCHER TW, ZMIJEWSKI MA et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 2005; **27**:137–148.
11. SLOMINSKI A, TOBIN DJ, ZMIJEWSKI MA et al. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab* 2008; **19**:17–24.
12. SLOMINSKI RM, REITER RJ, SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH N et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **351**:52–116.
13. DUBOCOVICH ML, HUDSON RL, SUMAYA IC et al. Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated

- phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res* 2005; **39**:113–120.
14. ROCA AL, GODSON C, WEAVER DR et al. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mella melatonin receptor. *Endocrinology* 1996; **137**:3469–3477.
 15. VANECEK J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; **78**:687–721.
 16. GUERRERO HY, GAUER F, SCHUSTER C et al. Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 2000; **71**:163–169.
 17. GAUER F, MASSON-PEVET M, STEHLE J et al. Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res* 1994; **641**:92–98.
 18. EKSTROM P, VANECEK J. Localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Neuroendocrinology* 1992; **55**:529–537.
 19. BENLOUCIF S, MASANA MI, DUBOCOVICH ML. Responsiveness to melatonin and its receptor expression in the aging circadian clock of mice. *Am J Physiol* 1997; **273**:R1855–R1860.
 20. WHEALIN JM, BURWELL RD, GALLAGHER M. The effects of aging on diurnal water intake and melatonin binding in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 1993; **154**:149–152.
 21. ACUNA-CASTROVIEJO D, PABLOS MI, MENENDEZ-PELAEZ A et al. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; **82**:253–256.
 22. ACUNA-CASTROVIEJO D, REITER RJ, MENENDEZ-PELAEZ A et al. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 1994; **16**:100–112.
 23. VILLEY I, DE CR, DeVILLARTAY P. RORgammaT, a thymus-specific isoform of the orphan nuclear receptor RORgamma / TOR, is up-regulated by signaling through the pre-T cell receptor and binds to the TEA promoter. *Eur J Immunol* 1999; **29**:4072–4080.
 24. BECKER-ANDRE M, WIESENBERG I, SCHAEAREN-WIEMERS N et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; **269**:28531–28534.
 25. ANDRE E, GAWLAS K, BECKER-ANDRE M. A novel isoform of the orphan nuclear receptor RORbeta is specifically expressed in pineal gland and retina. *Gene* 1998; **216**:277–283.
 26. HE YW, DEFTOS ML, OJALA EW et al. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* 1998; **9**:797–806.
 27. SMIRNOV AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001; **66**:19–26.
 28. HIROSE T, SMITH RJ, JETTEN AM. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**:1976–1983.
 29. SASHIHARA S, FELTS PA, WAXMAN SG et al. Orphan nuclear receptor ROR alpha gene: isoform-specific spatiotemporal expression during postnatal development of brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **42**:109–117.
 30. STEINMAYR M, ANDRE E, CONQUET F et al. Staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:3960–3965.
 31. VENEGAS C, GARCIA JA, ESCAMES G et al. Extrpineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 2012; **52**:217–227.
 32. BRAINARD GC, RICHARDSON BA, KING TS et al. The influence of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Brain Res* 1984; **294**:333–339.
 33. HOFFMAN RA, REITER RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat Rec* 1965; **153**:19–21.
 34. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248–254.
 35. STEHLE JH, SAADE A, RAWASHDEH O et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res* 2011; **51**:17–43.
 36. REITER RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **79**:C153–C158.
 37. CASSONE VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* 1990; **13**:457–464.
 38. REITER RJ, RICHARDSON BA, JOHNSON LY et al. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 1980; **210**:1372–1373.
 39. REITER RJ, CRAFT CM, JOHNSON JE Jr et al. Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology* 1981; **109**:1295–1297.
 40. SANCHEZ-HIDALGO M, GUERRERO MONTAVEZ JM, CARRASCO-SALMORAL MP et al. Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. *J Pineal Res* 2009; **46**:29–35.
 41. MASSON-PEVET M, BIANCHI L, PEVET P. Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein. *J Neurosci Res* 1996; **43**:632–637.
 42. SOTAK M, MRNKA L, PACHA J. Heterogeneous expression of melatonin receptor MT1 mRNA in the rat intestine under control and fasting conditions. *J Pineal Res* 2006; **41**:183–188.
 43. ZHAO H, PANG SF, POON AM. Variations of mt1 melatonin receptor density in the rat uterus during decidualization, the estrous cycle and in response to exogenous steroid treatment. *J Pineal Res* 2002; **33**:140–145.
 44. AKASHI M, TAKUMI T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 2005; **12**:441–448.
 45. AGEZ L, LAURENT V, PEVET P et al. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 2007; **144**:522–530.
 46. GUIOCHON-MANTEL A, LESCO P, CHRISTIN-MAITRE S et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J* 1991; **10**:3851–3859.
 47. LARDONE PJ, GUERRERO JM, FERNANDEZ-SANTOS JM et al. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J Pineal Res* 2011; **51**:454–462.
 48. KOMEILI A, O'SHEA EK. Nuclear transport and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**:355–360.
 49. METIVIER R, GAY FA, HUBNER MR et al. Formation of an hER alpha-COUP-TFI complex enhances hER alpha AF-1 through Ser118 phosphorylation by MAPK. *EMBO J* 2002; **21**:3443–3453.
 50. TREMBLAY A, TREMBLAY GB, LABRIE F et al. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 1999; **3**:513–519.

51. HARDELAND R, MADRID JA, TAN DX et al. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res* 2012; **52**:139–166.
52. WIESENBERG I, MISSBACH M, CARLBERG C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci* 1998; **12**:143–150.
53. WITT-ENDERBY PA, BENNETT J, JARZYŃKA MJ et al. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003; **72**:2183–2198.
54. LARDONE PJ, CARRILLO-VICO A, MOLINERO P et al. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**:516–52.

