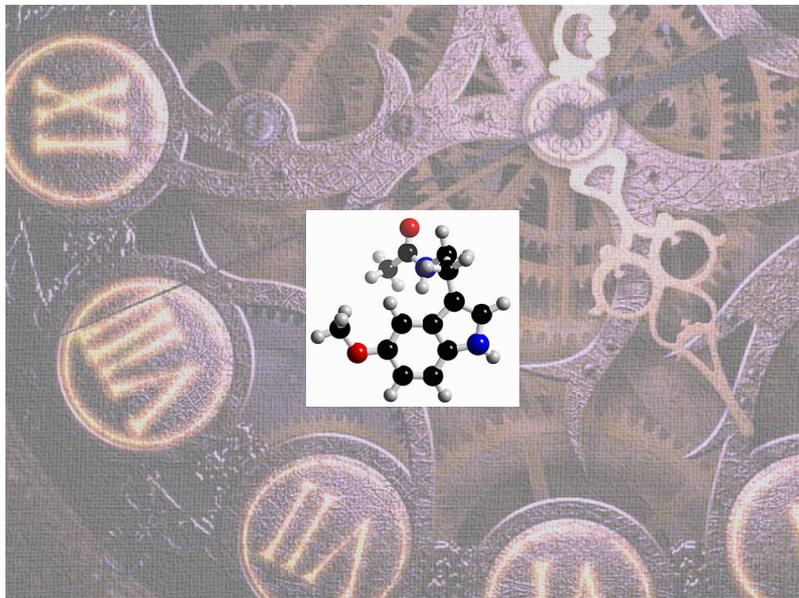


**ESTUDIO DE LAS RELACIONES METABÓLICAS Y  
FUNCIONALES ENTRE SEROTONINA Y  
MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL DE  
MAMÍFEROS. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE  
MICRODIÁLISIS *IN VIVO***



**TESIS DOCTORAL**  
**Lucinda Paz Valiñas**  
**2009**



**JESÚS M. MÍGUEZ MIRAMONTES**, Profesor Titular del Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud de la Universidad de Vigo, y

**MANUEL A. ALDEGUNDE VILLAR**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado “**Estudio de las relaciones metabólicas y funcionales entre serotonina y melatonina en la glándula pineal de mamíferos. Aplicación de técnicas de microdiálisis *in vivo***” que presenta Dña. Lucinda Paz Valiñas para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección. Considerando que se halla concluido, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Santiago de Compostela, a 17 de julio de 2009.

Fdo. Dr. Jesús M. Míguez Miramontes

Fdo. Dr. Manuel A. Aldegunde Villar



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Facultad de Biología) de la Universidad de Santiago de Compostela y fue parcialmente financiada en base a los proyectos: PGDIT03PXIB20001PR y INCITE08PXIB200053PR.





*A mis padres*

---



*Me gustaría agradecer a los Dres. D. Manuel A. Aldegunde y al D. Jesús M. Míguez por brindarme la oportunidad de iniciarme en este arduo, pero finalmente gratificante, mundo de la investigación. Así como la supervisión de este trabajo y de toda la ayuda prestada a lo largo de estos años.*

*En especial, quiero agradecer al Dr. Míguez todo el esfuerzo realizado y su colaboración para que esta Tesis Doctoral pudiese llegar a “buen puerto” desde su inicio en las fases experimentales, en el día a día (y noche a noche) del laboratorio, como en la fase de elaboración final. Muchas gracias por todo Suso!*

*A toda la gente del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Biología de Santiago de Compostela por su compañerismo y ayuda en todo el tiempo que estuve en el laboratorio.*

*A mis amigas/amigos por estar siempre ahí, animándome y apoyándome en todo momento, siempre que los necesité, y a todos los niveles: Vanessa, Nely, Lolí, Carmen (Cunque) y Pedro. Los dos últimos no se han cansado de preguntarme durante mucho tiempo: pero ¿Cuándo lees la Tesis? Ahora, por fin, puedo contestar a esa pregunta.*

*También me gustaría agradecer a Gerardo toda la confianza puesta en mí.*

*A toda mi familia, en especial a mi hermano Pepe y a mi tía Isabel.*

*A Swen, mein Schatz!*



LISTA DE ABREVIATURAS	15
<b>INTRODUCCIÓN</b>	19
1. ORGANIZACIÓN CIRCADIANA EN MAMÍFEROS. PAPEL DE LA MELATONINA	21
1.1. INTRODUCCIÓN A LOS RITMOS BIOLÓGICOS	21
1.2. EL SISTEMA CIRCADIANO: MECANISMOS BÁSICOS	22
1.3. INTEGRACIÓN CIRCADIANA DE LA INFORMACIÓN FÓTICA	23
1.4. SISTEMA CIRCADIANO Y MELATONINA	25
2. FISIOLÓGÍA DE LA GLÁNDULA PINEAL Y LA MELATONINA	28
2.1. ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA PINEAL DE MAMÍFEROS	28
2.2. INERVACIÓN DE LA GLÁNDULA PINEAL.	29
2.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA GLÁNDULA PINEAL DE MAMÍFEROS	31
2.3.1. Sustancias activas de la glándula pineal	31
2.3.2. Significado fisiológico de la melatonina	31
2.3.3. Lugares y mecanismos de acción de la melatonina	33
2.3.4. Efectos fisiológicos de la melatonina	35
3. METABOLISMO DE LAS INDOLAMINAS EN LA GLÁNDULA PINEAL DE MAMÍFEROS	41
3.1. SÍNTESIS DE INDOLES Y METOXINDOLES PINEALES	41
3.2. CONTROL DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL	44
3.2.1. Regulación adrenérgica	47
3.2.2. Regulación no adrenérgica	52
3.2.3. Regulación por hormonas esteroideas	56
4. PAPEL DE LA SEROTONINA EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA Y SECRETORA PINEAL	57
4.1. SEROTONINA INTRACELULAR Y SÍNTESIS DE MELATONINA	57
4.2. LA SEROTONINA COMO POTENCIAL FACTOR AUTOCRINO/PARACRINO PINEAL	58
<b>OBJETIVOS</b>	61
<b>TRABAJOS EXPERIMENTALES</b>	65
<b>TRABAJO EXPERIMENTAL 1. RITMOS DIARIOS DEL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS, INDOLAMINAS Y MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL DE LA RATA</b>	67
1. OBJETIVO	69
2. MATERIAL Y MÉTODOS	69
2.1. REACTIVOS	69
2.2. ANIMALES	70
2.3. TOMA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO	70
2.4. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AANAT	71

2.5. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD DE LA TP-OH	74
2.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LOS NIVELES DE NA, DA, 5-HTP, 5-HT, 5-HIAA Y NAS EN LA GLÁNDULA PINEAL	77
2.7. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE LOS NIVELES DE MELATONINA	80
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	82
3. RESULTADOS	82
<b>TRABAJO EXPERIMENTAL 2. PAPEL DE LA SÍNTESIS DE 5-HT EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL</b>	<b>89</b>
1. OBJETIVO	91
2. MATERIAL Y MÉTODOS	92
2.1. REACTIVOS	92
2.2 ANIMALES	92
2.3. EXPERIMENTO 1. ADMINISTRACIÓN DE BENSERAZIDA	92
2.3.1. <i>Administración de benserazida durante el día</i>	92
2.3.2. <i>Administración de benserazida durante la noche</i>	93
2.4. EXPERIMENTO 2. ADMINISTRACIÓN DE ISOPROTERENOL + BENSERAZIDA (DÍA)	94
2.5. EXPERIMENTO 3. ADMINISTRACIÓN DE L-TRIPTÓFANO	95
2.5.1. <i>Administración de L-triptófano durante el día</i>	95
2.5.2. <i>Administración de L-triptófano durante la noche</i>	96
2.6. TOMA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO	96
2.7. DETERMINACIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AANAT Y DEL CONTENIDO DE CATECOLES, INDOLES Y MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL	96
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	97
3. RESULTADOS	97
3.1. EXPERIMENTO 1. ADMINISTRACIÓN DE BENSERAZIDA	97
3.1.1. <i>Administración de benserazida durante el día</i>	97
3.1.2. <i>Administración de benserazida durante la noche</i>	103
3.2. EXPERIMENTO 2. EFECTO DEL ISOPROTERENOL SOLO Y/O COMBINADO CON BENSERAZIDA	107
3.3. EXPERIMENTO 3. ADMINISTRACIÓN DE L-TRIPTÓFANO	112
3.3.1. <i>Administración de L-triptófano durante el día</i>	112
3.3.2. <i>Administración de L-triptófano durante la noche</i>	118
<b>TRABAJO EXPERIMENTAL 3.</b>	<b>123</b>
<b>PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MICRODIÁLISIS PARA EL ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LA LIBERACIÓN DE MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL DE LA RATA. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS DIARIOS DE LOS NIVELES EXTRACELULARES DE INDOLES Y MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL DE LA RATA EN LIBRE MOVIMIENTO</b>	<b>123</b>
1. OBJETIVO	125

2. MATERIAL Y MÉTODOS	126
2.1. REACTIVOS	126
2.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	126
2.3. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE MICRODIÁLISIS VÁLIDA PARA ESTUDIOS PINEALES	127
2.3.1. <i>Fundamentos de las técnicas de microdiálisis intracerebral</i>	127
2.3.2. <i>La sonda de microdiálisis: modelos y características</i>	128
2.3.3. <i>Implantación de las sondas y medios de perfusión</i>	130
2.3.4. <i>Componentes del sistema de microdiálisis utilizado en los estudios</i>	131
2.4. ENSAYOS DE RECUPERACIÓN <i>IN VITRO</i> PARA DETERMINAR EL RENDIMIENTO DE LAS SONDAS DE MICRODIÁLISIS	134
2.4.1. <i>Implantación de la sonda en la glándula pineal de la rata</i>	135
2.5. EXPERIMENTO 1. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LOS CAMBIOS DIARIOS DE LOS NIVELES EXTRACELULARES DE 5-HT, 5-HIAA, NAS Y MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL DE LA RATA.	138
2.6. EXPERIMENTO 2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL AGONISTA B-ADRENÉRGICO L-ISOPROTERENOL	139
2.7. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LOS NIVELES DE 5-HT, NAS Y MELATONINA	140
2.7.1. <i>5-HT, 5-HIAA y NAS</i>	140
2.7.2. <i>Melatonina</i>	141
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	141
3. RESULTADOS	142
3.1. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> PARA DETERMINAR EL RENDIMIENTO DE LAS SONDAS	142
3.2. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRODIÁLISIS PARA SU APLICACIÓN A ESTUDIOS DE LA FUNCIÓN PINEAL	143
3.3. RITMOS DIARIOS DE LA LIBERACIÓN DE 5-HT, 5-HIAA, NAS Y MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL DE LA RATA	145
3.4. EFECTO DE LA APLICACIÓN LOCAL DE ISOPROTERENOL SOBRE LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS PINEALES	151
<b>TRABAJO EXPERIMENTAL 4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTAGONISTAS Y AGONISTAS SEROTONINÉRGICOS SOBRE EL CONTENIDO DE MELATONINA PINEAL</b>	155
1. OBJETIVO	157
2. MATERIAL Y MÉTODOS	158
2.1. REACTIVOS	158
2.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	158
2.3. EXPERIMENTO 1. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTAGONISTAS Y AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT <sub>2</sub>	158
2.4. EXPERIMENTO 2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE L-TRP Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT <sub>2</sub>	160
2.5. TOMA DE MUESTRAS Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS	160
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	161

3. RESULTADOS	161
3.1. EXPERIMENTO 1. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTAGONISTAS Y AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT <sub>2</sub>	161
3.2. EXPERIMENTO 2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE L-TRP Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT <sub>2</sub>	163
<b>TRABAJO EXPERIMENTAL 5. MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA <i>IN VIVO</i>. PAPEL DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>2</sub> PINEALES</b>	165
1. OBJETIVO	167
2. MATERIAL Y MÉTODOS	168
2.1. REACTIVOS	168
2.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	169
2.3. MICRODIÁLISIS PINEAL <i>IN VIVO</i>	169
2.4. TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS	170
2.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LOS NIVELES DE 5-HT, NAS Y MELATONINA	172
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	172
3. RESULTADOS	173
3.1. ADMINISTRACIÓN DE KETANSERINA 10 µM DURANTE 3 HORAS AL INICIO DE LA OSCURIDAD	173
3.2. ADMINISTRACIÓN DE KETANSERINA 10 µM DURANTE 6 HORAS EN LA PRIMERA MITAD DE LA NOCHE	175
3.3. ADMINISTRACIÓN DE KETANSERINA 10 µM DURANTE 6 HORAS EN LA SEGUNDA MITAD DE LA NOCHE	178
3.4. ADMINISTRACIÓN DE SDZ SER 082 10 µM DURANTE 6 HORAS EN LA PRIMERA MITAD DE LA NOCHE	180
3.5. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON KETANSERINA Y SDZ-SER 082 SOBRE LA CANTIDAD TOTAL DE 5-HT, NAS Y MELATONINA LIBERADAS A LA NOCHE EN LA GLÁNDULA PINEAL	182
<b>DISCUSIÓN</b>	185
1. VARIACIONES DIARIAS DEL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS, INDOLAMINAS Y DERIVADOS 5-METOXINDÓLICOS EN LA GLÁNDULA PINEAL	187
2. PAPEL DE LA SÍNTESIS Y DISPONIBILIDAD CITOPASMÁTICA DE SEROTONINA PINEAL EN LA PRODUCCIÓN RÍTMICA DIARIA DE MELATONINA	194
3. MONITORIZACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS PINEALES: APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE MICRODIÁLISIS PINEAL EN LA RATA EN LIBRE MOVIMIENTO	201
4. LA SEROTONINA EXTRACELULAR COMO POTENCIAL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA. IMPLICACIÓN DE RECEPTORES 5-HT <sub>2</sub> PINEALES	208
<b>CONCLUSIONES</b>	215
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	221

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT:** serotonina
- 5-HTP:** 5-hidroxitriptófano
- AANAT:** arilalquilamina-N-acetiltransferasa
- AC:** adenilato ciclasa
- ACh:** acetilcolina
- AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- CRE:** elemento de respuesta al AMPc
- CREB:** proteína de unión a CRE
- CT:** tiempo circadiano
- DMH:** hipotálamo dorsomedial
- ENK:** encefalinas
- FSH:** hormona estimuladora del folículo
- GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- GAD:** glucosa descarboxilasa
- GCS:** ganglio cervical superior
- GLU:** glutamato
- GRP:** péptido liberador de gastrina
- GTH:** tracto geniculo-hipotalámico
- GTP:** guanosin trifosfato
- HIOMT:** hidroxindol-O-metiltransferasa
- i.p.:** intraperitoneal
- ICER:** represor temprano de AMPc inducible
- IGL:** laminilla del cuerpo geniculado lateral
- IML:** columna intermediolateral de la espina dorsal

## Abreviaturas

---

**IP<sub>3</sub>**: inositoltrifosfato  
**ISO**: isoproterenol  
**IUPHAR**: *Union of Basic and Clinical Pharmacology*  
**L-AAD**: L-aminoácido-aromático-descarboxilasa  
**LH**: hormona luteinizante  
**LHRH**: Hormona liberadora de hormona luteinizante  
**L-Trp**: L-Triptófano  
**MAO**: Monoamina oxidasa  
**NA**: noradrenalina  
**NAS**: N-acetilserotonina  
**NGL**: núcleo geniculado lateral  
**NMDA**: N-metil-D-aspartato  
**NPY**: neuropéptido Y  
**NSQ**: núcleo supraquiasmático  
**OT**: oxitocina  
**PACAP**: polipéptido activador de la adenilato ciclasa  
**PBS**: tampón fosfato  
**PCA**: ácido perclórico  
**pCPA**: p-clorofenil-alanina  
**PHI**: péptido histidina isoleucina  
**PKC**: proteína quinasa C  
**PLC**: fosfolipasa C  
**NPV**: núcleo paraventricular del tálamo  
**RM**: rafe mediano  
**rpm**: revoluciones por minuto  
**RTH**: tracto retinohipotalámico  
**SN**: secretoneurina

**SP:** sustancia P

**SS:** somatostatina

**TP-OH:** triptófano hidroxilasa

**VIP:** péptido vasoconstrictor intestinal

**VP:** vasopresina



## INTRODUCCIÓN



## 1. ORGANIZACIÓN CIRCADIANA EN MAMÍFEROS. PAPEL DE LA MELATONINA

### 1.1. Introducción a los ritmos biológicos

La rotación de la Tierra sobre sí misma y alrededor del sol expone a los diferentes organismos a variaciones diarias y anuales en diversos parámetros de su entorno ambiental, en particular la temperatura, la luminosidad y la humedad. Estas variaciones ambientales tienen una enorme importancia para la supervivencia de los organismos, por lo que estos deberán adaptar tanto sus funciones fisiológicas como su comportamiento a dichas variaciones. De esta forma, para que esta adaptación pueda llevarse se requiere la existencia de sistemas que les permitan: *i)* reconocer las variaciones del ambiente, *ii)* traducirlas en mensajes (nerviosos, hormonales) legibles por el organismo, y *iii)* inducir las respuestas fisiológicas y comportamentales que posibiliten la adaptación a tales variaciones.

La Vida en la Tierra ha desarrollado una amplia variedad de sistemas de organización temporal que continuamente ajustan la fisiología del organismo de forma eficiente con las variaciones ambientales rítmicas. Estos sistemas implican la presencia de un/os **oscilador(es) endógeno(s)** y de **estructuras** que permiten la **sincronización de estos osciladores** con las variaciones del ambiente y la **transmisión de la información temporal** a la totalidad del individuo. Las variaciones rítmicas de las funciones biológicas así estructuradas no pueden ser consideradas como fenómenos casuales ni meros seguimientos pasivos, sino que constituyen auténticos **ritmos biológicos**. Una característica definitoria de los mismos es su *persistencia en condiciones ambientales constantes*, lo que indica la presencia de un *oscilador o reloj endógeno interno* que controla la periodicidad del ritmo. Por ello reciben la denominación de **ritmos endógenos** (Halberg, 1960; Pittendrigh, 1960, 1972; Cardinali et al., 1994; Saper et al., 2005).

Existen esencialmente dos tipos de ritmos endógenos: los **ritmos circadianos** (periodo de alrededor de 24 horas) y los **ritmos estacionales** (periodo de alrededor de un año). Una menor consideración, aunque no por ello una menor importancia biológica, suelen tener los **ritmos ultradianos** (período inferior a las

20 horas) y los **ritmos infradianos** (período superior a las 28 horas). Entre estos últimos se incluyen los propios ritmos estacionales o anuales (Halbert y Reinberg, 1967).

## 1.2. El sistema circadiano: mecanismos básicos

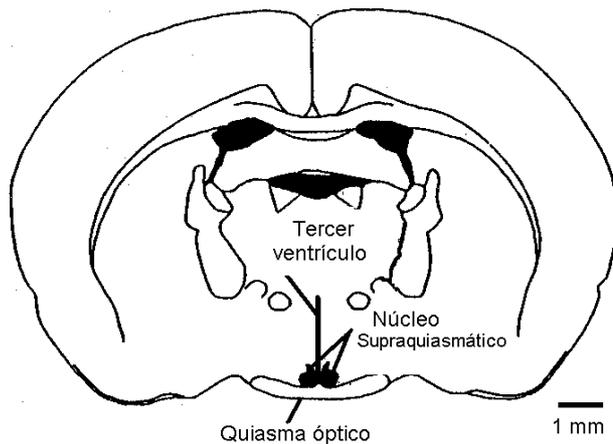
Los ritmos circadianos están determinados genéticamente y soportados por estructuras que constan de: 1) una o varias entradas que aportan las informaciones sincronizadoras, 2) un generador de oscilaciones endógenas, y 3) varias vías de salida que permiten al oscilador regular diferentes ritmos bioquímicos, fisiológicos y comportamentales; algunos de esos efectores podrían ejercer un efecto de retrocontrol sobre el oscilador (Block y Page, 1978; Hall, 1990; Rensing y Hardeland, 1990; Takahashi et al., 1993; Hastings, 1997).

En relación al mecanismo **oscilador interno**, también denominado como **marcapasos o reloj biológico**, éste se encarga de generar las variaciones circadianas. De manera breve se puede señalar que la sincronización del ritmo circadiano se produce de la siguiente forma: en cada fase del ciclo luz/oscuridad (LO), el reloj endógeno es sensible de manera diferente a la luz, avanzando o retrasando su ritmo, de forma que el período del reloj ( $\tau$ ) se corresponda con el periodo del ciclo de luz (T). Un ciclo luz/oscuridad, por tanto, controla no sólo el **ritmo** del reloj sino también la **fase**, de forma que las actividades del individuo sucedan en el momento apropiado del día (Saper et al., 2005).

En los vertebrados, la presencia de osciladores circadianos se ha demostrado en al menos tres estructuras: la retina, el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) y el órgano pineal (Turek, 1994; Hastings, 1997; Falcón, 1999). En los mamíferos hay claras evidencias que el NSQ contiene el oscilador circadiano que controla la mayoría de los ritmos del organismo (Moore y Klein, 1974; Turek, 1994; Vansteensel et al., 2008).

El NSQ constituye una pequeña estructura pareada que contiene aproximadamente 10.000 neuronas y se sitúa justo por encima del quiasma óptico y a los lados del tercer ventrículo. (Moore et al., 2002). Las neuronas del NSQ son fundamentalmente GABA-érgicas, aunque también hay un alto

contenido de neuropéptidos. De hecho, la presencia de neuropéptidos ha permitido establecer una división del NSQ en dos regiones: la **ventrolateral** con neuronas magnocelulares inmunorreactivas al péptido intestinal vasoactivo (VIP), al péptido liberador de gastrina (GRP) y al péptido histidina isoleucina (HIP), y la **dorsomedial** constituida por neuronas parvocelulares con fuerte inmunoreactividad a la vasopresina (VP) y somatostatina (SS). Otros neuropéptidos (como la angiotensina II, la colecistoquinina, las neurotensina, las encefalinas o la angiotensina II) están presentes sin una distribución específica (Reuss, 1996; Moore et al., 2002).



**Fig. 1.** Localización anatómica del NSQ en el cerebro de la rata (Tomado de Pellegrino et al., 1979).

### 1.3. Integración circadiana de la información fótica

En los mamíferos los ritmos son elaborados, sincronizados y transmitidos por estructuras nerviosas integradas en el eje retino-hipotálamico-pineal, el cual en última instancia controla la secreción rítmica de melatonina (Simonneaux y Ribelayga, 2003). El principal factor ambiental (*zeitgeber*) que permite ajustar y sincronizar los ritmos circadianos es el ciclo diario de luz/oscuridad, aunque se han propuesto que otros factores ambientales, tales como la temperatura, la alimentación, las interacciones sociales, etc., también son susceptibles de participar en el ajuste de estos ritmos (Pévet et al., 1996).

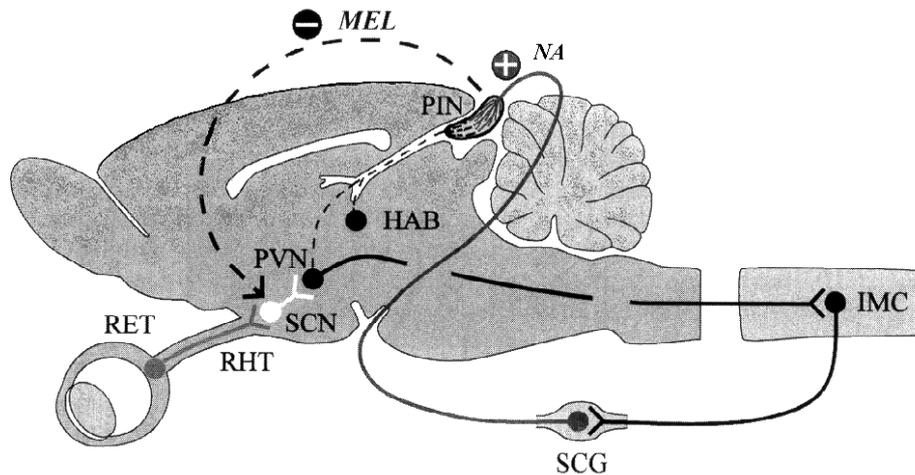
Los efectos moduladores de la luz sobre la actividad autónoma del NSQ se producen a través de dos vías nerviosas:

- ✓ **el tracto retinohipotalámico:** es la principal vía de entrada de información fótica y su integridad es necesaria para el ajuste de los ritmos circadianos. Esta constituido por una proyección directa (vía el nervio óptico) desde las células ganglionales de la retina (clase II o W) a la zona ventrolateral del NSQ del hipotálamo (Pickard, 1985). Esta vía se describió hace más de 30 años (Moore y Lenn, 1972), y hoy en día se sabe que los principales neurotransmisores implicados son el glutamato (Ding et al., 1997) y el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) (Hannibal et al., 1997).
- ✓ **tracto geniculohipotalámico:** proyección retinal indirecta que accede al NSQ a través de células de la hoja intergenicular del núcleo geniculado lateral (Hickey y Spear, 1976; Pickard, 1985). Se ha demostardo que todas las neuronas finales de esta vía liberan GABA y un gran porcentaje de ellas neuropéptido Y (Moore y Card, 1994).

Además de estas dos vías fóticas principales, se conocen proyecciones desde diversas áreas cerebrales (septum, áreas hipotalámicas, hipocampo, etc.) al NSQ, las cuales portan información fundamentalmente no fótica. De ellas destaca la proyección serotoninérgica desde los núcleos mesencefálicos del rafe mediano y dorsal (Reuss, 1996). Esta **vía rafe-NSQ**, responsable de las elevadas concentraciones de serotonina en el NSQ, no es esencial para la ritmicidad circadiana, pero podría tener un papel modulador de la actividad del marcapasos (Morin, 1999).

Estudios recientes sugieren que la información del reloj principal podría dirigirse a un número limitado de áreas neuronales diana que estarían en relación con una gran diversidad de mecanismos neuroendocrinos y con el sistema nervioso autónomo (Kalsbeek y Buijs, 2002; Kalsbeek et al., 2004). La principal proyección eferente del NSQ termina en el núcleo paraventricular del hipotálamo, aunque también hay conexiones con el hipotálamo dorsoventral, el área preóptica, el núcleo paraventricular del tálamo y el núcleo geniculado lateral. El principal neurotransmisor implicado en estas

proyecciones es el GABA, pero también son frecuentes péptidos tales como la vasopresina, la angiotensina, el VIP y el GRP (Moore et al., 2002).



**Fig. 2.** Sistema fotoneuroendocrino de la rata. Células ganglionales de la retina (RET) inervan el núcleo supraquiasmático hipotalámico (SCN) vía tracto retinohipotalámico (RHT). El SCN proyecta al núcleo paraventricular (PVN) que da lugar a dos vías pinealopitales: a) la inervación central (línea discontinua) llega a la glándula pineal directamente por esta vía; fibras desde el núcleo habenuar (HAB) se unen a esta proyección, b) el PVN forma una conexión monosináptica a la columna intermedial (IMC) en la médula espinal, las cuales llegan a fibras nerviosas preganglionales simpáticas que proyectan al ganglio superior cervical (SCG). Éste es el origen de las fibras nerviosas postganglionales que inervan a la glándula pineal (PIN) y liberan el neurotransmisor noradrenalina (NA) de una manera circadiana (Modificado de Korf et al., 1998).

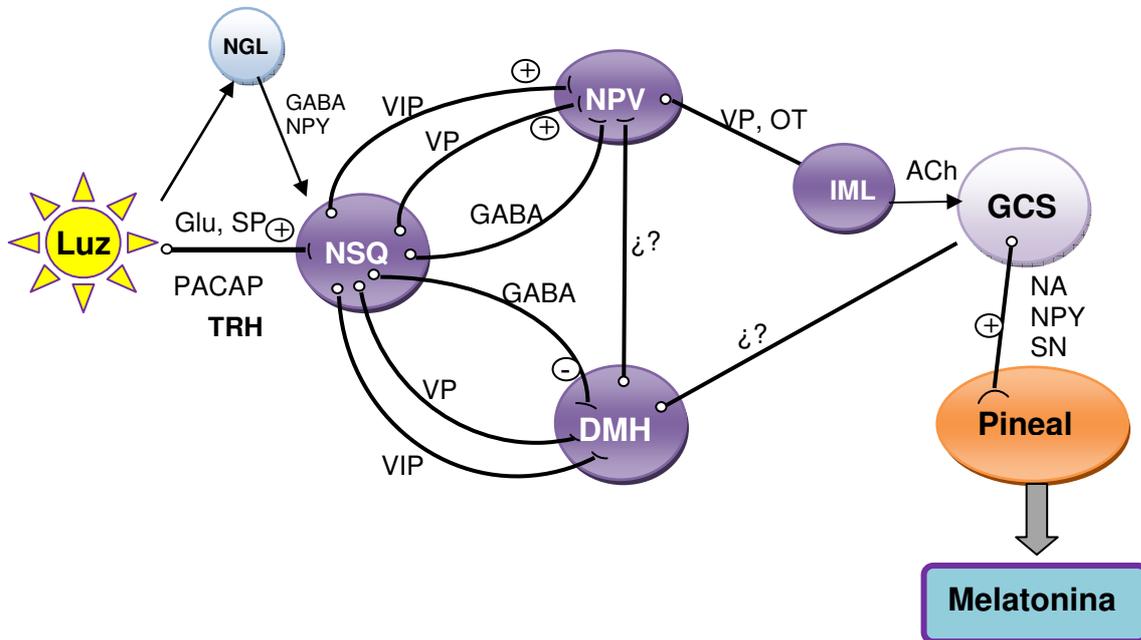
#### 1.4. Sistema circadiano y melatonina

Entre las actividades efectoras del reloj circadiano destaca, sin duda, la **regulación de la actividad endocrina de la glándula pineal**. Esta regulación provoca la existencia de un claro ritmo circadiano en la **síntesis y secreción de la principal hormona pineal, la melatonina**, con elevados niveles de melatonina circulante durante la noche y bajos, casi nulos, durante el día (Wurtman et al., 1963; Quay, 1964; Binkley, 1983). De esta forma, la melatonina

puede ser considerada como un mediador circadiano utilizado por el NSQ para transmitir y/o imponer una ritmicidad diaria a las estructuras sensibles a la melatonina (Reiter, 1993; Arendt, 1998a).

La regulación de la síntesis circadiana de melatonina se lleva a cabo mediante una vía neuronal que proyecta desde el NSQ al núcleo paraventricular (NPV) y a la parte dorsomedial del hipotálamo y desde allí a las células de la columna intermediolateral (segmentos T1-T3) de la médula espinal. Los axones de estas neuronas alcanzan el GCS, del cual se origina una densa inervación postganglionar simpática que llega a la glándula pineal (Kappers, 1960; Korf et al., 1990). Parece claro que el NPV es una estación de relevo fundamental entre el NSQ y la pineal. En este sentido, se sabe que las neuronas del NPV responden a la estimulación eléctrica del NSQ (Hermés et al., 1994) y que la infusión de VIP y VP en el NPV estimula la secreción de melatonina (Kalsbeek et al., 1996). También las proyecciones GABA-érgicas desde el NSQ al NPV/DMH parecen jugar un importante papel en el control de la síntesis de melatonina. Así, la infusión de agonistas de GABA durante las primeras horas de la oscuridad impide el aumento nocturno de melatonina, un efecto similar al que produce la exposición a la luz (Kalsbeek et al., 1996). También se ha demostrado que el efecto inhibitorio de la luz sobre la síntesis nocturna de melatonina es contrarrestado por la infusión de antagonistas de GABA a nivel del NPV (Kalsbeek et al., 1999; 2000), lo que corrobora el importante papel de este neurotransmisor en la parte final de la vía de control de la actividad pineal por la luz (Korf y von Gall, 2006).

Existen claras evidencias de que la NA es el principal neurotransmisor liberado por las neuronas postganglionares simpáticas que inervan la glándula pineal en mamíferos (Brownstein y Axelrod, 1974; Klein et al., 1996). Durante la noche, se produce un fuerte incremento en la actividad de las neuronas postganglionares que se sigue de un aumento en la síntesis (Brownstein y Axelrod, 1974; Craft et al., 1984) y liberación de la NA en las inmediaciones de los pinealocitos (Drijfhout et al., 1996a), lo que resulta en un aumento drástico de la producción de melatonina. Este aspecto será tratado más en detalle en el siguiente apartado.



**Fig. 3.** Principales proyecciones eferentes desde el núcleo supraquiasmático (NSQ) relacionadas con la producción de melatonina en la glándula pineal. En muchos casos la composición neuroquímica no es del todo conocida. DMH: hipotálamo dorsomedial; GCS: ganglio cervical superior; IML: columna intermedial de la espina dorsal; NGL: núcleo geniculado lateral; NPV: núcleo paraventricular del tálamo; TRH: tracto retino-hipotalámico; Ach: acetilcolina; GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico; Glu: glutamato; NA: noradrenalina; OT: oxitocina; PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa; NPY: neuropéptido Y; SN: secretoneurina; ;SP: sustancia P; VIP: péptido vasoconstrictor intestinal; VP: vasopresina; (Modificado de Simonneaux y Ribelayga, 2003).

## 2. FISIOLÓGÍA DE LA GLÁNDULA PINEAL Y LA MELATONINA

### 2.1. Estructura de la glándula pineal de mamíferos

La glándula pineal de los mamíferos es una estructura parenquimatosa sólida rodeada por una cápsula de tejido conectivo y por la piamadre. En muchos mamíferos, incluido el hombre, se sitúa bajo el *esplenium* del cuerpo calloso. Los roedores son una excepción y tienen la glándula pineal más superficial y embebida en la duramadre a nivel de la confluencia de los senos venosos. La glándula pineal se conecta con el cerebro mediante un tallo unido dorsalmente a la comisura habenuar y ventralmente a la comisura posterior. La cavidad entre el techo ventral y el dorsal del tallo es el receso pineal del tercer ventrículo (Korf et al., 1998).

A nivel celular, la glándula pineal de los mamíferos es un órgano sencillo formado fundamentalmente por dos tipos de células: **i) Los pinealocitos**, células predominantes que producen las sustancias típicas de la glándula. Los pinealocitos pueden formar cordones, paquetes y ocasionalmente folículos. **ii) Las células de la glía**, fundamentalmente astrocitos. Además, el parénquima pineal es atravesado por una red de fibras nerviosas de distintos orígenes y por abundante tejido conjuntivo (Pévet, 1983).

Los pinealocitos en sentido estricto son el principal componente celular de la glándula pineal de mamíferos. Aparecen como células mono-, bi-, y multipolares (Korf et al., 1998) y han perdido la sensibilidad directa a la luz. Respecto a ello, hay estudios concretos que demuestran que la glándula pineal de mamíferos no contiene 11-*cis* retinal, el grupo prostético esencial para un funcionamiento fotopigmentario (Foster et al., 1989; Kramm et al., 1993). Sin embargo, estudios moleculares han revelado sorprendentes similitudes entre la cascada de fototransducción basada en la rodopsina y el sistema de señales transmembrana que media el estímulo  $\beta$ -adrenérgico que permite regular la actividad endocrina de la glándula pineal de mamíferos. Por otra parte, los diferentes tipos de pinealocitos expresan a la vez una serie de marcadores típicos de neuronas y de

células endocrinas. Por consiguiente, los pinealocitos pueden ser considerados como neuronas especializadas (Korf et al., 1998).

## 2.2. Inervación de la glándula pineal

En los mamíferos, la actividad de la glándula pineal es controlada de manera primordial por mecanismos nerviosos, aunque también influyen diversos factores hormonales así como ciertos productos derivados de la actividad de la propia glándula pineal (ver apartado 2.3).

**La inervación simpática** (noradrenérgica) es el principal mecanismo nervioso de regulación de la función de la glándula pineal de mamíferos, en particular de la síntesis de melatonina. La noradrenalina (NA) es el neurotransmisor liberado desde las fibras simpáticas postganglionares durante la noche y su efecto produce una estimulación de la síntesis de melatonina en todas las especies de mamíferos estudiadas.

La inervación simpática pineal fue descrita por primera vez por Cajal (1904) en el ratón, mientras que Kappers en el año 1960 demostró formalmente su existencia en la rata, así como su origen en el GCS. La primera demostración de la presencia de NA en la glándula pineal de la rata se debe a Falck-Hillarp et al. (1962). En la glándula pineal de la rata (Zhang et al., 1991) y el carnero (Cozzi et al., 1992) la mayor parte de las fibras son inmunorreactivas a tirosina-hidroxilasa (TH, enzima limitante de la síntesis de NA) y desaparecen tras la extirpación del GCS, confirmando su origen ganglionar, mientras que una pequeña proporción parece ser de origen central. Las terminaciones noradrenérgicas pineales también podrían contener otros neurotransmisores como dopamina (DA), serotonina (5-HT), VIP y NPY (ver apartado 3).

Las fibras noradrenérgicas penetran por la parte distal de la glándula (nervios coronarios) y discurren paralelamente a los vasos sanguíneos. Algunas penetran en el parénquima pineal, localizándose entre los pinealocitos (Owman, 1965). Las fibras simpáticas no suelen formar verdaderas sinapsis con los pinealocitos, aunque podría existir algún tipo de relación sináptica. De hecho, estudios

inmunocitoquímicos han revelado que los pinealocitos de mamíferos extienden procesos dentro del espacio perivascular formando engrosamientos terminales próximos espacialmente a las fibras nerviosas simpáticas (Redecker, 1993). Los contactos no parecen establecerse célula a célula, pero podrían jugar un papel importante en el acoplamiento que tiene lugar entre pinealocitos por medio de uniones tipo gap.

En algunos roedores, las fibras simpáticas se extienden hacia la parte más profunda de la glándula pineal y alcanzan el núcleo habenular mediano (Björklund et al., 1972), lo que sugiere que este núcleo representa un área de transición que contiene pinealocitos y neuronas convencionales, y que conecta a la glándula pineal con el techo diencefálico (Korf et al., 1990).

La presencia de **inervación parasimpática** en la glándula pineal de mamíferos se conoce desde hace algún tiempo. Se han descrito aferencias nerviosas colinérgicas en la glándula pineal de la rata (Eranko et al., 1970), el hurón (David y Herbert, 1973), el conejo (Romijn, 1975), la vaca (Phansuwan-Pujito et al., 1991) y el mono (David y Kumar, 1978). La existencia de receptores colinérgicos y la puesta en evidencia de respuestas fisiológicas siguiendo su activación (Schenda y Vollrath, 1998a; Wagner et al., 2000) confirman un papel relevante de la acetilcolina en la regulación de las funciones de la glándula pineal en mamíferos.

La existencia de una **inervación central** de la glándula pineal ha sido puesta de manifiesto en mamíferos usando técnicas neuroanatómicas y electrofisiológicas (Semm y Demaine, 1983; Reuss et al., 1985). En algunos casos, la persistencia de estas fibras tras ablación del GCS fue, sin duda, un dato que contribuyó a reafirmar su origen central (Korf et al., 1998). El origen de estas fibras parece ser diverso, incluyendo el núcleo habenular medio y lateral, el núcleo hipotalámico paraventricular, la lámina intergeniculada lateral (Mikkelsen y Moller, 1990; Mikkelsen et al., 1991), el área pretectal y el núcleo de la comisura posterior. Los neurotransmisores implicados en estas fibras centrales no son del todo bien conocidos, pero se han propuesto diversos neuropéptidos (OT, VIP, VP, NPY) así como 5-HT y catecolaminas (Matsuura y Sano, 1983; Zhang et al., 1991).

En todo caso, en los mamíferos la inervación central de la glándula pineal es escasa y de mucha menor relevancia funcional que la inervación simpática. En los roedores puede comprender unas 100 fibras nerviosas, mientras que en los no roedores (oveja, gato, perro, vaca, mono, humanos, etc.), hay evidencias de una inervación pinealopetal más prominente (Moller y Baeres, 2002).

## **2.3. Papel fisiológico de la glándula pineal de mamíferos**

### **2.3.1. Sustancias activas de la glándula pineal**

La glándula pineal sintetiza diferentes indolaminas entre las cuales destaca la serotonina (5-HT), cuya concentración en la glándula es la mayor encontrada en una estructura cerebral (Saavedra et al., 1973). La 5-HT sirve como precursor para diversas rutas metabólicas (Klein et al., 1981; Binkley, 1983). Además, también se sintetizan varios derivados 5-metoxindólicos que pueden desempeñar un papel fisiológico, especialmente en la regulación del desarrollo sexual y la reproducción (Reiter, 1980; Pevet et al., 1981). De entre ellos, la melatonina es el más activo fisiológicamente y el que más interés científico ha despertado.

Se ha descrito también la presencia de diferentes péptidos en la glándula pineal de mamíferos, aunque su origen y función no están claramente establecidos (Ebadi et al., 1989). Pévet (1983) establece tres grandes clases en función de su origen: los péptidos originados en fibras nerviosas (neuropéptidos), los que proceden de la circulación general y los sintetizados en la propia glándula pineal. Los primeros y segundos podrían jugar un papel en la regulación metabólica de la glándula pineal, mientras que los terceros estarían relacionados con acciones autocrinas y paracrinas.

### **2.3.2. Significado fisiológico de la melatonina**

La glándula pineal presenta la misma función en todas las especies estudiadas hasta la fecha. Esencialmente transporta información que concierne a los ciclos día/noche para la organización de los ritmos circadianos y estacionales de las

funciones fisiológicas. El patrón diario de secreción constituye la base del mensaje de la melatonina.

La relación de la glándula pineal con el sistema circadiano parece ser jerárquicamente más importante en invertebrados inferiores que en mamíferos. En estos últimos, el ritmo diario de la síntesis de melatonina en la glándula pineal tiene localizada la acrofase siempre durante la noche (Underwood y Goldman, 1987; Korf et al., 1998). El mensaje endocrino de la melatonina transmite por tanto la información sobre las variaciones diarias del ambiente luminoso, de forma que el alargamiento o acortamiento de la duración de la noche se caracteriza por un alargamiento o acortamiento de la duración del pico nocturno de melatonina. Así, la duración del pico nocturno de melatonina es corta en verano (noches cortas) y largo en invierno (noches largas) (Underwood y Goldman, 1987; Reiter, 1991).

La importancia de la duración del pico nocturno se ha puesto en evidencia en experimentos de inyecciones repetidas o de perfusión de melatonina en animales pinealectomizados, los cuales reproducen el efecto del fotoperiodo sobre la actividad gonadal (Carter y Goldman, 1983). Se ha especulado con la posibilidad de que sea la cantidad total de melatonina producida durante la noche (*hipótesis de la duración*) la que transmita la información fotoperiódica, mientras que otros autores hipotetizan que es la presencia o ausencia de melatonina en un momento específico de sensibilidad, la que desencadena una respuesta fisiológica (*hipótesis de la coincidencia*). Ese ritmo diario de sensibilidad de la melatonina podría depender directamente de la actividad del NSQ (Pévet et al., 1996), o bien indirectamente de una acción de la propia melatonina sobre el NSQ (Pitrosky et al., 1995).

La amplitud del pico nocturno de melatonina también podría ser un parámetro importante en el mensaje melatoninérgico. Se han descrito variaciones anuales en la amplitud del pico nocturno de melatonina en diferentes especies de roedores, tales como la rata y el hámster (Vivien-Roels et al., 1992; Míguez et al., 1995a, 1996a), no roedores como el caballo (Guerin et al., 1995), la cabra (Kanematsu et al., 1994) y el cerdo (McConnell y Ellendorf, 1987), así como en el humano (Hofman et al., 1995). Algunos de estos estudios han probado también

que otros factores diferentes del fotoperiodo, como la temperatura, pueden modular tanto la amplitud del pico nocturno de melatonina como el efecto de la luz ambiental sobre la actividad pineal (Vivien-Roels et al., 1999).

### 2.3.3. Lugares y mecanismos de acción de la melatonina

El mensaje hormonal liberado por la glándula pineal es distribuido por la circulación sistémica a todas las estructuras centrales y periféricas, ejerciendo sus acciones celulares mediante dos mecanismos diferentes: *i*) actuando sobre receptores específicos de membrana, y *ii*) mediante mecanismos intracelulares que podrían implicar receptores nucleares.

- **Receptores de la membrana celular**

La caracterización de los sitios de unión de la melatonina a nivel de la membrana celular se ha realizado inicialmente empleando radioligandos como la [<sup>3</sup>H]-melatonina y la 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonina, que han permitido localizar diferentes tejidos como potenciales diana para la hormona. La primera clasificación diferenciaba dos tipos de receptores (ML1 y ML2) basándose en la unión de la 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonina (Dubocovich et al., 1998; Zlotos, 2005), y de sus propiedades farmacológicas y cinéticas. Los posteriores estudios de clonaje molecular han permitido diferenciar dentro de los receptores ML1 de mamíferos dos subtipos de receptores conocidos como Mel<sub>1A</sub> y Mel<sub>1B</sub> (Reppert et al., 1994; Sugden et al., 1997), mientras que ML2 se denominó como Mel 2. Con el fin de homogenizar la nomenclatura usada para los receptores de melatonina, la *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR) ha aceptado denominar a los receptores Mel<sub>1A</sub> y Mel<sub>1B</sub> como MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, respectivamente, siendo ambos miembros de la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (Dubocovich et al., 2003). Ambos receptores están acoplados a la inhibición de la adenilato ciclasa y posiblemente a la hidrólisis de fosfatidilinositol a través de la activación de una proteína G sensible a toxina *pertusis*. Asimismo, en la retina y cerebro de especies no mamíferas como el pez cebra, *Xenopus* y en pollo, se ha descrito un tercer

subtipo de receptor llamado Mel 1c (Reppert et al., 1995; Park et al., 2007; Audinot et al., 2008).

En mamíferos, el ARNm del receptor  $MT_1$  ha sido detectado en la *pars tuberalis* de la hipófisis, el NSQ y otras partes del hipotálamo, cerebelo y cortex cerebral (Dubocovich et al., 2003). Mediante estudios farmacológicos se ha caracterizado este receptor en las arterias caudales de la rata (Ting et al., 1999). Asimismo, está presente en el cerebro de aves (Reppert et al., 1995) y peces (Gaildrat y Falcón, 1999; Mazurais et al., 1999). Entre las funciones que parece mediar este receptor destaca la modulación de los ritmos circadianos y estacionales, incluyendo la actividad reproductiva (Dubocovich et al., 2005). A nivel del NSQ, la activación de los receptores  $MT_1$  por la melatonina es la responsable de la inhibición aguda de la tasa de descarga neuronal (Dubocovich et al., 2003).

La activación de los receptores  $MT_2$ , al igual que los  $MT_1$ , inhibe de manera primordial la adenilato ciclasa y la síntesis de AMPc. El clonaje del receptor  $MT_2$  ha permitido conocer su expresión en la retina de mamíferos, donde podría actuar mediando las acciones intraoculares de la melatonina, incluyendo la inhibición de la liberación de dopamina (Reppert, 1997; Dubocovich et al., 1998). Aunque los estudios farmacológicos habían ligado este subtipo a algunos efectos de la melatonina sobre el sistema circadiano, estudios recientes usando ratones *knockout* para el receptor  $MT_2$  parecen descartar esa posibilidad, dado que no se ven alterados los efectos diarios y estacionales de la melatonina (Weaver et al., 1996). Este receptor también parece estar presente en la arteria caudal de la rata (Masana et al., 2002).

Finalmente, el empleo de estudios con radioligandos muy selectivos han permitido saber que el receptor inicialmente denominado como ML2 se trata de una quinona reductasa, por lo que se ha propuesto que estos sitios de unión no son auténticos receptores (Nosjean et al., 2000), siendo su denominación actual la de lugares de unión  $MT_3$ .

- **Receptores nucleares y otros mecanismos intracelulares**

Se han descrito presumibles lugares nucleares de unión para la melatonina en algunos tipos celulares. Se trataría de un receptor huerfano denominado como "receptor retinoide Z" capaz de unir melatonina *in vitro* y a elevadas concentraciones (Becker-André et al., 1994; Wiesenberg et al., 1995). Se han caracterizado dos tipos: el RZT $\alpha$ , localizado a nivel periférico, fundamentalmente en hígado de rata y linfocitos humanos, y el RZR $\beta$  localizado a nivel central y que se expresa con una elevada densidad a nivel del hipotálamo, tálamo, retina y glándula pineal de la rata, en los linfocitos B humanos, y en el cerebro de rata. En la actualidad se está evaluando la posibilidad de que la melatonina sea realmente un ligando endógeno para esos receptores.

La alta liposolubilidad de la melatonina ha llevado a postular una variedad de potenciales acciones intracelulares de la hormona no mediadas por receptores de membrana (Reiter, 1991), lo que implicaría que la melatonina podría ejercer una acción ubicua en todas las células del organismo. Entre los mecanismos propuestos incluyen un efecto inhibitorio de la hormona sobre actividades proteín-quinasa dependientes de Ca<sup>++</sup>/calmodulina (Benitez-King et al., 1996). Por otro lado, se ha postulado que la melatonina puede ejercer potentes efectos protectores celulares actuando de manera estimuladora sobre la actividad de enzimas antioxidantes, tales como la glutatión peroxidasa, o suprimiendo la actividad de enzimas prooxidantes como la oxido nítrico sintetasa y la 5-lipoxigenasa (Reiter, 1996a; Mathes et al., 2008).

#### **2.3.4. Efectos fisiológicos de la melatonina**

En los mamíferos, la melatonina ha sido implicada directa o indirectamente en numerosas funciones circadianas y estacionales. También se ha involucrado esta hormona en la regulación de diferentes ejes hormonales, de la actividad nerviosa cerebral y del sistema inmunitario, entre otros. Además, estudios recientes han postulado varios usos terapéuticos potenciales de la melatonina.

- **Control de los ritmos circadianos**

Aunque en un principio el papel de la melatonina en la ritmicidad circadiana fue subestimado, hoy en día se acepta que una de las propiedades más importantes de esta sustancia es su capacidad para ajustar/sincronizar los ritmos circadianos que discurren en libre curso (Pévet et al., 2002).

Los efectos circadianos de la melatonina implican una acción directa de la hormona sobre el NSQ hipotalámico en el que reside el reloj biológico principal. De hecho, se ha demostrado que la melatonina es capaz de provocar avances (administración al comienzo de la noche subjetiva) y retardos (administración al final de la noche subjetiva) de fase en los ritmos circadianos de diversos procesos, tales como la descarga eléctrica espontánea del NSQ del hipotálamo (McArthur et al., 1991), la actividad metabólica (Cassone et al., 1987) y la actividad locomotora (Redman et al., 1983; Slotten et al., 2002). Las propiedades cronobióticas de la melatonina también se expresan en otras actividades dependientes del reloj circadiano. Así, se ha descrito que la administración de melatonina puede regular el ritmo de síntesis de melatonina en la glándula pineal (Humlova y Illnerova, 1990; Drijfhout et al., 1996a, Míguez et al., 1996b), probablemente mediante un efecto sobre el reloj biológico. Este hecho, por tanto, apoya la existencia de un bucle de retroalimentación en el que la síntesis de melatonina es controlada por el reloj biológico y, a su vez, la hormona ejerce una acción de retrocontrol sobre dicho reloj.

La existencia de receptores de melatonina en el NSQ apoya la acción moduladora de la hormona sobre los ritmos circadianos. La localización precisa de dichos receptores no es del todo conocida, pero se han caracterizado células inmunorreactivas a VP en el NSQ del hámster dorado y siberiano con abundancia de receptores de melatonina. Otros datos apoyan una acción de melatonina mediada por neuronas VP. Así se ha visto que la melatonina amortigua el ritmo circadiano de liberación de VP en el NSQ (Watanabe et al., 1998) e inhibe el aumento en AMPc y la liberación de VP inducido por el VIP *in vitro* (Vanecek y Watanabe, 1998). En cuanto al tipo de receptores que pueden mediar estas acciones, estos parecen ser del tipo MT<sub>1</sub> (Liu et al., 1997). De hecho se ha

comprobado que efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos desaparece en ratones deficientes en receptores MT<sub>1</sub> (Dubocovich et al., 2005).

En el humano, se ha descrito también que el ritmo de los niveles de melatonina circulante puede ser alterado por la administración de melatonina exógena, obteniéndose avance o retardos de fase según el momento en que se realice la administración (Zaidan et al., 1994; Claustrat et al., 1995). Este efecto cronobiótico de la melatonina tiene especial importancia por su aplicación potencial en problemas de desincronización de ritmos circadianos, como ocurre en alteraciones del sueño/vigilia, ceguera, trastornos horarios en vuelos transoceánicos y el trabajo a turnos (Arendt et al., 1998b; Sack et al., 2000). En este sentido es especialmente interesante el desarrollo de nuevos agentes con actividad agonista de la melatonina que parecen ser útiles en el tratamiento de desórdenes rítmicos y afectivos (Millan et al., 2003; Zlotos, 2005; Rajaratnam et al., 2009).

- **Control de los ritmos estacionales (reproducción)**

La melatonina es una hormona esencial en el ajuste temporal de funciones estacionales, principalmente en la reproducción. Numerosos estudios han abordado el papel de la melatonina utilizando modelos de animales con reproducción estacional, tales como el hámster y la oveja (Goldman y Darrow, 1983; Ebels y Balemans, 1986; Arendt, 1998b). En el hámster la exposición prolongada a fotoperiodos cortos (< de 12.5 horas de luz al día), induce una fuerte regresión gonadal, la cual no ocurre en animales pinealectomizados (Reiter, 1973). Además, la administración crónica de melatonina produce regresión gonadal y reducción de niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH), hormona estimuladora del folículo (FSH), testosterona y prolactina (Tamarkin et al., 1976). Estudios más recientes demostraron que la acción antigonadotrópica de la melatonina en el hámster dorado es mediada por una inhibición de la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) (Maywood y Hastings, 1995; Vanecek, 1998). También se han descrito variaciones fotoperiódicas de los receptores de melatonina de la *pars tuberalis* hipofisaria en roedores con reproducción estacional (Masson-

Pevet y Gauer, 1994; Recio et al., 1996a, 1996b), los cuales parecen ser especialmente sensibles a los niveles circulantes de la hormona.

Sin embargo, las acciones reproductivas de la melatonina no son exclusivamente antigonadotrópicas. Así, en la oveja (un modelo animal de reproducción en “días cortos”) la administración de melatonina en días largos estimula la actividad reproductiva, en lo que se conoce como efecto progonadotrópico. Dicho efecto también se ha asociado a variaciones en los niveles de LHRH a nivel de la eminencia media y en los receptores de melatonina del área premamilar hipotalámica. Los efectos de la melatonina podrían ser mediados por vías dopaminérgicas que regularían la liberación de LHRH (Malpoux et al., 1998).

Por tanto, la melatonina no puede ser descrita como una hormona pro- o antigonadotrópica, sino que debe ser considerada como un elemento crucial en la transducción de la información fotoperiódica. En este sentido, las acciones estacionales de la melatonina no se restringen al sistema reproductor, sino que afectan a otros procesos como, por ejemplo, los cambios de pelaje, variaciones del peso corporal, la lactancia, la hibernación, etc. Este amplio espectro de acciones de la melatonina ha llevado a postular una estrecha relación entre el sistema circadiano y la regulación estacional, de forma que pueda tener lugar una evolución anual de la actividad y regulación del reloj circadiano que podría influir por vías hormonales y neuronales en un amplio rango de sistemas fisiológicos (Miller et al., 2004). A nivel humano poco se conoce sobre los efectos que la melatonina y el sistema circadiano pueden tener en la reproducción (Boden y Kennaway, 2006).

- **Efectos sobre la actividad endocrina tiroidea y adrenal**

En diversos estudios se ha descrito un efecto inhibitorio de la melatonina sobre la producción de hormonas tiroideas en roedores (Petterborg y Rudeen, 1989; Baltaci et al., 2003) y se ha propuesto esta relación hormonal en el control de los cambios estacionales de ingesta y masa corporal (Ebling y Barret, 2008).

Por otra parte, la melatonina también ejerce un efecto inhibitorio en la secreción del cortex adrenal (Torres-Farfán et al., 2003) y se ha descrito una relación

inversa de los ritmos circulantes de melatonina y cortisol (Richter et al., 2008). Estos mismos autores han descrito la expresión de receptores MT<sub>1</sub> de melatonina en la glándula adrenal de la rata (Richter et al., 2008).

- **Modulación de la neurotransmisión cerebral**

Dado que las acciones endocrinas de la melatonina parecen desarrollarse a través de una modulación de la liberación hormonal hipofisaria, muchos han sido los estudios enfocados en investigar los efectos de la melatonina en los sistemas de neurotransmisores cerebrales que directa- o indirectamente, están implicados en la regulación endocrina hipotálamo-hipofisis. Así, se ha postulado una interacción de la melatonina con la liberación hipotalámica de DA en la rata (Zisapel y Laudon, 1983) posiblemente interfiriendo con la entrada de Ca<sup>++</sup> (Zisapel et al., 1982). Por otra parte, tanto la pinealectomía como la administración de melatonina resultan en alteraciones de la liberación y captación de 5-HT en sinaptosomas del hipotálamo de rata (Míguez et al., 1995b) y en los niveles de 5-HT y/o su metabolito oxidativo, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en varias regiones cerebrales de la rata (Míguez et al., 1991, 1994) y del hámster dorado (Míguez et al., 1998a). Los efectos más relevantes de la melatonina parecen focalizarse a nivel de ciertos núcleos del hipotálamo ventromedial y el área preóptica (Míguez et al., 1996c, 1997a). Estudios recientes también han descrito un efecto modulador de la melatonina sobre la liberación *in vitro* de 5-HT en sinaptosomas del hipocampo de la rata (Monnet, 2002) y la liberación *in vivo* de 5-HT y 5-HIAA en dializados del NSQ de la rata (Yoshioka et al., 2000).

- **Regulación del sueño y temperatura corporal**

Numerosos trabajos han señalado las propiedades hipnóticas de la melatonina reduciendo el tiempo de latencia y afectando a la distribución temporal de las fases del sueño (Stone et al., 2000; Arendt, 2006). Este efecto podría derivar de un descenso en la temperatura corporal. Por otra parte, es probable que estos efectos de la melatonina sean mediados por una acción de ajuste sobre el reloj biológico, modificando con ello los ritmos diarios de sueño/vigilia y temperatura corporal (Arendt, 2006).

- **Efectos sobre la retina**

La retina es un tejido productor de melatonina, hecho que tiene lugar de forma rítmica y circadiana (Danilenko et al., 2009). Se ha propuesto que la melatonina retiniana podría jugar un destacado papel en la modulación del proceso de fototransducción (Fujieda et al., 1999). Así se sabe que la melatonina inhibe la liberación de dopamina (DA) evocada por la despolarización (Dubocovich., 1983), hecho que parece condicionar la capacidad de adaptación a la luz inducida por la DA. Se han descrito receptores de melatonina localizados en la capa nuclear y plexiforme internas donde se sitúan las células amacrinas productoras de DA (Audinot et al., 2008). Por otra parte, la melatonina parece inhibir la formación de AMPc y la acumulación de glutamato en la retina (Faillace et al., 1996a, 1996b).

- **Sistema inmune y cáncer**

Existen numerosas evidencias de que la melatonina ejerce un efecto estimulador de la respuesta inmune celular y humoral, que en parte podría estar mediada por la liberación de péptidos opiodes e interleukina-2 desde los linfocitos T (Maestroni, 1995). La presencia de sitios de unión para 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonina en los linfocitos humanos apoya una acción directa de la melatonina en las células T (Carrillo-Vico et al., 2005).

También se ha postulado una acción de inhibitoria de la melatonina sobre el crecimiento tumoral, aunque los resultados no son del todo consistentes (Srinivasan et al., 2008). En el cáncer de mama, se ha postulado que el efecto antitumoral de la melatonina se debe a una interacción con las vías celulares de respuesta a estrógenos (Cos et al., 2006).

- **Acción protectora celular. Envejecimiento**

Diversos estudios han postulado que la melatonina puede desarrollar acciones intracelulares neuroprotectoras (Kim et al., 1998; Mayo et al., 1998a). Estas propiedades se podrían explicar en parte por los efectos antioxidantes de la melatonina que actúa como un poderoso agente quelante de radicales libres,

estimula la actividad de enzimas antioxidantes y reduce la de enzimas prooxidantes (Reiter, 1996a). Además la melatonina parece ser un eficaz protector del daño infringido por los radicales libres al ADN nuclear y a proteínas y lípidos de la membrana celular. Se ha especulado con que las propiedades antioxidantes de la melatonina podrían ser aplicables en situaciones de elevado daño celular relacionadas con el incremento en la formación de radicales libres, tal como ocurre durante el envejecimiento (Reiter et al., 2007).

En relación con el envejecimiento también se han descrito alteraciones en la producción de melatonina pineal. Así, trabajos de nuestro grupo han permitido conocer que tanto en la rata como en el hámster dorado se produce un descenso del metabolismo indólico pineal y de la capacidad de la glándula para producir melatonina (Míguez et al., 1998b). Dicho efecto podría deberse a la reducción de la inervación catecolaminérgica de la glándula, de igual modo que se ha descrito en otras áreas cerebrales (Míguez et al., 1999).

### **3. METABOLISMO DE LAS INDOLAMINAS EN LA GLÁNDULA PINEAL DE MAMÍFEROS**

Los mecanismos celulares y moleculares implicados en el metabolismo indolaminérgico pineal, particularmente en la síntesis de melatonina, han sido ampliamente estudiados en la rata de laboratorio. Aunque ésta no puede ser considerada como una especie fotoperiódica, es capaz de percibir los cambios el fotoperiodo ambiental e integrar esta información modificando el perfil diario de síntesis de melatonina.

#### **3.1. Síntesis de indoles y metoxindoles pineales**

La melatonina es un derivado indólico sintetizado en diversos tejidos de vertebrados, pero también en especie tan dispares como bacterias, protozoos, plantas e invertebrados (Harderlan y Poeggeler, 2003). En todas ellas, la síntesis de melatonina está directamente relacionada con el metabolismo de la 5-HT.

El aminoácido esencial L-triptófano (L-Trp) es el precursor de la síntesis de 5-HT y de múltiples derivados metoxindólicos pineales. Este aminoácido es captado activamente del torrente sanguíneo al interior de los pinealocitos, donde es transformado en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por la acción de la enzima mitocondrial L-triptófano hidroxilasa (L-triptófano tetrahydropteridine: oxígeno oxidoreductasa; EC 1.14.16.4, TP-OH) (Lovenberg et al., 1967). La posterior acción de la L-aminoácido-aromático-descarboxilasa (EC 4.1.1.28, LAAD) da lugar a la formación de 5-HT. Esta se almacena en el citoplasma del pinealocito y posiblemente en vesículas citoplasmáticas (Moriyama y Yamamoto, 1995a), siendo su concentración en la glándula pineal una de las más altas de todos los tejidos del organismo (Binkley, 1983; Ebadi, 1984).

La 5-HT juega un papel central en todo el metabolismo indólico pineal. Esta amina es el sustrato inicial de tres vías diferentes:

- **Ortometilación**, mediante la hidroxindol-*o*-metiltransferasa (EC 2.1.1.4; HIOMT) se genera 5-metoxitriptamina (5-MT).
- **Desaminación**, mediante una monoamino oxidasa (EC 1.4.3.4; MAO) se genera hidroxindol-acetaldehído, el cual enseguida es oxidado por una aldehído deshidrogenasa para formar ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Una posterior acción de la HIOMT puede dar lugar a ácido 5-metoxiindolacético (5-MIAA), el cual es susceptible de reducción por la alcohol deshidrogenasa formando 5-hidroxitriptofol (5-HTOL). Este a su vez puede ser transformado mediante la HIOMT a 5-metoxitriptofol (5-MTOL).
- **N-acetilación**, mediante una N-acetiltransferasa (Acetil CoA: arilalquilamina-N-acetiltransferasa (EC 2.3.1.37; AANAT), dando lugar a N-acetilserotonina (NAS). Este compuesto es, a su vez, metilado por la HIOMT, formándose melatonina.

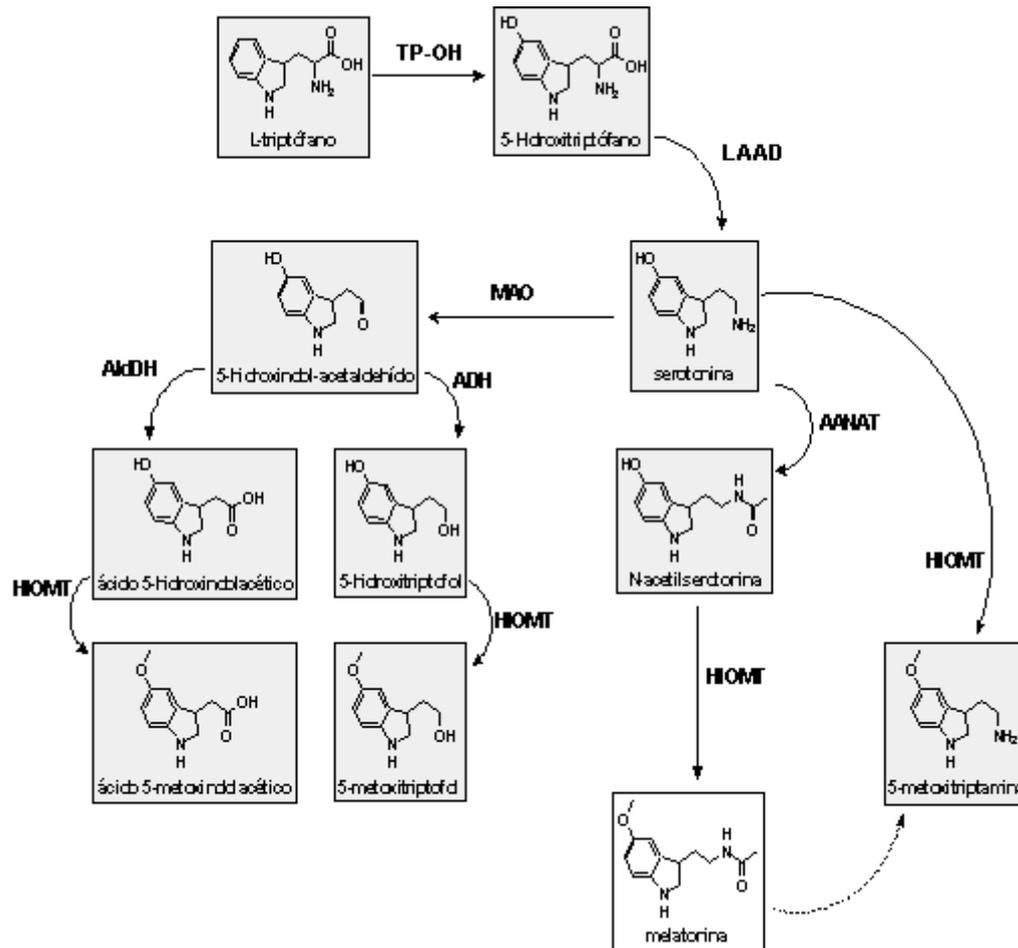
Una característica fundamental de las vías metabólicas de indolaminas y metoxindoles es su ritmicidad diaria. Con respecto a la melatonina, se ha observado una oscilación diaria en sus niveles desde 100-200 pg/glándula durante el día hasta 1-2 ng/glándula durante la noche. Estos cambios están en relación con una variación diaria de la actividad de la enzima AANAT que puede

incrementarse de 30-70 veces durante la noche (Klein y Weller, 1970; Klein et al., 1996). En concordancia con ello se produce una brusca caída en los niveles nocturnos de 5-HT y de algunos de los metabolitos relacionados con esta amina, tales como el 5-HIAA, la 5-MT, el 5-MTOL y el 5-MIAA (Binkley et al., 1981; Mefford et al., 1983; Galzin et al., 1988; Raynaud y Pevet, 1991; Míguez et al., 1995a, 1996a).

Debido a sus características altamente lipofílicas, la melatonina producida en los pinealocitos es liberada rápidamente hacia los capilares pineales, no pareciendo haber almacenes intrapinealocitarios. Por esta razón, los niveles de melatonina circulante siguen un fuerte paralelismo con las cantidades producidas en la glándula pineal (Pang y Brown, 1983). En mamíferos, los niveles circulantes de melatonina oscilan entre valores de 10-20 pg/ml durante el día hasta los 80-100 pg/ml durante la noche (Vieira et al., 1992; Reiter, 1991).

De acuerdo con varios estudios, menos del 1% de la melatonina circulante es excretada como forma libre a la orina (Wettenberg, 1978). Prácticamente la totalidad de la melatonina se degrada rápidamente (vida media entre 15 y 30 minutos), siendo el hígado principal lugar de inactivación (Gibbs y Vriend, 1981; Lang et al., 1983). Allí se hidroxila a 6-hidroximelatonina (compuesto carente de actividad biológica) y se excreta en forma de conjugados glucurónicos y sulfatados.

Además de en la glándula pineal, la síntesis de melatonina también puede tener lugar en la retina de la mayor parte de mamíferos y en la glándula Harderiana de los roedores (Ralph, 1980), donde se han encontrado ritmos diarios de esta hormona similar a los presentes en la glándula pineal. También se sintetiza una importante cantidad de melatonina en el tracto gastrointestinal (Raikhlín et al., 1975) y en las plaquetas (Launay et al., 1982). No obstante la importancia de estos procesos en los niveles circulantes de la hormona parece ser mínimo, como demuestra el hecho de que la pinealectomía reduce en más del 95% los valores de melatonina circulante (Pang y Brown, 1983).



**Fig. 4.** Esquema simplificado del metabolismo indólico en la glándula pineal y síntesis de melatonina. TP-OH: triptófano hidroxilasa; LAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa; MAO: monoamina oxidasa; AldDH: aldehído deshidrogenasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa; AANAT: aralquilamina N-acetiltransferasa.

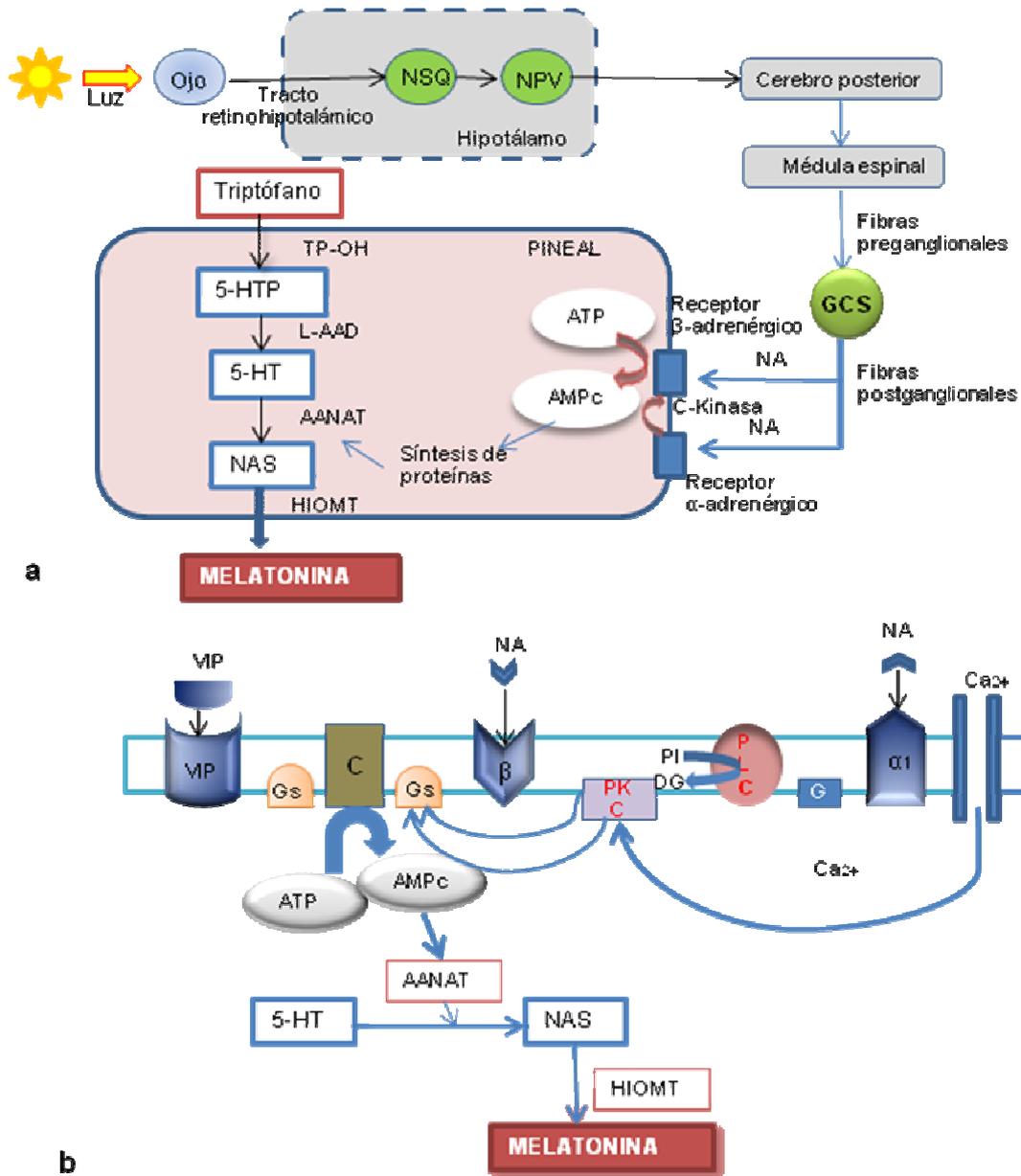
### 3.2. Control de la síntesis de melatonina en la glándula pineal

La liberación de la melatonina desde la glándula pineal parece estar controlada exclusivamente por su biosíntesis, en la cual participan cuatro enzimas diferentes: la TP-OH, la LAAD, la AANAT y la HIOMT. Los estudios sobre el

control de la actividad pineal, particularmente la síntesis de melatonina, se han centrado sobre todo en la actividad de los enzimas AANAT y HIOMT, aunque en los últimos años también se ha hecho hincapié en la actividad de la TP-OH.

La presencia de TP-OH en la glándula pineal de mamíferos ha sido demostrada por Lovenberg et al. en 1967. La actividad de este enzima es muy alta y se asocia a una concentración y tasa de *turnover* de 5-HT en la glándula también muy elevada (King et al., 1984a). La actividad TP-OH aumenta de 2-3 veces durante la noche y es inhibida por un pulso de luz (Shibuya et al., 1977; Sitaram y Lees, 1978; King et al., 1984a). El aumento nocturno se ha asociado a la estimulación de receptores adrenérgicos que provoca cambios transcripcionales y postrcripcionales en el enzima (Besançon et al., 1996). Además del indiscutible papel de la TP-OH limitando la producción de la 5-HT pineal, se ha hipotetizado con que su nivel de activación a lo largo del ciclo día-noche puede jugar un papel modulador del ritmo diario de producción de melatonina (ver apto. 4).

Diferentes estudios llevados a cabo en mamíferos han demostrado que el ritmo de síntesis de melatonina depende de un ritmo similar en la actividad AANAT. Su aumento nocturno produce el consiguiente aumento de la concentración de N-acetilserotonina (NAS), el precursor inmediato de la melatonina, mientras que la aplicación de luz durante la noche resulta en una fuerte caída de su actividad enzimática y de la síntesis de melatonina (Klein y Weller, 1972; Klein et al., 1996). También la extirpación del ganglio cervical superior, del cual procede la inervación noradrenérgica que transmite la información desde el NSQ a la glándula pineal, impide el aumento nocturno de la AANAT y del contenido de melatonina (Deguchi y Axelrol, 1972; Klein y Moore, 1979; Bartol et al., 1997). Por otro lado, la destrucción de los tractos ópticos o de la proyección retinal central provoca la incapacidad de la luz para sincronizar los ritmos de AANAT y de la síntesis de melatonina (Moore y Klein, 1974). Todo ello indica que la AANAT pineal es la interfase molecular en la que convergen todas las entradas que regulan la producción y secreción de melatonina, particularmente aquellas que portan información fotoperiódica y circadiana (Ganguly et al., 2002; Simonneaux y Ribelayga, 2003).



**Fig. 5.** a) Principales mecanismos de control de la síntesis de melatonina por la luz. b) Mecanismos de transducción implicados en la síntesis nocturna de melatonina en los pinealocitos (Modificado de Simonneaux y Ribelayga, 2003).

La HIOMT es el enzima de la glándula pineal que cataliza la etapa final de la síntesis de melatonina y otros 5-metoxindoles pineales (5-MT, 5MIAA y 5-ML). En la rata, su afinidad por la NAS es muy superior que por otros sustratos (Morton, 1987), por lo que se vincula principalmente con la síntesis de melatonina y puede ser usado como marcador de células “melatoninérgicas”. Contrariamente a lo observado con la actividad de la AANAT, el aumento nocturno de la actividad HIOMT es de poca amplitud, lo que hace dudar sobre la existencia real de variaciones diarias (Ribelayga et al., 1997). Dado que es un enzima presente en concentraciones elevadas (representa 2-4% de las proteínas solubles de la pineal) y con una tasa de renovación muy lenta ( $t_{1/2} > 24$  h) (Bernard et al., 1993), parece poco probable que durante la noche tenga lugar un aumento rápido de su actividad que condicione el ritmo de melatonina.

### **3.2.1. Regulación adrenérgica**

En los mamíferos, la NA es el principal neurotransmisor implicado en el control de la biosíntesis rítmica de melatonina en la glándula pineal (Simonneaux y Ribelayga, 2003), por lo que ha recibido la mayor parte de la atención. No obstante, en la regulación de este proceso también participan otros mecanismos neurales no adrenérgicos y diversas hormonas.

#### ***a) Inducción noradrenérgica de la síntesis de melatonina: mecanismos celulares y moleculares***

La actividad facilitadora del NSQ durante la noche implica un gran aumento en la síntesis y liberación de NA desde las terminales simpáticas postganglionares, en las inmediaciones de los pinealocitos. Este proceso comienza justo tras el apagado de luces y termina al final de la noche, siendo la cantidad de NA liberada desde las fibras simpáticas aproximadamente 100 veces mayor durante la noche que durante el día (Abreu et al., 1987; Drijfhout et al., 1996b).

La NA difunde en el espacio perivascular e intercelular uniéndose a receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos localizados en la membrana postsináptica de los pinealocitos (Klein, 1985) (Figs. 6 y 7). En todas las especies de mamíferos estudiadas, la

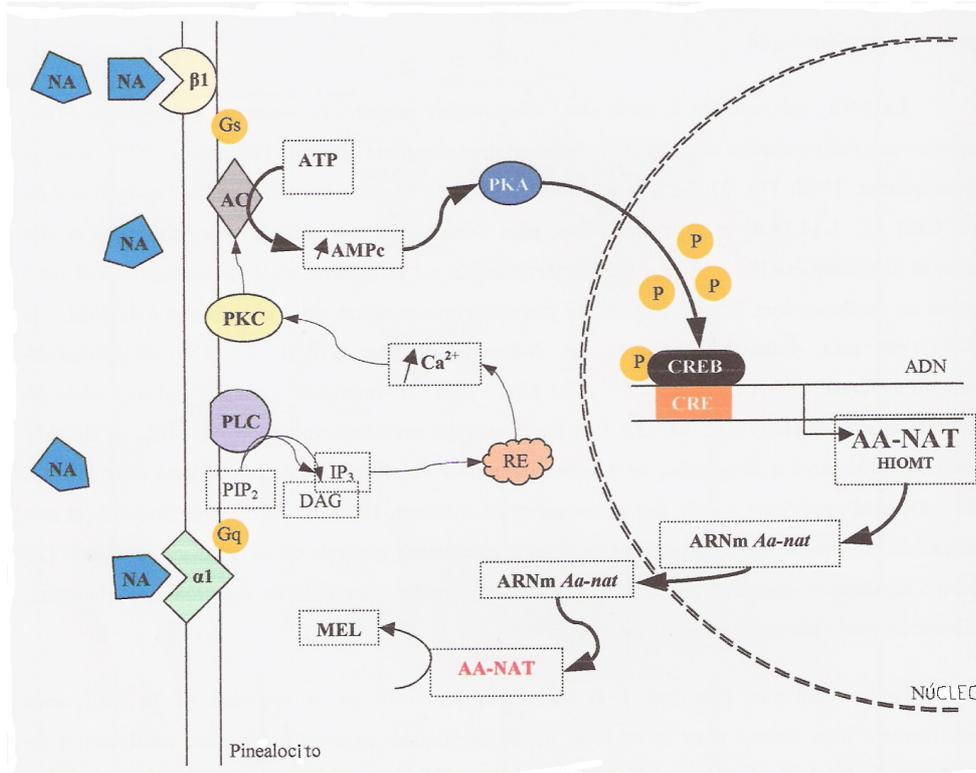
activación de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos es un paso absolutamente necesario para la estimulación de la síntesis de melatonina durante la noche (Axelrod, 1974; Klein, 1985; Reiter, 1991). La densidad de este tipo de receptores presenta un ritmo de 24 horas en la glándula pineal de la rata y otras especies, con máximos localizados al final del día y primera parte de la noche (Pangerl et al., 1990). Los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos están acoplados a proteínas Gs y su estimulación provoca un incremento en la actividad de la adenilato ciclasa y en los niveles de AMPc intracelular. Este es el segundo mensajero esencial para la inducción nocturna de la actividad AANAT y el incremento de síntesis de melatonina (Klein y Berg, 1970; Klein et al., 1981).

La estimulación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos de la glándula pineal potencia el efecto  $\beta$ -adrenérgico. De hecho, la activación simultánea de los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta$ -adrenérgicos produce un incremento del orden de 100 veces mayor en los niveles de AMPc y de melatonina pineal (Klein et al., 1983; Viera et al., 1992). Esta potenciación esta basada en la activación de un sistema de transducción asociado a la activación de la fosfolipasa C que finalmente promueve un fuerte aumento de la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular (Sáez et al., 1994). La activación de una proteína quinasa C dependiente de  $Ca^{++}$  es la responsable en última instancia de la potenciación en la formación de AMPc (Chick y Ho, 1989; Vanecek et al., 1985; Simonneaux y Ribelayga, 2003).

En la glándula pineal de mamíferos se ha demostrado la existencia de un subtipo de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico, el cual podría localizarse en la membrana del pinealocito y estimular la actividad de la AANAT y la liberación de melatonina (Schaad y Klein, 1992); otros estudios, sin embargo, postulan una localización en las terminales presinápticas noradrenérgicas, donde inhibe la liberación de NA (Simonneaux et al., 1994).

La estimulación adrenérgica de los pinealocitos no sólo causa acumulación intracelular de AMPc, sino también de GMPc (Vanecek et al., 1985). En este efecto parece participar una activación de la guanilato ciclasa mediada por un incremento del óxido nítrico (White y Klein, 1993). Sin embargo el papel funcional del GMPc en la regulación de la síntesis de melatonina no está del todo claro, ya que no parece actuar sobre los enzimas de síntesis de melatonina,

particularmente la AANAT (Seidel et al., 1990). Algunos estudios postulan que el GMPc podría activar canales de calcio sensibles a nucleótidos cíclicos (Schaad, et al., 1995) e incluso inhibir canales de calcio de tipo L, contribuyendo a la estabilización de la membrana tras la hiperpolarización que sigue a la estimulación noradrenérgica (Chick et al., 1995).



**Fig. 6.** Señal noradrenérgica nocturna en un pinealocito de rata. La síntesis de melatonina (MEL) es activada por la liberación nocturna de noradrenalina (NA).  $\alpha_1$ : receptor  $\alpha$ -adrenérgico;  $\beta_1$ : receptor  $\beta$ -adrenérgico; AANAT: arilalquilamina-N-acetiltransferasa; AC: adenilato ciclasa; AMPc: adenosil monofosfato cíclico; ATP: adenosín trifosfato; Ca<sup>2+</sup>; CRE: elemento de respuesta al AMPc; CREB: proteína que se une a CRE; DAG: diacil glicerol; Gs: proteína G estimuladora; Gq: proteína G estimuladora de la PLC; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; P: fósforo inorgánico; PIP<sub>2</sub>: fosfatidil inositol difosfato; PKA: proteína quinasa A, activada por el AMPc; PKC: proteína quinasa C, activada por el Ca<sup>2+</sup> y el DAG; PLC: fosfolipasa C; RE: retículo endoplásmico. (Modificado y ampliado de Stehle, 1995).

El aumento de las concentraciones de AMPc y  $\text{Ca}^{++}$  intracelular que se produce como respuesta a la estimulación adrenérgica son los principales mediadores de la activación nocturna de la función pineal. Sus acciones tienen lugar a varios niveles regulando la concentración y la actividad del enzima AANAT. A nivel transcripcional, el AMPc activa la proteína quinasa A (PKA), la cual induce una fosforilación rápida (30-45 min) del factor de transcripción CREB (Roseboom y Klein, 1995) que se puede unir a lugares de la región promotora del gen que codifica por la AANAT (Roseboom et al., 1996; Baler et al., 1997). La estimulación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y los agentes movilizadores de  $\text{Ca}^{++}$  también pueden, a pequeña escala, activar la transcripción de AANAT.

Un segundo mecanismo de regulación de la actividad AANAT opera a nivel post-transcripcional e implica el control por parte del AMPc de la proteína AANAT. En este sentido se sabe que la secuencia protéica del enzima muestra diferentes lugares de fosforilación posibles por la PKA, la PKC y la caseína-quinasa II (Klein et al., 1996, 1997). Se ha sugerido que dicho proceso de fosforilación podría ser fundamental para bloquear la destrucción de la proteína AANAT debido a procesos de proteólisis proteosomal, contribuyendo a mantener una elevada actividad enzimática durante la noche (Gastel et al., 1998; Zatz et al., 2000).

Con respecto a la regulación noradrenérgica de la actividad HIOMT pineal, diferentes estudios han demostrado la falta de efecto de agonistas adrenérgicos a corto plazo (varias horas) (Ribelayga et al., 1997). Sin embargo, estudios a nivel molecular han permitido ver que existe un aumento nocturno del ARNm de la HIOMT, el cual se mantiene en condiciones de oscuridad constante. Por otro lado, diversos trabajos *in vitro* han mostrado que el ritmo de HIOMT puede ser modulado por estimulación noradrenérgica, pero sólo cuando ésta se mantiene a largo plazo (semanas, meses) (Ribelayga et al., 1997; Ceinos et al., 2004). En base a ello se ha postulado que dicha regulación contribuiría a los cambios que a nivel estacional tienen lugar en la amplitud de pico nocturno de melatonina (Simonneaux y Ribelayga, 2003; Ceinos et al., 2004).

***b) Cese de la síntesis nocturna de melatonina***

La mayor parte de los estudios sobre la regulación pineal se han centrado en determinar los mecanismos implicados en la inducción noradrenérgica nocturna de la síntesis de melatonina. Sin embargo, es menos conocido como se regula el cese de dicha síntesis. Las experiencias llevadas a cabo con pulsos de luz durante la noche en la rata han mostrado que la exposición nocturna a la luz disminuye de forma rápida y transitoria la liberación de NA (Drijfhout et al., 1996b, 1996c). En esta inhibición presináptica participan varios neurotransmisores: el GABA a través de receptores GABA-A (Rosenstein et al., 1990), el NPY a través de receptores NPY-Y<sub>2</sub> (Simonneaux et al., 1994) y la acetil-colina a través de receptores muscarínicos (Govitrapong et al., 1989b; Simonneaux y Ribelayga, 2003).

Por otro lado, diversos estudios realizados en roedores han observado que el fin de la secreción nocturna de melatonina no está siempre ligada al final del periodo de oscuridad, sino que se detiene ya antes del fin de la noche (Míguez et al., 1995a,1996a). Los niveles extracelulares de NA, medidos mediante microdiálisis, también disminuyen antes del final de la noche, posiblemente reflejando el funcionamiento del reloj biológico (Drijfhout et al., 1996d). Por tanto, parece probable que la disminución de la producción de melatonina sea debido al cese de la estimulación noradrenérgica circadiana. Este proceso se acompaña de una disminución de los niveles intracelulares del AMPc, con la consiguiente caída de la actividad AANAT y de la síntesis de melatonina (Klein y Weller, 1972; Ilnerova et al., 1979; Klein et al., 1996; Roseboom et al., 1996). Estudios recientes han demostrado que existen mecanismos transcripcionales y postranscripcionales que permiten explicar la relación entre el descenso de los niveles del segundo mensajero y la caída de la actividad AANAT al final de la noche. A nivel postrancricional, participarían procesos de degradación proteosomal dependientes de los niveles de AMPc, de forma que la disminución de los niveles del segundo mensajero permitiría la degradación protéica de la AANAT y, con ello, la reducción de la síntesis de melatonina (Ganguly et al., 2005; Schomerus y Korf, 2005).

A nivel transcripcional, se ha propuesto un mecanismo complejo en base a la existencia de factores inhibidores de la transcripción génica. Al menos en la rata se han descrito dos de estos factores: la proteína ICER (*inducible cyclic AMPc early represor*) (Stehle et al., 1993) y el Fra-2 (antígeno-2 similar a fos) (Baler y Klein, 1995). Al menos en el caso de ICER, se conoce que la transcripción del gen inducible por AMPc presenta variaciones nictemerales dependientes de la liberación de NA, y que los genes de la TP-OH, la HIOMT y la AANAT poseen lugares que son susceptibles de ser inhibidos por ICER (Stehle et al., 1993; Korf et al., 1996). Además, se conoce que, durante la noche, la activación del gen CREM (*AMPc response element modulator*) conduce a un rápido incremento en los niveles de proteínas ICER que forman dímeros que reprimen la transcripción inducida por el AMPc (Foulkes et al., 1996). La expresión del gen CREM se detiene entre 4 y 6 horas antes del final de la noche, sugiriendo una relación temporal con la disminución de la expresión de la AANAT (Stehle et al., 1993; Foulkes et al., 1996). Por tanto, la estimulación noradrenérgica nocturna activa de forma sucesiva la síntesis de melatonina y la expresión de un gen que codifica para un factor inhibidor de la transcripción, sugiriendo un retrocontrol negativo de la estimulación noradrenérgica sobre la síntesis de melatonina, en particular a nivel del gen que codifica para la AANAT.

### 3.2.2. Regulación no adrenérgica

Además de los receptores adrenérgicos, la glándula pineal de mamíferos está dotada de receptores de diferentes neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas (Stehle, 1995; Simmoneaux y Ribelayga, 2003). Algunos de estos compuestos son sintetizados en la glándula pineal y podrían participar como moduladores auto/paracrinos de la propia actividad pineal.

- **Acetil-colina (ACh).** Se han encontrado receptores colinérgicos en la glándula pineal de diversas especies de roedores (Reuss et al., 1992). Los agonistas de receptores muscarínicos producen efectos variables sobre el metabolismo pineal: estimulan la liberación de 5-HT (Finocchiaro et al., 1989) y la producción de melatonina por mecanismos independientes de AMPc (Laitinen et al., 1995), e inhiben la actividad AANAT (Pujito et al., 1991). En cuanto a los receptores nicotínicos, su

activación produce despolarización de la membrana (Stankov et al., 1993). Por otra parte, se ha postulado que la ACh podría ejercer una regulación a nivel presináptico, afectando a la liberación de NA (Laitinen et al., 1995; Drifjhou et al., 1996b).

- **GABA.** Está presente como neurotransmisor en la glándula pineal de los mamíferos donde parece ejercer diversos efectos paracrinos (Ebadi y Govitrapong, 1986; Rosenstein et al., 1990). Se han identificado lugares de unión GABA-A y GABA-B. En la rata, la activación de los receptores GABA-A inhibe la síntesis de melatonina inducida por NA y la activación de los GABA-B inhibe la liberación de NA (Ebadi y Govitrapong, 1986).
- **Glutamato.** Está presente en elevadas concentraciones en los pinealocitos (Yamada et al., 1996a, 1996b) y podría ser un importante transmisor autocrino/paracrino involucrado en la regulación de la síntesis de melatonina (Simonneux y Ribelayga, 2003). El glutamato provoca un aumento de la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular e inhibe la AANAT y la secreción de melatonina inducida por NA. Este efecto es mediado por receptores metabotrópicos de tipo 3 (GluR3) (Yamada et al., 1998). En la pineal de rata también se expresan receptores GluR1 y GluR5 cuya activación puede condicionar la actividad pineal (Yatsushiro et al., 2000). Además, se ha sugerido que el glutamato puede regular la liberación presináptica de NA (Wang et al., 1996).
- **Dopamina.** Hay abundantes pruebas de que la DA podría tener funciones neurotransmisoras en la glándula pineal. Así, se ha descrito la existencia de inervación dopaminérgica en la pineal de roedores (Jin et al., 1998), así como de una alta densidad de receptores dopaminérgicos del tipo  $D_1$  (Simonneaux et al., 1990a) y  $D_2$  (Govitrapong et al., 1989a) en la glándula pineal bovina. En la rata, se han demostrado efectos variables dependientes de la concentración de DA sobre la actividad AANAT y la secreción de melatonina (Axelrod et al., 1969; Govitrapong et al., 1989a). También se conoce la existencia de un ritmo marcado de DA pineal con valores nocturnos elevados en distintas especies de roedores (Hermes et al., 1994; Míguez et al., 1995a, 1996a). A pesar de todo ello, el papel

fisiológico de este neurotransmisor en la glándula pineal no está del todo esclarecido (Simonneaux y Ribelayga, 2003).

- **Serotonina.** Al margen de su papel como precursor directo de la síntesis de melatonina y de otros derivados 5-hidroxilados y metoxilados pineales, se ha sugerido un posible papel autocrino/paracrino de la 5-HT pineal que afectaría de manera principal a la regulación de la síntesis de melatonina. Este efecto y los mecanismos que implica son presentados en el apartado 4.
- **Histamina.** Aunque hay una importante inervación histaminérgica pineal de origen central, en la rata la histamina no parece provocar efecto alguno en la actividad bioquímica pineal (Buda y Klein, 1978), pero si podría afectar a nivel presináptico modulando la liberación de NA (Yamasaki et al., 2001).
- **Oxido nítrico (NO).** Aunque no se considera propiamente un neurotransmisor, este factor neuronal difusible se produce en fibras no simpáticas que inervan la pineal de la rata (Lin et al., 1994; López-Figueroa y Moller, 1996), en algún caso colocalizado en fibras que contienen VIP (López-Figueroa y Moller 1996). Varios estudios han mostrado que el NO puede alterar la síntesis de melatonina, aunque los resultados son contradictorios (Spessert et al., 1993; Schenda y Vollrath, 1997).
- **Neuropéptidos.** La glándula pineal contiene una gran diversidad de péptidos de orígenes distintos. En relación con la regulación de la síntesis de melatonina pineal, los más importantes son el VIP, el NPY, la OT y la VP (Simonneaux y Ribelayga, 2003).

En mamíferos se ha descrito la presencia de fibras nerviosas pineales que contienen **VIP** y cuyo origen más probable parece ser el sistema nervioso parasimpático (Shiotani et al., 1986) o central (Moller et al., 1985). A nivel metabólico, el VIP provoca un aumento de los niveles intracelulares de AMPc (Simonneaux et al., 1997a), de la expresión génica de la AANAT (Roseboom et al., 1996) y de la activación de la

AANAT *in vitro* (Yuwiler, 1983) e *in vivo* (Schroder et al., 1989). Además estimula la síntesis de 5-HT (Simonneaux et al., 1997a) y activa a largo plazo la HIOMT (Ribelayga et al., 1997) y la liberación de melatonina (Simonneaux et al., 1993). Se ha sugerido que ejerce un efecto presináptico estimulando la actividad tirosina-hidroxilasa (Schwartzschild y Zigmond, 1991).

El **NPY** está presente en cantidades importantes en la glándula pineal de mamíferos. Su procedencia se relaciona con una inervación NPY-érgica de origen no bien definido, y/o con la inervación simpática donde está colocalizado con la NA (Moller et al., 1994). En la rata se ha demostrado que el NPY ejerce efectos tanto a nivel presináptico (receptores  $Y_2$ ) como postsináptico (receptores  $Y_1$ ). No obstante, el papel del NPY sobre la síntesis de melatonina no está bien conocido, y mientras que algunos estudios muestran una débil estimulación de la secreción de melatonina inducida por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica (Simonneaux et al., 1994), otros describen efectos inhibitorios (Olcese, 1991). También se ha mostrado que el NPY estimula de manera moderada la síntesis y secreción de 5-HT (Simonneaux et al., 1997a) y de la actividad HIOMT en pinealocitos de rata (Ribelayga et al., 1997).

Se ha caracterizado la presencia de **VP** y **OT** en la glándula pineal de diversas especies de mamíferos (Liu et al., 1988), siendo probable su localización en fibras de origen central (Lepetit et al., 1993). Se ha demostrado que VP potencia la síntesis de melatonina inducida por estimulación  $\beta$ -adrenérgica (Simonneaux et al., 1990b), la formación de AMPc (Simonneaux et al., 1996) y la activación de la AANAT (Stehle et al., 1991). Estos efectos podrían ser mediados por receptores  $V_{1a}$ . La VP también estimula la liberación de melatonina pineal en la rata *in vivo* (Barassin et al., 2000). En cuanto a la OT, se ha demostrado un efecto similar al ejercido por VP sobre la estimulación de la síntesis de melatonina en pinealocitos de rata (Simonneaux et al., 1996), pero no se ha hecho una caracterización en profundidad del mismo.

Al margen de los ya mencionados, existe la posibilidad de que un número creciente de derivados peptídicos participen en la regulación de la glándula

pineal. En este sentido cabe citar al **PACAP**, la **sustancia P**, la **SS**, la **secretoneurina** y diversos **péptidos opioides** (Met-enk, Leu-enk,  $\beta$ -endorfinas y dinorfinas). De todos ellos existen pruebas de su presencia en la glándula pineal de diversas especies de mamíferos, habiéndose sugerido un posible papel como moduladores de su actividad (Stankov y Reiter, 1990; Govitrapong et al., 1992; Coto-Montes et al., 1994; Simonneaux y Ribelayga, 2003; Simonneaux et al., 1997a, 1997b). Aunque parece improbable que estos péptidos puedan condicionar la síntesis rítmica de melatonina, sí podrían ejercer acciones auto/paracrinas específicas que contribuyan al ajuste/modulación de la actividad presináptica o pinealocitaria.

### 3.2.3. Regulación por hormonas esteroideas

**Esteroides sexuales.** Se han observado cambios en la síntesis de melatonina en función del ciclo sexual en hembras de diversas especies (Wurtman et al., 1965; Rudeen y Reiter, 1980) y tras la castración en machos (Karasek et al., 1978; Rudeen y Reiter, 1980). Al menos algunos de estos efectos podrían explicarse por una acción moduladora de los esteroides sexuales sobre la actividad noradrenérgica pineal, aunque no se descartan acciones postsinápticas. También se sabe que la glándula pineal contiene lugares de unión nucleares para el estradiol y la testosterona (Cardinali et al., 1983), la 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (Gupta et al., 1993) y la progesterona (Vacas et al., 1979).

**Glucocorticoides.** Las situaciones de estrés alteran la secreción de melatonina, incluso en humanos (Wetterberg, 1978). Se han caracterizado receptores de glucocorticoides en la glándula pineal (Gray y Luttge, 1983) y un estudio en la rata ha mostrado que los glucocorticoides a concentración elevada producen inhibición de secreción basal de melatonina y de la actividad AANAT estimulada por NA (Zhao y Touitou, 1993).

#### **4. PAPEL DE LA SEROTONINA EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA Y SECRETORA PINEAL**

##### **4.1. Serotonina intracelular y síntesis de melatonina**

En la glándula pineal el papel metabólico de la 5-HT es esencial. Se produce a partir del aminoácido L-triptófano tras hidroxilación y descarboxilación, y se almacena en grandes cantidades en los pinealocitos para servir como sustrato a la síntesis de melatonina (Mefford et al., 1983; Klein, 1985). El hecho de que ambos compuestos (5-HT y melatonina) presenten un ritmo inverso avala la hipótesis de que la tasa de activación de la AANAT nocturna es el principal mecanismo que regula el metabolismo de la 5-HT pineal (Mefford et al., 1983; Klein, 1985).

No obstante, las relaciones bioquímicas entre 5-HT y melatonina en la glándula pineal parecen ser más complejas. De hecho, en estudios llevados a cabo en el hámster monitorizando en paralelo los niveles de melatonina y 5-HT, se ha observado que los cambios en ambos compuestos no ocurren de forma simultánea, especialmente en las fases de transición día/noche y noche/día (Míguez et al., 1995a, 1996a). Además, la concentración de 5-HT parece disminuir fuertemente antes de iniciarse la noche, bastante antes de activarse la AANAT. Tampoco parece existir una relación entre la disminución nocturna de la cantidad de 5-HT pineal (más de 80 ng/glándula) y la cantidad de melatonina (1 ng/glándula). Aunque la serotonina se utiliza también en otras rutas metabólicas para formar 5-HIAA y diversos 5-metoxindoles (5-MT, 5-ML, 5-MIAA), la mayor parte de estos varían de forma paralela con la 5-HT y no pueden explicar las diferencias entre los ritmos de 5-HT y melatonina (Skene et al., 1986; Raynaud y Pevet, 1991; Míguez et al., 1995a). Por tanto, parece evidente que hacen falta estudios que perfilen de forma precisa las variaciones diarias de los niveles de los diferentes derivados indólicos pineales y las actividades enzimáticas relacionadas.

Aunque se han hecho algunos estudios al respecto, la importancia que pueden tener los cambios en las concentraciones intracelulares de 5-HT en la síntesis de

melatonina pineal no es del todo conocida. Se ha demostrado que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica (la cual acontece durante la oscuridad) provoca un aumento de la síntesis de 5-HT intrapinealocitaria, lo cual podría formar parte de un recurso de aprovisionamiento de 5-HT en los pinealocitos donde serviría de sustrato para la fuerte activación nocturna de la AANAT (Míguez et al., 1997b; King et al., 1984b). De hecho, los trabajos llevados a cabo en pinealocitos *in vitro* han mostrado que el bloqueo farmacológico (inhibidores de la TP-OH) de la síntesis de 5-HT afecta negativamente a la cantidad de melatonina secretada desde los pinealocitos (Míguez et al., 1997b). El tratamiento farmacológico también disminuyó de manera importante el contenido de 5-HT intracelular, demostrando que ésta no forma parte de un almacén pasivo sino que transitoriamente se renueva y que, en caso de disminución, podría limitar la síntesis de melatonina (King et al., 1984b; Míguez et al., 1997b). Esta situación ha sido muy poco estudiada *in vivo*, aunque existe algún trabajo pionero que describe cambios en los niveles de melatonina pineal asociados a la inhibición farmacológica de la síntesis de 5-HT (King et al., 1984b). Es pues necesario profundizar en este tipo de estudios que puedan esclarecer si la regulación de la síntesis de 5-HT puede ser un mecanismo intrínseco de modulación del ritmo de producción de melatonina.

#### **4.2. La serotonina como potencial factor autocrino/paracrino pineal**

Diversos estudios llevados a cabo *in vitro* (Benson et al., 1989; Aloyo y Walker, 1987; Racké et al., 1991; Míguez et al., 1995c; Míguez et al., 1997b) e *in vivo* (Azekawa et al., 1991; Sun et al., 2002) han demostrado que la 5-HT puede ser secretada activamente desde la glándula pineal al medio extracelular, proceso que esta regulado por mecanismos  $\alpha$ - (Aloyo y Walker, 1987, 1988; Benson et al., 1989) y  $\beta$ -adrenérgicos (Olcese y Munker, 1994; Míguez et al, 1997b). La contribución de la 5-HT presináptica (almacenada en las terminales simpáticas) a los niveles extracelulares parece ser mínima, dado que la ganglionectomía produce sólo una pequeña reducción en la liberación de 5-HT y ésta persiste en pinealocitos cultivados (Míguez et al., 1995c, 1997b). Es obvio, por tanto, que los cambios diarios en la secreción de 5-HT pueden suponer una alternativa en la utilización de la 5-HT sintetizada en los pinealocitos, pero también un potencial mecanismo regulador de la actividad pineal.

Recientemente se ha sugerido que la 5-HT extracelular podría jugar un papel en la regulación auto/paracrina de la actividad de síntesis de la glándula pineal. De hecho, la aplicación extracelular de 5-HT tiene un efecto potenciador *in vitro* de la actividad AANAT (Sugden, 1990; Olcese y Munker, 1994) y de la síntesis de melatonina (Míguez et al., 1997b) inducida por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Este efecto de la 5-HT extracelular parece ser medido por activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, los cuales han sido caracterizados en la glándula pineal bovina (Govitrapong et al., 1992). *In vitro*, la activación de estos receptores por agonistas de la 5-HT o su bloqueo por antagonistas específicos, provoca aumento y disminución, respectivamente, de la síntesis de melatonina estimulada por isoproterenol, un agonista  $\beta$ -adrenérgico (Míguez et al., 1997b).

Por tanto, los resultados mencionados anteriormente sugieren que la 5-HT extracelular podría ser un factor modulador positivo que contribuye a la plena expresión de la síntesis y liberación de melatonina. Estos efectos podrían tener un claro reflejo *in vivo*, dado que mediante técnicas de microdiálisis se ha observado que existe un aumento en la cantidad de 5-HT liberada al espacio extracelular durante la primera fase de la noche, justo antes de la máxima inducción de la AANAT y de la síntesis de melatonina estimulada por la NA endógena (Azekawa et al. 1991; Sun et al., 2002). Es obvio, pues, que hacen falta más estudios *in vivo* que permitan demostrar tal relación y los mecanismos por los que podría actuar la 5-HT extracelular en la glándula pineal.



## OBJETIVOS



La síntesis de melatonina en la glándula pineal de los mamíferos presenta un marcado ritmo diario, siempre con niveles elevados durante la noche y bajos durante el día. Esta fluctuación está en relación con la actividad del reloj circadiano localizado en núcleo supraquiasmático del hipotálamo, del cual parte una vía multisináptica que inerva la glándula pineal mediante fibras simpáticas noradrenérgicas. Durante la noche, se incrementa la liberación de noradrenalina que interactúa con receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos de la membrana de los pinealocitos, lo que resulta en una acumulación intracelular de AMPc y un subsiguiente aumento en la actividad del enzima arilalquilamina-N-acetiltransferasa y en la síntesis de melatonina.

La serotonina (5-HT) juega un papel esencial en el metabolismo de la glándula pineal, siendo su concentración una de las mayores del organismo. Aparte de ser el sustrato para la síntesis de melatonina, se ha especulado con que la 5-HT puede mediar diversas acciones reguladoras de la actividad pineal. Básicamente, esta hipótesis se sustenta en los siguientes hallazgos y supuestos:

- ✓ La disponibilidad intracelular de 5-HT pineal está relacionada con su síntesis y con su uso en diferentes rutas metabólicas.
- ✓ El contenido de 5-HT intracelular podría ser limitante para la formación de melatonina nocturna.
- ✓ Una parte de la 5-HT pineal puede ser liberada al medio extracelular y ejercer algún tipo de acción moduladora sobre la síntesis de melatonina.
- ✓ Se conoce la existencia de receptores serotoninérgicos en la glándula pineal, la activación de estos podría modular la producción de melatonina en la propia glándula.

Por todo ello, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido el de ***profundizar en el conocimiento de las relaciones metabólicas y funcionales que se establecen entre la 5-HT y la melatonina en la glándula pineal de la rata, así como en el potencial papel de la 5-HT extracelular como factor de regulación de la síntesis de melatonina pineal.***

Como objetivos específicos se han establecido los siguientes:

## Objetivos

---

- ❖ Estudiar los ritmos diarios de metabolitos y enzimas que forman parte de la ruta de síntesis de melatonina en la glándula pineal de la rata.
- ❖ Analizar si la disponibilidad de 5-HT pineal puede ser un condicionante de la producción diaria de melatonina.
- ❖ Investigar el efecto de la administración del aminoácido L-Trp sobre la síntesis diaria de melatonina pineal.
- ❖ Poner a punto una técnica de microdiálisis pineal que permita monitorizar de forma continuada los ritmos diarios de liberación (niveles extracelulares) de indoles y melatonina.
- ❖ Establecer el papel que la 5-HT extracelular podría tener como factor de regulación de la producción pineal de melatonina e investigar la implicación de receptores serotoninérgicos en dicha función.

## TRABAJOS EXPERIMENTALES



## TRABAJO EXPERIMENTAL 1

### RITMOS DIARIOS DEL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS, INDOLAMINAS Y MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL DE LA RATA



## **1. OBJETIVO**

Una de las propiedades intrínsecas a la glándula pineal de todos los vertebrados es su capacidad para generar y mantener fuertes cambios diarios en la síntesis de melatonina (Binkley, 1983; Reiter, 1991). Asociada a esta característica funcional hay evidencias en diferentes especies de cambios diarios en numerosos compuestos relacionados de manera directa o indirecta con la ruta de síntesis de melatonina, particularmente en varias catecolaminas e indolaminas (Pévet et al., 1989; Míguez et al., 1995a, 1996a). No obstante, poco se conoce acerca del grado en el que la formación de estos compuestos puede condicionar la propia síntesis de melatonina, fundamentalmente porque pocos son los estudios en los que se haya abordado de manera simultánea en la misma glándula pineal la determinación de actividades enzimáticas y concentraciones de sustratos implicados en la ruta de síntesis de melatonina y sus cambios a lo largo del fotoperiodo diario.

Por ello, en este primer trabajo se pretende estudiar en detalle las variaciones a lo largo del ciclo fotoperiódico diario del contenido de diferentes catecolaminas, indolaminas y melatonina en la glándula pineal de la rata de laboratorio, así como las principales actividades enzimáticas implicadas en la ruta de síntesis de melatonina, la TP-OH y la AANAT.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos**

La melatonina, la serotonina (5-HT), el 5-hidroxitriptófano (5-HTP), la N-acetilriptamina, el Acetil-CoA y el ácido 5 hidroxindolacético (5-HIAA), fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Los demás reactivos fueron de grado analítico y obtenidos de distintas casas comerciales. El agua utilizada fue de alta calidad obtenida a partir de un sistema de desionización Water Pro™ PS (Labconco Co., MO, EE.UU.).



Inmediatamente tras el sacrificio de los animales, se extrajeron las glándulas pineales y se colocaron en viales mantenidos sobre nieve carbónica que fueron guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. En ese momento las glándulas pineales fueron descongeladas sobre hielo, se eliminaron los posibles restos de sangre y se introdujeron de forma individual en viales tipo Eppendorf de 1.5 ml, en donde fueron sonicadas en frío en un procesador ultrasónico de alta intensidad a 30 ciclos (3x3 seg) en 100  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0.1 M (pH 6.8) conteniendo 0.5 mM de Acetil-CoA. Posteriormente los tejidos se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Del sobrenadante se tomaron alícuotas para la determinación inmediata de las actividades enzimáticas, mientras que otras alícuotas fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis cromatográfico de los diferentes compuestos pineales.

#### **2.4. Ensayos de la actividad enzimática de la AANAT**

Los ensayos de la actividad AANAT se llevaron a cabo siguiendo el método de Bradford Thomas et al. (1990) ligeramente modificado y adaptado a nuestras condiciones experimentales. En un vial tipo Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron por este orden: 10  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0.1 M conteniendo Acetil CoA 0.5 mM, 30  $\mu\text{l}$  del sobrenadante del homogenado de tejido pineal y 10  $\mu\text{l}$  de triptamina 8 mM preparada en tampón fosfato 0.1 M. La mezcla se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño con agitación durante 15 min. La reacción se paró con 25  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico 6 N frío, y los incubados se centrifugaron a 14000 rpm/min durante 10 minutos. Del sobrenadante resultante se tomaron 10  $\mu\text{l}$  que se diluyeron en 90  $\mu\text{l}$  de la misma fase móvil fría utilizada para el análisis cromatográfico de N-acetilriptamina, producto resultante de la reacción del enzima AANAT sobre el sustrato triptamina. Todo el procesado de las muestras se realizó en frío.

El análisis de N-acetilriptamina se llevó a cabo por HPLC con detección fluorimétrica. El sistema cromatográfico utilizado estuvo formado por una bomba Gilson 305, equipada con un amortiguador de pulsos y conectada a una válvula de inyección Rheodyne M7125 (USA) equipada con un bucle de 50  $\mu\text{l}$ . La fase móvil [50 mM de  $\text{NaH}_2\text{P}_0_4$ , 0.1 mM de EDTA- $\text{Na}_2$  y 28% de acetonitrilo, pH final 5.2 ajustado con ácido ortofosfórico] fue filtrada por membranas de nylon de 0.20

$\mu\text{m}$  de tamaño de poro (ALBET, NY) y desgasificada por medio de una bomba de vacío. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna de fase estacionaria de la marca Phenomenex (relleno nucleosil C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å de poro, 150 mm x 4.60 mm) precedida por un filtro on-line de 0.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las separaciones fueron hechas a temperatura ambiente y el flujo utilizado fue de 1.1 ml/min.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica basada en la separación diferencial en el tiempo de las sustancias de una mezcla en función de la distinta retención que experimentan al pasar por una fase estacionaria que se encuentra empaquetada en una columna. En HPLC los componentes de la muestra son arrastrados por una fase móvil líquida impulsada por una bomba que genera altas presiones en el sistema. Los compuestos que son pobremente retenidos por la fase estacionaria y que tienen una fuerte interacción con la fase móvil presentan un tiempo de retención corto, mientras que los compuestos que sufren una mayor interacción con la fase estacionaria presentan un tiempo de retención mayor.

**Cuadro 1.** *Cromatografía líquida de alta resolución.*

La detección de las sustancias separadas cromatográficamente se llevó a cabo mediante un detector de fluorescencia Waters 2475 Multi $\lambda$  (Waters, Milford, MA, EE.UU.), fijando una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) de 285 nm y una de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) de 360 nm.

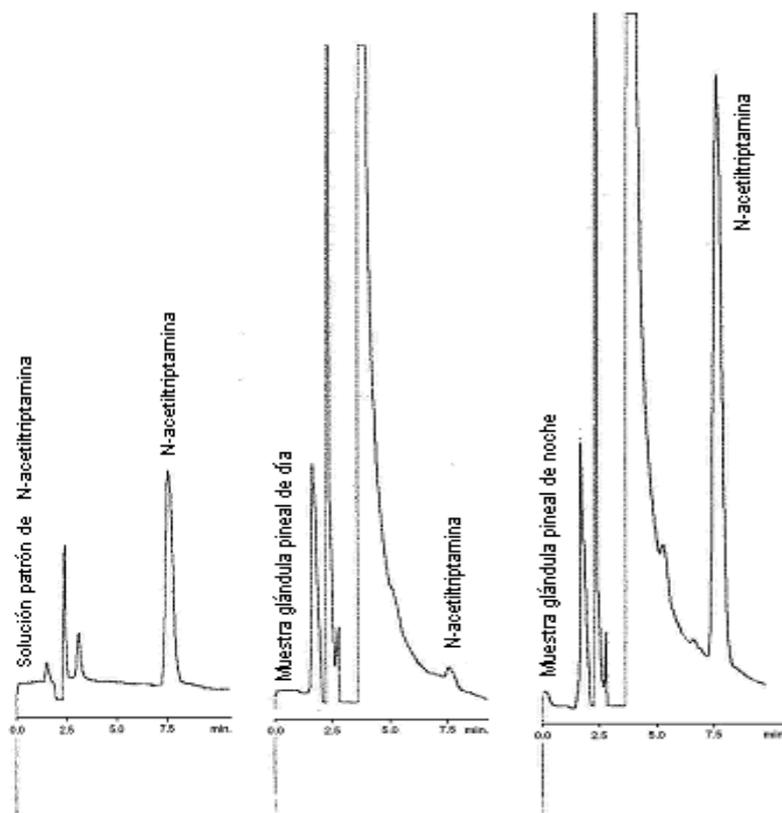
Cuando ciertas moléculas o átomos son expuestos a una fuente de energía de luz de elevada intensidad, absorben la energía de la luz y entran en un estado de excitación. Cuando las moléculas o átomos se mueven de este estado excitado a su estado normal, parte de la energía absorbida es liberada en forma de fotones, proceso que se denomina *fluorescencia*. Los átomos y moléculas en los diferentes compuestos y elementos emiten diferentes niveles de fluorescencia cuando son expuestos al mismo nivel de energía. La fluorescencia de un compuesto puede estar afectada por cambios de pH, de temperatura, y de los gases en disolución. La detección por fluorescencia ha sido adoptada para aplicaciones cromatográficas debido a su inherente sensibilidad y selectividad.

**Cuadro 2.** *Detección fluorimétrica.*

Las alturas de los picos de la N-acetiltriptamina fueron registradas con un integrador HP 3396 A (Hewlett Packard, PA, EE.UU). Las concentraciones de los compuestos fueron calculadas comparando dichos valores con los

correspondientes a patrones de concentración conocida inyectados ese mismo día. Al comienzo de cada sesión diaria se inyectó una serie de tres patrones y posteriormente se intercaló un patrón entre cada 10 muestras problema.

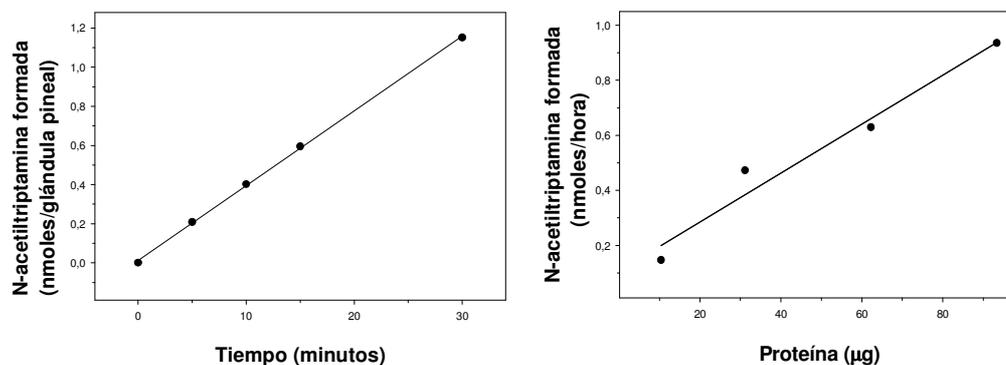
En la figura 1 se muestran los cromatogramas correspondientes a un patrón de N-acetilriptamina y de muestras de glándula pineal tomadas de día y de noche.



**Fig. 1.** Cromatograma de una solución patrón de N-acetilriptamina (100 pg, izquierda) y de una muestra de glándulas pineales de rata tomadas de día (centro) y de noche (derecha) y procesadas para el análisis de actividad AANAT.

Con el fin de determinar el tiempo óptimo de incubación para el ensayo de la actividad AANAT, se realizaron pruebas con muestras procedentes de un “pool” de glándulas pineales de rata extraídas en periodo nocturno (Figura 2). El tiempo

de incubación de 15 minutos se consideró adecuado para las condiciones rutinarias del ensayo. Se realizaron también pruebas para determinar la existencia de linealidad de la reacción con respecto a la cantidad de proteína presente en el medio de incubación (aproximadamente 2 µg de proteína por µl de homogenado pineal).



**Fig. 2.** Efecto del tiempo y de la concentración de proteína sobre la cantidad de N-acetiltryptamina formada por la acción de la AANAT en la glándula pineal.

## 2.5. Ensayos de la actividad de la TP-OH

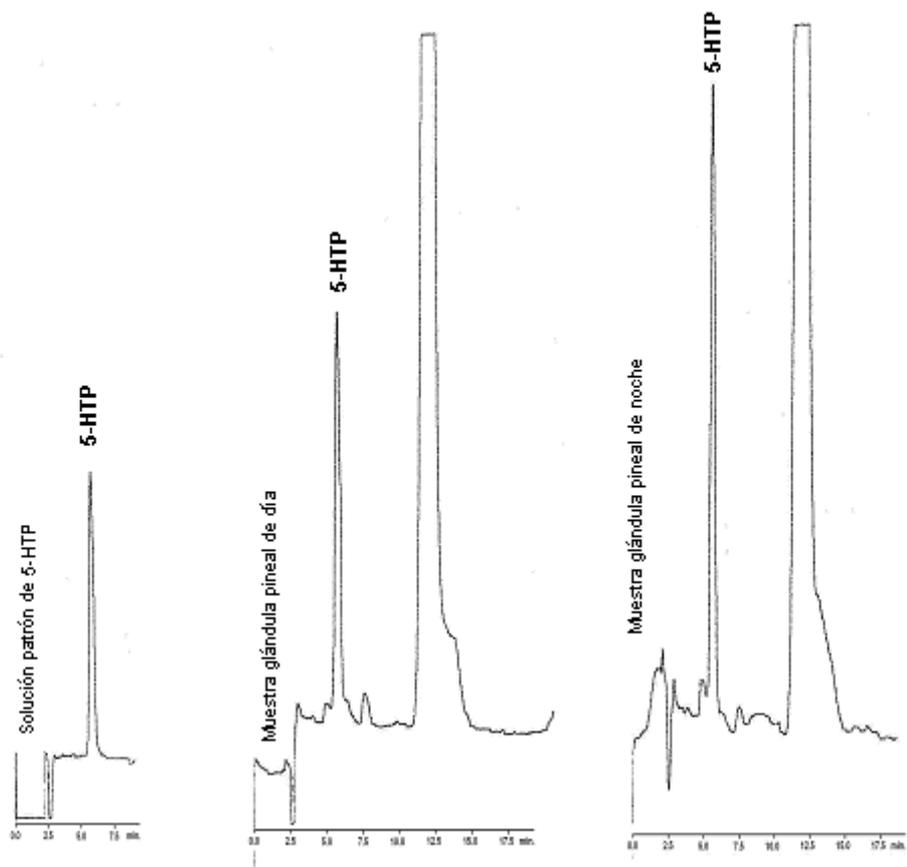
Para los ensayos de la actividad triptófano hidroxilasa se siguió el método de Hernández et al., (1994) ligeramente modificado. La reacción enzimática se llevó a cabo en un vial Eppendorf (1.5 ml) en el que se añadieron por este orden: 17.5 µl de tampón fosfato 0.1 M, 7.5 µl de di-6-metil-5,6,7,8-tetrahidropterina (MTHP), 15 µl de ditiotreitól 10 mM, 15 µl de NSD 1015 10 mM, 50 µl de catalasa 1462 U.I., 10 µl de sulfato amónico ferroso 16 mM, 5 µl de agua destilada, 10 µl de L-triptófano 9 mM y, finalmente, 20 µl del sobrenadante del homogenado de la glándula pineal. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C en un baño con agitación; la reacción fue parada con 150 µl de metanol puro a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se agitó y se centrifugó a 14000 rpm/min durante 10 min. Se tomaron 10 µl del sobrenadante que se diluyeron en 90 µl de la misma fase móvil fría utilizada para la determinación de 5-HTP formado en la

reacción. Estas diluciones fueron inmediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se fueron descongelando a medida que se iban inyectando en el sistema cromatográfico. Todo el procesado de las muestras se realizó en frío.

La técnica cromatográfica incluyó un sistema de HPLC similar al utilizado para el análisis de la actividad AANAT, aunque en este caso la fase móvil estuvo formada de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, EDTA- $\text{Na}_2$  0.1 mM, ácido octano sulfónico 0.8 mM y 18% de metanol (v/v) (pH final 4.6 ajustado con ácido orto-fosfórico) y la separación tuvo lugar a un flujo de 0.8 ml/min a temperatura ambiente. Los niveles de 5-HTP formados durante la incubación fueron detectados fluorimétricamente con una  $\lambda_{\text{ex}}$  de 302 nm y  $\lambda_{\text{em}}$  de 350 nm.

En la figura 3 se muestran los cromatogramas correspondientes a la solución patrón de 5-HTP así como del compuesto formado a partir de la incubación del tejido pineal. Aunque el 5-HTP presenta un tiempo de retención de 5.5 min, las inyecciones de las sucesivas muestras en el sistema cromatográfico se realizaron aproximadamente cada 18 minutos. Este retraso fue motivado por el gran pico que aparece a los 12 minutos y que procede de la señal fluorimétrica originada por el L-triptófano.

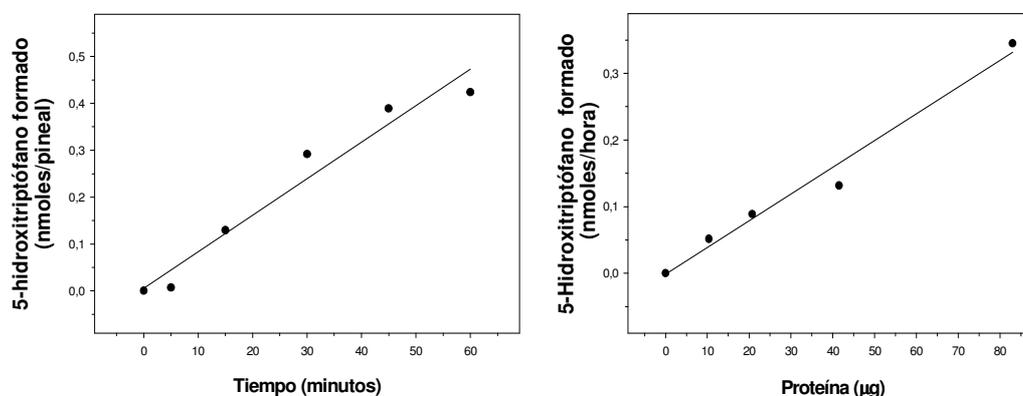
La concentración de 5-HTP presente en las muestras de incubación fue determinada en función de la altura de los picos registrados comparándolas con las de patrones apropiados inyectados ese mismo día. Al comienzo de la sesión diaria se inyectó una serie de tres patrones, y posteriormente se intercaló un patrón entre cada 10 muestras problema.



**Fig. 3.** Cromatograma de una solución patrón de 5-hidroxitriptófano (100 pg inyectados), y del mismo compuesto formado tras la incubación del tejido pineal para la detección de la actividad triptófano hidroxilasa. El cromatograma del centro proviene de una pineal recogida de día y el de la derecha de una tomada de noche.

Con el fin de determinar el tiempo óptimo de incubación para el ensayo de la actividad TP-OH se realizaron una serie de pruebas con muestras procedentes de un “pool” de glándulas pineales de rata; el tiempo de 30 minutos se consideró adecuado para las condiciones rutinarias del ensayo; la temperatura elegida para la incubación fue 37 °C. Se realizaron también pruebas para determinar la

linearidad de la reacción con respecto a la cantidad de proteína presente en la incubación (Figura 4).



**Fig 4.** Efectos del tiempo y de la concentración de proteína sobre la cantidad de 5-hidroxitriptófano formado mediante la acción de la triptófano hidroxilasa pineal.

## 2.6. Determinaciones analíticas de los niveles de NA, DA, 5-HTP, 5-HT, 5-HIAA y NAS en la glándula pineal

Para el análisis del contenido de catecolaminas, indolaminas y derivados, se tomaron 5 µl del sobrenadante del homogenado de cada glándula pineal y se añadieron 195 µl de fase móvil fría. De la mezcla resultante se inyectaron 20 µl en el sistema cromatográfico de HPLC con detección culométrica.

El eluyente de la columna de fase estacionaria pasa a través de una célula electroquímica. Cuando dicho eluyente contiene un compuesto que puede ser oxidado o reducido por el potencial que se está aplicando a través de la célula, la corriente producida es proporcional a la concentración del compuesto que la atraviesa. Existen dos tipos de células electroquímicas que son las más utilizadas: a) *amperométricas*, el eluyente que fluye pasa por la superficie del electrodo. Normalmente sólo el 1-5% del compuesto de interés es oxidado o reducido. b) *coulométricas*, el eluyente fluye a través del electrodo. En este tipo, prácticamente todo el compuesto de interés es oxidado o reducido, para conseguir una sensibilidad más elevada.

### **Cuadro 4.** Detección electroquímica-culométrica.

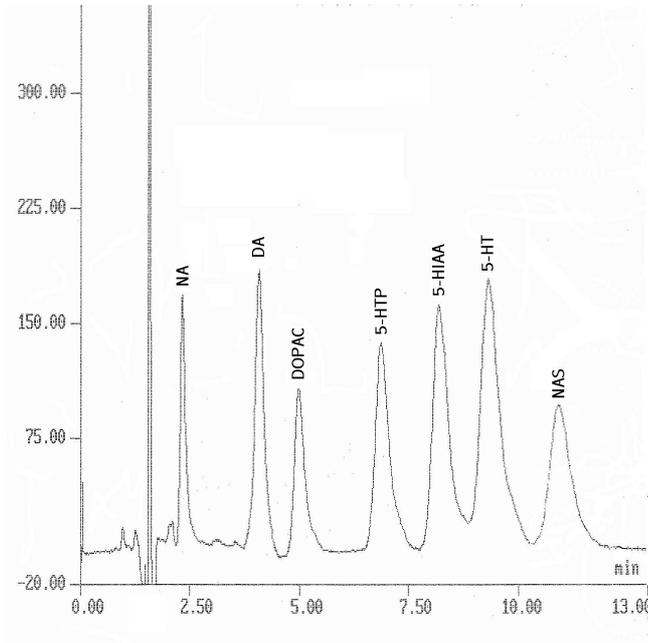
El sistema cromatográfico utilizado estaba formado por una bomba Waters M515 (Milford, MA, USA), equipada con un amortiguador de pulsos y conectada a una columna de fase estacionaria Tracer Extrasil ODS2 (3  $\mu$ m de partícula, 7.5 x 0.46 cm; Tecknocroma, Barcelona), precedida por una precolumna rellena de la misma fase estacionaria. La fase móvil utilizada [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, EDTA- $\text{Na}_2$  0.1 mM, ácido octano-1-sulfónico 0.8 mM y 18% de metanol (v/v), pH final 2.9 ajustado con ácido *o*-fosfórico)] fue filtrada y desgasificada por medio de una bomba de vacío. Las separaciones fueron hechas a temperatura ambiente y el flujo utilizado fue de 0.8 ml/min.

La detección de las sustancias separadas cromatográficamente se llevó a cabo mediante un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Bedford, MA, EEUU), el cual estaba equipado con una célula analítica ESA M5011 mantenida a un potencial oxidativo de +30 mV en el primer electrodo y +280 mV en el segundo electrodo.

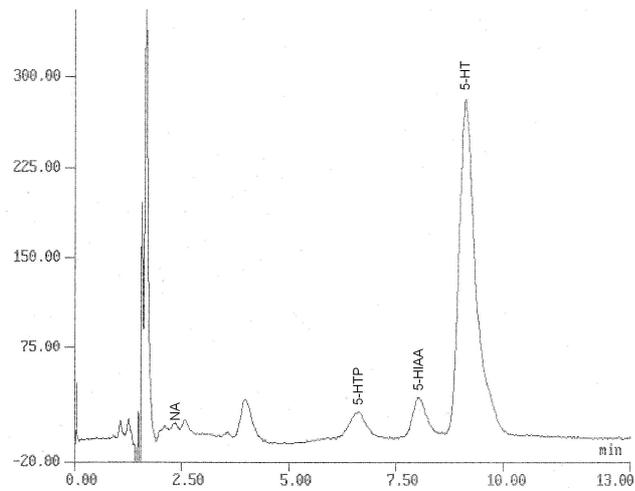
La inyección de las muestras (10-20  $\mu$ l) se efectuó mediante un autoinyector Waters M717 (Milford, MA, EE.UU.). La identificación y cuantificación de los picos del cromatograma se llevó a cabo mediante un paquete informático Kontron Integration 450.

La cantidad de compuesto presente en las muestras problema se determinó comparando las áreas de los correspondientes picos directamente con la de patrones de cantidad conocida inyectados ese mismo día. Al comienzo de la sesión diaria se inyectó una serie de tres patrones y posteriormente se intercaló un patrón entre cada 10 muestras problema. El sistema proporcionó una buena separación y no se observaron interferencias en los picos cromatográficos. Los límites de detección para los diferentes compuestos fueron de 2-5 pg para NA, DA, 5-HTP, 5-HT y 5-HIAA y de 10-15 pg para DOPAC y NAS (asumiendo una relación señal/ruido de fondo de 2)

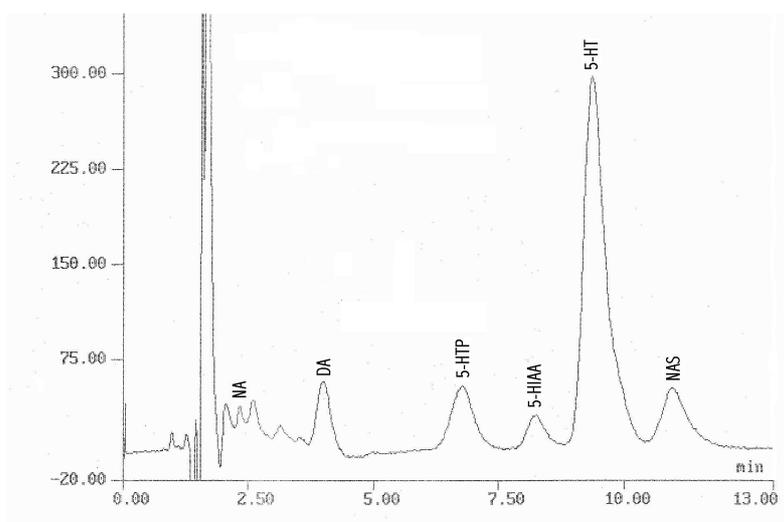
En la figura 5 y 6 a,b se muestran los perfiles de la elución cromatográfica y los tiempos de retención de los compuestos de interés en una muestra patrón y muestras de glándula pineal recogidas durante la fase de luz y de oscuridad.



**Fig. 5.** Perfil de elución cromatográfica de un patrón compuesto por NA, DA, DOPAC, 5-HTP, 5HIAA, 5-HT y NAS (100 pg de cada sustancia).



**Fig. 6a.** Análisis cromatográfico del contenido de cateoles e indoles en muestras de glándulas pineales recogidas durante la fase de luz.



**Fig. 6b.** Análisis cromatográfico del contenido de catecoles e indoles en muestras de glándulas pineales recogidas durante la fase de oscuridad.

## 2.7. Determinación analítica de los niveles de melatonina

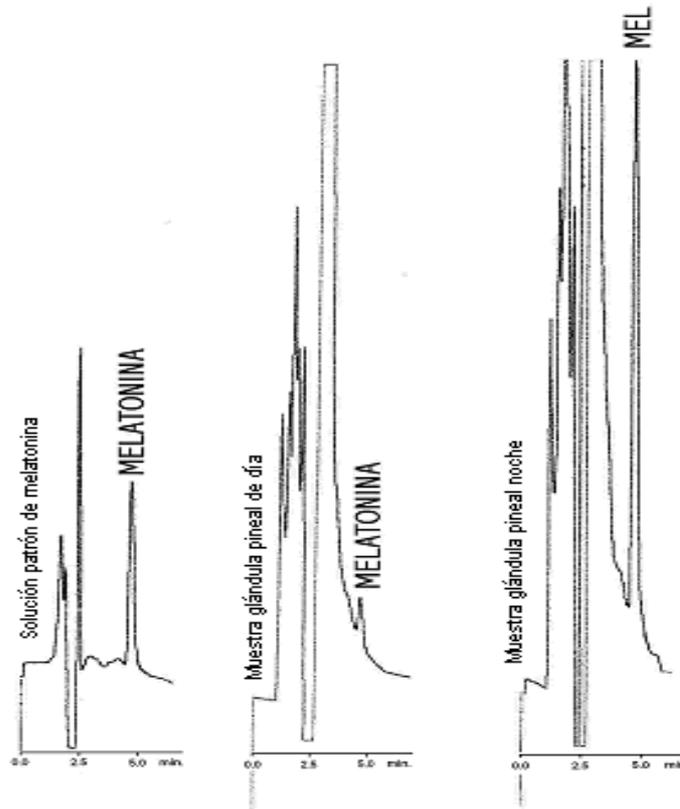
Se tomaron 5  $\mu$ l del sobrenadante del homogenado de glándula pineal y se inyectaron directamente al sistema cromatográfico con detección fluorimétrica. El sistema utilizado fue el mismo descrito para el ensayo de la actividad AANAT, aunque en este caso las longitudes de onda utilizadas para la determinación de la melatonina fueron  $\lambda_{ex}$ : 280 nm y de  $\lambda_{em}$ : 345 nm.

La fase móvil compuesta de acetato sódico anhídrico ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 10 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  0.01 mM y acetonitrilo (35%, v/v) (pH final 5.2), fue filtrada y desgasificada por medio de vacío. El flujo de la fase móvil fue de 1.0 ml/min y la separación de los compuestos se llevó a cabo a temperatura ambiente.

En la figura 7 se muestran los cromatogramas correspondientes a la solución patrón de melatonina y de muestras de glándulas pineales tomadas en periodo nocturno y diurno. La cuantificación de los picos de la melatonina en las muestras problema se llevó a cabo mediante un integrador HP 3396A, usando

los datos de las alturas de los picos y comparándolos con patrones de concentración conocida inyectados el mismo día de análisis.

Al comienzo de cada sesión diaria se inyectó una serie de tres patrones, y posteriormente se intercaló un patrón entre cada 10 muestras problema.



**Fig. 7.** Cromatograma de una solución patrón de melatonina (100 pg/inyección, izquierda) y de una muestra de glándulas pineales de rata recogida durante el día (centro) y de noche (derecha).

## 2.8. Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media  $\pm$  E.E.M. de cada grupo de animales sacrificados en el mismo tiempo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls, asumiendo un nivel de significación  $p < 0.05$  (Systat Software).

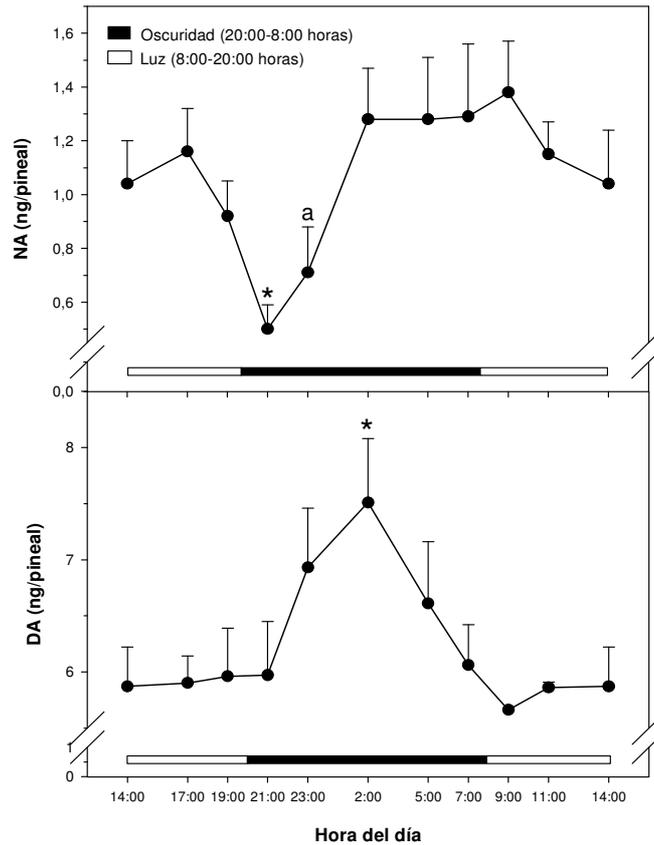
## 3. RESULTADOS

En las Figuras 8-12 se muestran las variaciones diarias del contenido de NA, DA, 5-HT, 5-HTP, 5-HIAA, NAS, melatonina, y las actividades enzimáticas de la TP-OH y AANAT en la glándula pineal de la rata Sprague-Dawley mantenida bajo un fotoperiodo controlado de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad diarias.

Con respecto a las catecolaminas pineales, se observa que los elevados niveles de NA presentes durante el día sufren una fuerte caída al inicio de la noche, tras lo cual se produce una rápida recuperación, manteniéndose los niveles elevados durante la mitad y segunda parte de la noche. Por su parte, el contenido de DA en la glándula pineal presenta un aumento del 20% hacia la mitad de la escotofase (+22% en los valores de medianoche respecto a los de mediodía;  $*p < 0,05$  vs todos los grupos excepto los de las 23:00 y 5:00 horas), que se sigue de un rápido descenso durante la madrugada (Fig. 8).

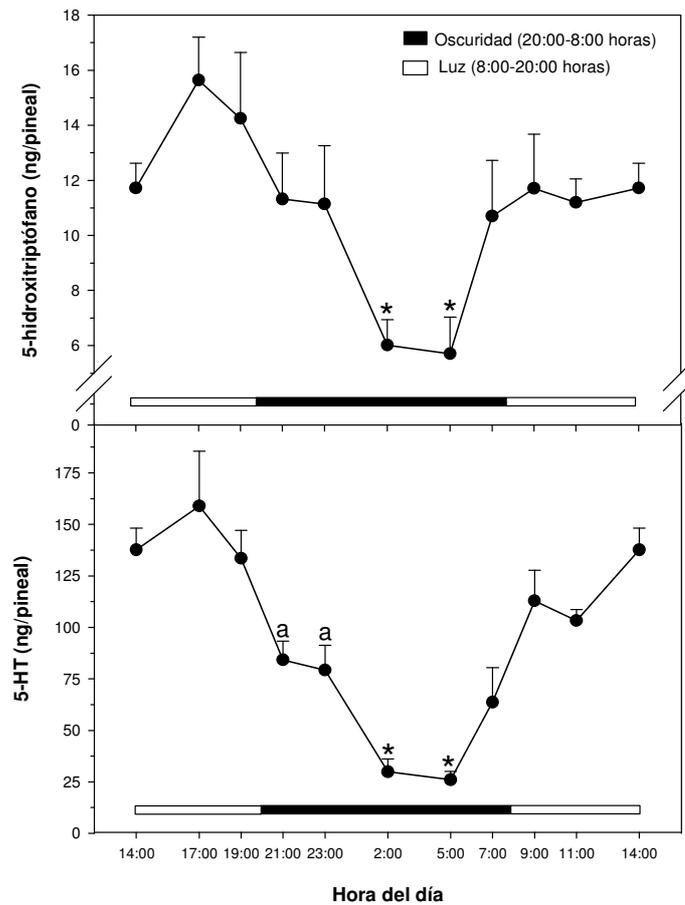
En la Figura 9 se muestran los cambios diarios en los niveles de 5-HTP y 5-HT en la glándula pineal de la rata. La concentración de 5-HT muestra una clara variación diaria con niveles muy elevados al final del periodo de luz (150 ng/glándula) y un fuerte descenso nocturno. La reducción del contenido de 5-HT pineal fue evidente en la primera hora de la noche y alcanzó su máximo en la segunda mitad de la noche (-82% de los valores de día;  $p < 0.05$  vs todos los demás puntos). La recuperación de los niveles de esta amina comienza antes del final de la noche y es completa una hora después del encendido de las luces.

Los niveles de 5-HTP mostraron un patrón diario similar al de 5-HT, con un ligero ascenso en las últimas horas del día (no significativo con respecto a valores de mediodía) que se continúa con una fuerte y paulatina caída durante la noche, alcanzándose una reducción del 59% entre las 2:00 h y las 5:00 h con respecto a los niveles de día (\* $p < 0,05$  vs todos los grupos de día). Al igual que la 5-HT, los bajos niveles nocturnos de 5-HTP se recuperan significativamente antes del inicio de la fotofase.

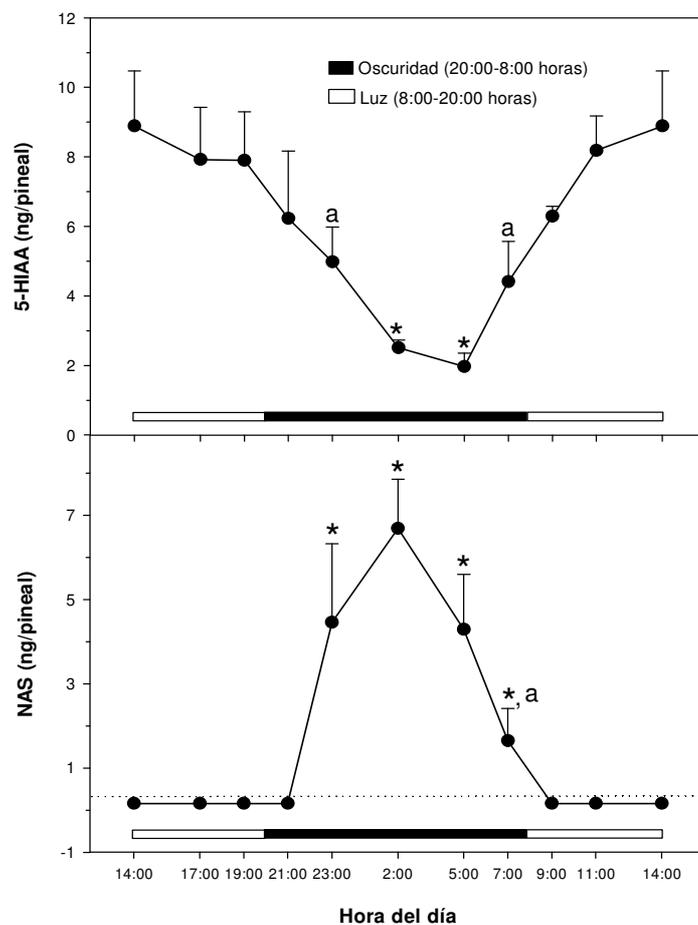


**Fig. 8.** Cambios en el contenido de NA y DA (ng/pineal) en la glándula pineal de la rata mantenida bajo un fotoperiodo L:O 12:12. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada punto temporal. \* $p < 0,05$  vs todos los grupos excepto el de las 23:00 h (NA) y 23:00 y 05:00 h (DA). <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs grupo de las 2:00 y 9:00 horas.

El contenido diario de 5-HIAA en la glándula pineal también sufre un descenso progresivo a partir del apagado de las luces, alcanzándose una reducción máxima del 83% entre las 2-5 horas con respecto a los valores de día ( $p < 0.05$  vs todos los grupos de día; Fig. 10). Al igual que ocurre con la 5-HT, los bajos niveles nocturnos de 5-HIAA comienzan a recuperarse ya antes del final de la noche.



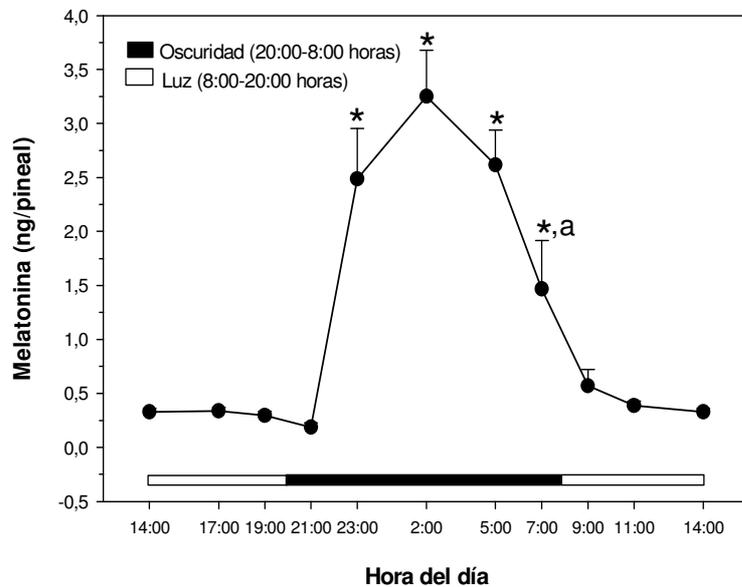
**Fig. 9.** Variación diaria en el contenido de 5-HTP y de 5-HT (ng/pineal) en la glándula pineal en un ciclo de L:O 12:12 horas. Los datos representados son la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada punto temporal. 5-HTP: \* $p < 0,05$  vs grupos sin asterisco, excepto el de las 7.00 horas; 5-HT: \* $p < 0,05$  vs grupos sin asterisco, <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs grupos de las 14:00, 17:00 y 19:00 horas.



**Fig. 10.** Cambios en el contenido de 5-HIAA y NAS (ng/pineal) en la glándula pineal en un ciclo de L:O 12:12. Los datos representados son la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo. 5-HIAA: \* $p < 0,05$  vs todos grupos, excepto el de las 7:00 horas; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs grupos de las 11:00 y 14:00 horas. NAS: \* $p < 0,05$  vs grupos sin asterisco; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs grupo de las 2:00 horas (medianoche).

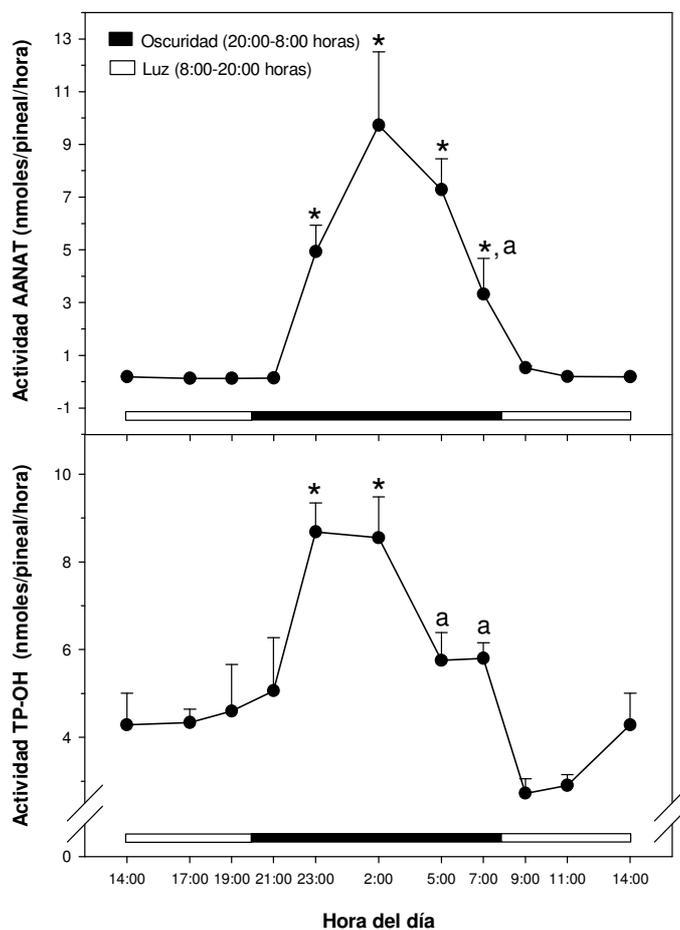
La Figura 10 muestra las variaciones del contenido de NAS en la glándula pineal de la rata a lo largo del ciclo luz/oscuridad, las cuales siguen un patrón diario inverso al de los indoles citados anteriormente. Durante el día y primera hora de oscuridad, el contenido de NAS es muy reducido con niveles, en algunos casos,

por debajo del límite de detección. A partir de la tercera hora de oscuridad se observa un aumento progresivo de los niveles de NAS que alcanzan a medianoche su máximo (56 veces los niveles de día). A partir de ese momento se produce un rápido descenso hacia los valores de día.



**Figura 11.** Cambios en el contenido de melatonina (ng/pineal) en la glándula pineal en un ciclo de L:O 12:12. Los datos representados son la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo. \* $p<0,05$  vs grupos sin asterisco; <sup>a</sup> $p<0,05$  vs grupo de las 2:00 horas.

Como se muestra en la Figura 11, el contenido de melatonina de la glándula pineal siguió un patrón diario muy similar al de su precursor metabólico más inmediato (NAS). Durante el día los niveles de melatonina son muy bajos, pero aumentan fuertemente a partir de la primera hora de oscuridad, hasta alcanzar el máximo en la mitad de la noche (aproximadamente 10 veces los valores de día,  $p<0.05$ ). Durante la segunda mitad de la noche y hasta la primera hora de la fotofase tiene lugar una reducción progresiva de los niveles de melatonina hasta alcanzar valores típicamente diurnos.



**Figura 12.** Cambios en la actividad AANAT y TP-OH en la glándula pineal en un ciclo de L:O 12:12. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 ratas en cada tiempo. AANAT: \* $p < 0,05$  vs grupos sin asterisco; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs grupos de las 5:00 horas. TP-OH: \* $p < 0,05$  vs grupos sin asterisco; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs grupos de las 23:00, 2:00, 9:00 y 11:00 h.

En la Figura 12 se pueden observar las variaciones de las actividades de los principales enzimas que regulan el metabolismo indólico pineal. En cuanto a la actividad AANAT, se observó un patrón diario similar al de la NAS y melatonina, con una actividad muy reducida en la fotofase la cual se incrementa fuertemente

en la tercera hora de la noche y alcanza su máximo a medianoche (100 veces los valores de día,  $p < 0.05$ ). La caída progresiva de la actividad AANAT en la segunda mitad de la noche permite alcanzar los valores de día ya en la primera hora de la fotofase.

Con respecto a la TP-OH, se observa que tras tres horas de oscuridad nocturna se produce un aumento en la actividad de este enzima que llega a duplicar los valores de día. Esta elevada actividad se sigue de una ligera caída en la segunda parte de la noche y un brusco descenso en la primera hora de luz (Figura 12).

## TRABAJO EXPERIMENTAL 2

### PAPEL DE LA SÍNTESIS DE 5-HT EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MELATONINA EN LA GLÁNDULA PINEAL



## 1. OBJETIVO

La 5-HT en la glándula pineal se localiza y se sintetiza en el interior de los pinealocitos, pero también en las terminales simpáticas que inervan la glándula (King et al., 1984a). No existen datos sobre la localización intracelular precisa de 5-HT, pero algunos estudios apuntan que ésta se encuentra mayoritariamente almacenada dentro de vesículas localizadas en extensiones de los pinealocitos (Hayashi et al., 1999). También se han encontrado procesos de transporte que podrían tener un papel en la regulación de los niveles vesiculares/citoplasmáticos de 5-HT (Hayashi et al., 1999). Además se conoce que una parte de la 5-HT pineal es secretada al medio extracelular (Azekawa et al., 1991) y que esta secreción puede sufrir fuertes variaciones a lo largo del día (Sun et al., 2002). A pesar de ello, poco se sabe de cómo estos distintos procesos regulan la disponibilidad de 5-HT en los pinealocitos, células en las que también tiene lugar la formación de melatonina.

En el Trabajo 1, hemos encontrado que a pesar de la elevada concentración de 5-HT presente en la glándula pineal durante el día, los niveles nocturnos de este indol están muy disminuidos debido al fuerte incremento de la vía de N-acetilación que la transforma en NAS y posteriormente en melatonina. En este proceso es posible que la disponibilidad limitada de 5-HT intrapinealocitaria pueda ser un factor que influya en la cantidad de melatonina formada. En base ello, el objetivo de este segundo trabajo fue determinar hasta que punto las alteraciones de la síntesis de 5-HT y de su disponibilidad en las células pineales pueden condicionar la producción de melatonina. Para ello, se realizaron experimentos en los que se provocó una reducción de la síntesis de 5-HT pineal mediante la administración de benserazida, un inhibidor de la L-aminoácido-aromático Descarboxilasa (LAAD), para evaluar su efecto sobre la producción de melatonina durante la noche o tras la administración del agonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos isoproterenol (ISO). Además, se investigó el efecto de la administración de L-Triptófano (L-Trp) sobre la síntesis de 5-HT y su repercusión en el contenido de melatonina pineal. Dado que el metabolismo serotoninérgico pineal está muy influido por el fotoperiodo y por la propia síntesis nocturna de melatonina, los estudios se realizaron durante las fases de luz y de oscuridad.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos**

La benserazida y el isoproterenol se adquirieron a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). El L-triptófano se adquirió a Fluka biochemika (Switzerland). Los demás reactivos fueron de grado analítico y obtenidos de diversas casas comerciales. El agua utilizada fue alta calidad obtenida a partir de un sistema de desionización Water Pro™ PS (Labconco® Co., MO, EE.UU.). Los estándares cromatográficos se prepararon siguiendo lo indicado en el Trabajo experimental 1.

### **2.2 Animales**

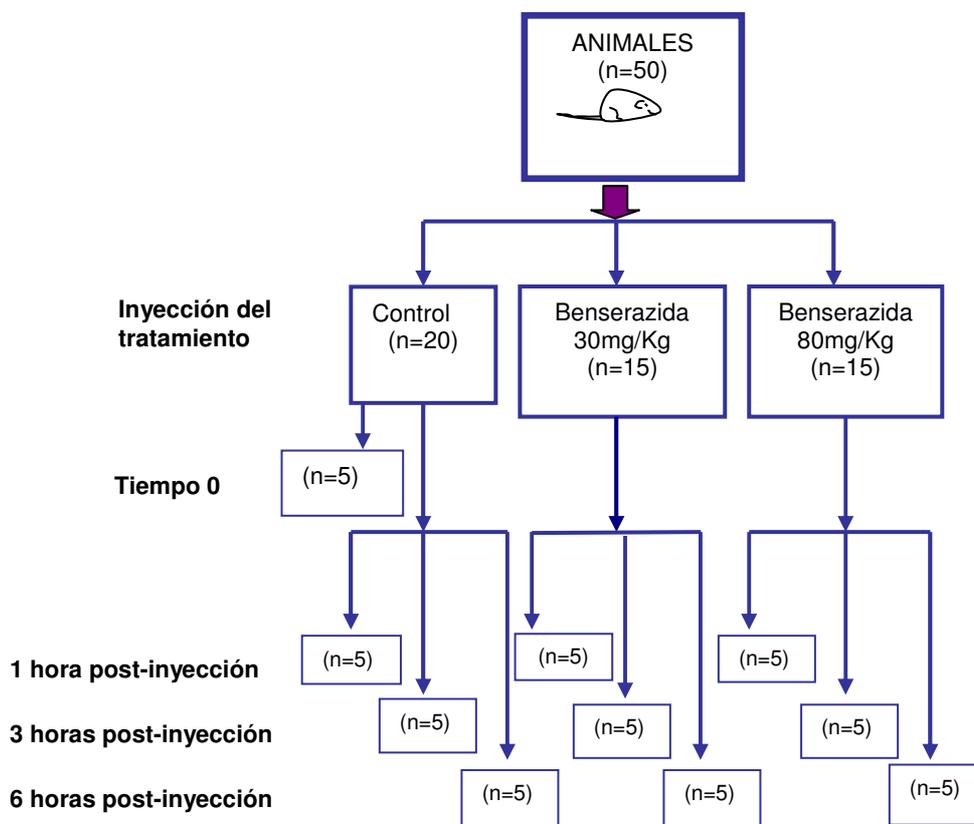
Ratas de la raza Sprague-Dawley fueron divididas en grupos de cinco animales por jaula y acondicionadas a un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12 horas (encendido de las luces a las 8:00 horas) durante al menos dos semanas antes de realizar el experimento. La temperatura se mantuvo constante a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , y los animales tuvieron libre acceso a agua y comida. El peso de estos osciló entre  $270 \pm 15$  g en el momento de realizar los experimentos.

### **2.3. Experimento 1. Administración de benserazida**

#### *2.3.1. Administración de benserazida durante el día*

El experimento fue realizado durante la fase de luz, administrándose el tratamiento a las cuatro horas del encendido de las luces. Se utilizaron 50 animales que fueron distribuidos en tres grupos diferentes según el tratamiento: control, benserazida 30 mg/Kg y benserazida 80 mg/Kg. La benserazida se disolvió en cloruro sódico 0.9% a la dosis deseada y se inyectó por vía i.p.. Los animales del grupo control recibieron tratamiento similar con el vehículo salino. Posteriormente, los animales de cada tratamiento se dividieron en tres subgrupos de cinco animales que fueron sacrificados por decapitación a una, tres y seis horas tras el tratamiento (Ver esquema 1). Además se incluyó un grupo de animales control que se sacrificaron a tiempo cero.

**Esquema 1.** Distribución de los animales y administración de los tratamientos.



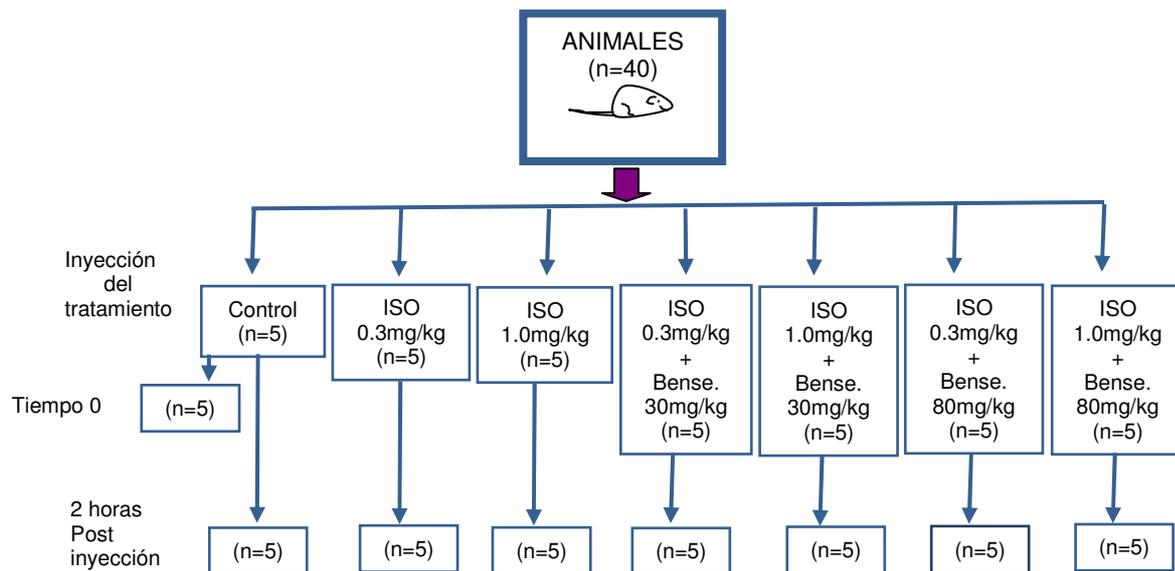
### 2.3.2. Administración de benserazida durante la noche

Se siguió un protocolo similar al indicado en el experimento de administración de benserazida durante el día (ver Esquema 1). En este caso, los tratamientos se aplicaron justo antes del apagado de las luces, coincidiendo el punto de muestreo de las seis horas con la mitad de la noche, momento en el que los niveles de melatonina son máximos.

## 2.4. Experimento 2. Administración de isoproterenol + benserazida (día)

El experimento fue realizado durante la fase de luz, administrándose el tratamiento a las cuatro horas del encendido de las luces. Se utilizaron 40 animales que fueron distribuidos en ocho grupos según el tratamiento recibido (control a tiempo cero, control a tiempo final, ISO 0.3 mg/Kg, ISO 1.0 mg/Kg, ISO 0.3 mg/Kg + benserazida 30 mg/Kg, ISO 1.0 mg/Kg + benserazida 30 mg/Kg, ISO 0.3 mg/Kg + benserazida 80 mg/Kg e ISO 1.0 mg/Kg + benserazida 80 mg/Kg). Tanto el isoproterenol como la benserazida se disolvieron en cloruro sódico 0.9% a las dosis deseadas, siendo administrados por vía intraperitoneal. Los animales del grupo control recibieron tratamiento similar con el vehículo salino. Los animales fueron sacrificados por decapitación a las dos horas tras la inyección (Esquema 2).

**Esquema 2.** Distribución de los animales y administración de los tratamientos.

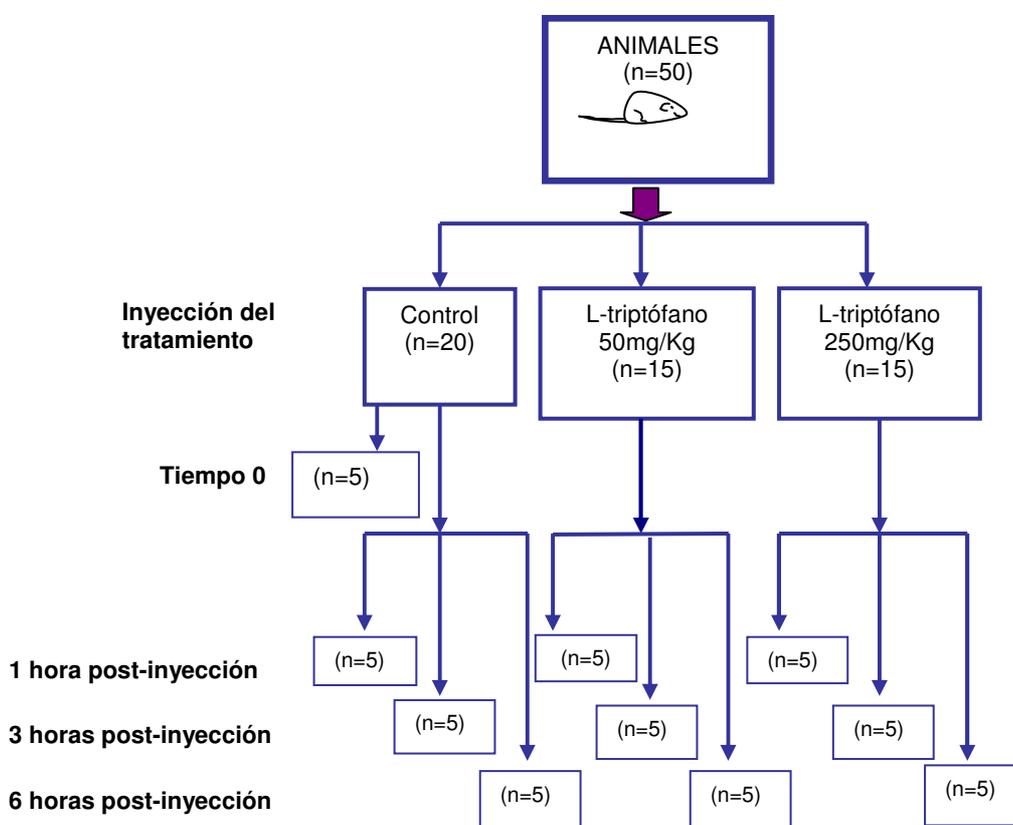


## 2.5. Experimento 3. Administración de L-triptófano

### 2.5.1. Administración de L-triptófano durante el día

El experimento fue realizado durante la fase de luz, administrándose el tratamiento a las cuatro horas del encendido de las luces. Se utilizaron 50 animales que fueron divididos en tres grupos según el tratamiento aplicado (control, L-triptófano 50 mg/Kg y L-triptófano 250 mg/Kg). El L-Triptófano se administró por vía intraperitoneal disuelto en cloruro sódico 0.9% a las dosis desadas, ajustándose la solubilidad con NaOH 0.5 N. Los animales control recibieron vehículo salino.

**Esquema 3.** Distribución de los animales y administración de los tratamientos.



Tras el tratamiento, las ratas se distribuyeron en subgrupos (n=5) y se sacrificaron por decapitación a una, tres, y seis horas después del tratamiento (Ver esquema 3). Un grupo de animales control fue inyectado y sacrificado inmediatamente (tiempo cero).

### *2.5.2. Administración de L-triptófano durante la noche*

Se siguió un protocolo experimental similar al indicado anteriormente (Ver esquema 3). En este caso, los tratamientos fueron administrados justo antes del apagado de las luces, de forma que los últimos grupos de animales (seis horas del tratamiento) se muestrearon en la mitad de la noche, presuntamente coincidiendo con los niveles máximos de melatonina.

## **2.6. Toma de muestras y procesamiento**

Tras el sacrificio de los animales, se extrajeron las glándulas pineales y se colocaron en viales mantenidos sobre nieve carbónica que fueron posteriormente guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. En ese momento las glándulas pineales fueron descongeladas sobre hielo, se eliminaron los posibles restos de sangre y se introdujeron de forma individual en viales tipo Eppendorf de 1.5 ml, en donde fueron sonicadas en frío en un procesador ultrasónico de alta intensidad a 30 ciclos (3x3 seg) en 100 $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0.1 M (pH de 6.8) conteniendo 0.5 mM de Acetil-CoA. Posteriormente los tejidos se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Del sobrenadante se tomaron alícuotas para la determinación inmediata de la actividad del enzima AANAT, mientras que otras alícuotas fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis cromatográfico de los diferentes compuestos pineales.

## **2.7. Determinaciones de la actividad enzimática de la AANAT y del contenido de catecoles, indoles y melatonina en la glándula pineal**

Las condiciones de los ensayos de la actividad de la AANAT, así como la cuantificación del producto formado en la reacción (N-acetil-triptamina) se llevaron a cabo tal y como se indica en el Trabajo experimental 1.

Las determinaciones analíticas de los niveles de NA, DA, 5-HT, 5-HIAA, 5-HTP, NAS y melatonina en las glándulas pineales se realizaron siguiendo los procedimientos cromatográficos ya descritos en el primer trabajo.

En los experimentos de administración de benserazida durante la noche no se cuantificaron los niveles de DA ni de 5-HTP debido a problemas analíticos. Asimismo, estos problemas también impidieron la cuantificación de NA y de DA en el experimento de administración de isoproterenol + benserazida.

## **2.8. Análisis estadístico**

Los datos están expresados como la media  $\pm$  E.E.M. de los valores obtenidos en cada tiempo y grupo experimental.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante un ANOVA de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples de Student-Newman Keuls (Systat Software). En las gráficas se reflejan solo los resultados significativos tras la comparación de los grupos con diferentes tratamientos que se muestrearon en el mismo tiempo.

## **3. RESULTADOS**

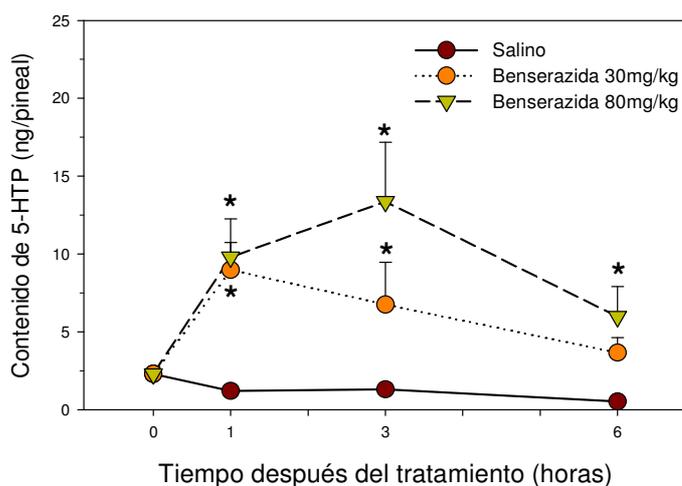
### **3.1. Experimento 1. Administración de benserazida**

#### *3.1.1. Administración de benserazida durante el día*

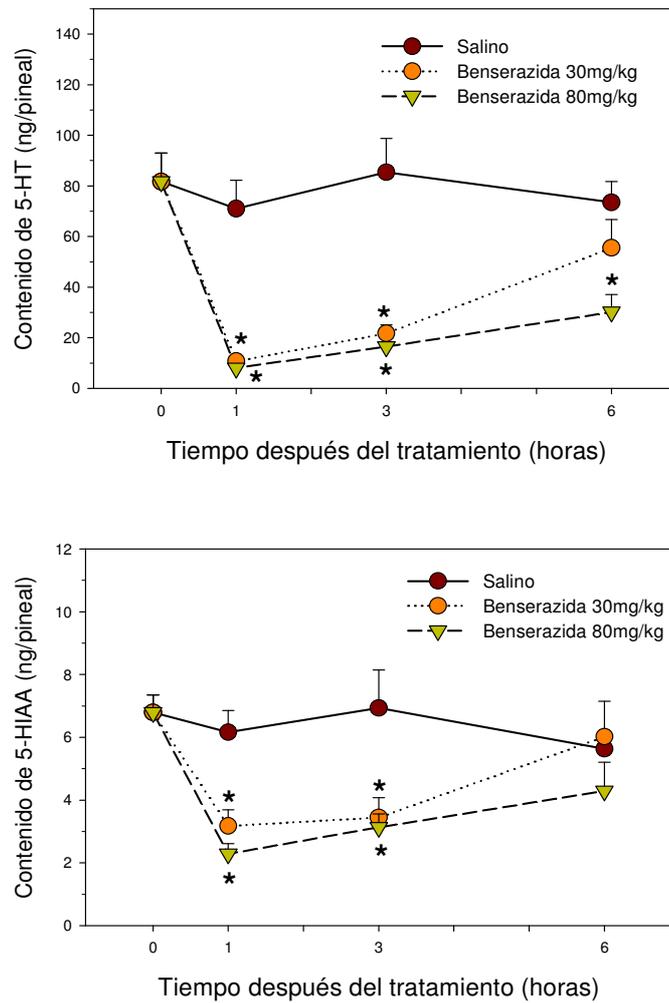
La administración i.p. de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante el día produjo un incremento en los niveles de 5-HTP que fue estadísticamente significativo en comparación con el grupo control, aumentando hasta un máximo del 500% (vs niveles a tiempo cero) con la dosis más elevada y a las tres horas tras administrarse el tratamiento. El efecto estimulador se observó ya en la primera hora tras el tratamiento y se mantuvo hasta las seis horas que duró el experimento (Figura 1).

Por el contrario, los niveles de 5-HT y 5-HIAA en la glándula pineal disminuyeron de forma significativa con las dos dosis de benserazida ( $p < 0.05$  vs control). Como podemos ver en la Figura 2, esta reducción fue evidente ya en la primera hora tras la administración de benserazida (del orden del 89% para la 5-HT y del 63% para el 5-HIAA) y se mantuvo a las 3 horas para ambos compuestos. Sin embargo, a las seis horas no se observaron diferencias significativas en el contenido de 5-HIAA entre los grupos tratados y control, aunque el efecto inhibitorio del tratamiento sobre el contenido de 5-HT permaneció hasta el final del experimento para la dosis de 80 mg/Kg.

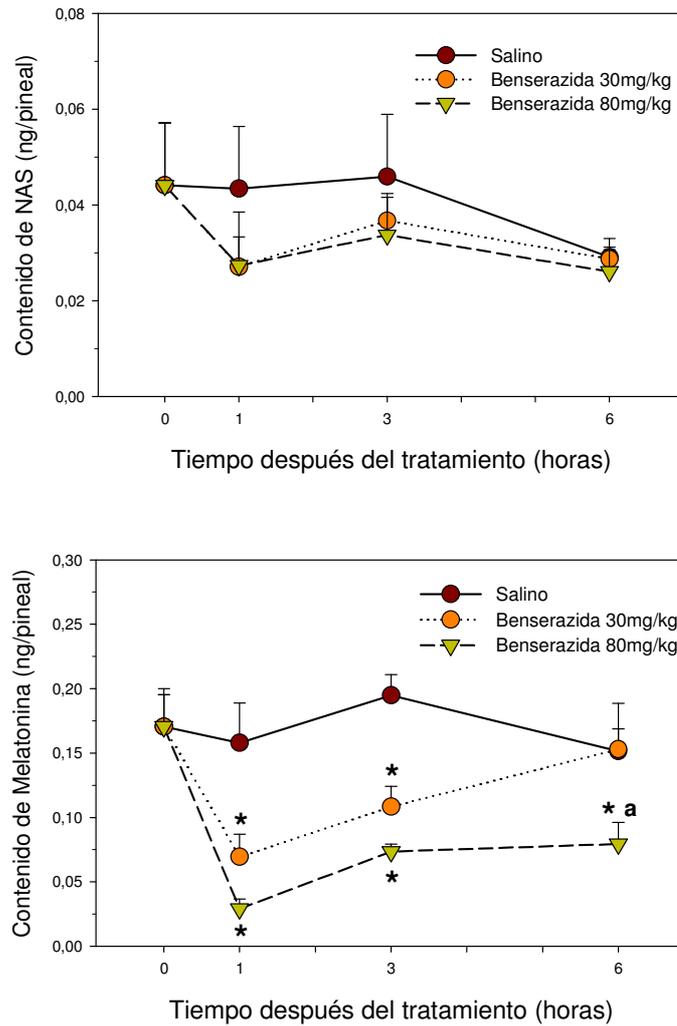
Con respecto al contenido de NAS en la glándula pineal, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los tratados (Fig. 3). No obstante, los niveles de melatonina sufrieron un descenso significativo ( $p < 0.05$ ) con ambas dosis de benserazida a las 3 y 6 horas del tratamiento, y con la dosis mayor a las 6 horas del tratamiento. La mayor inhibición tuvo lugar en la primera hora tras el tratamiento con la dosis de 80 mg/Kg (-82% vs control; Fig. 3).



**Fig. 1.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de 5-HTP tras la administración i.p. de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de cinco animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) a la misma hora.



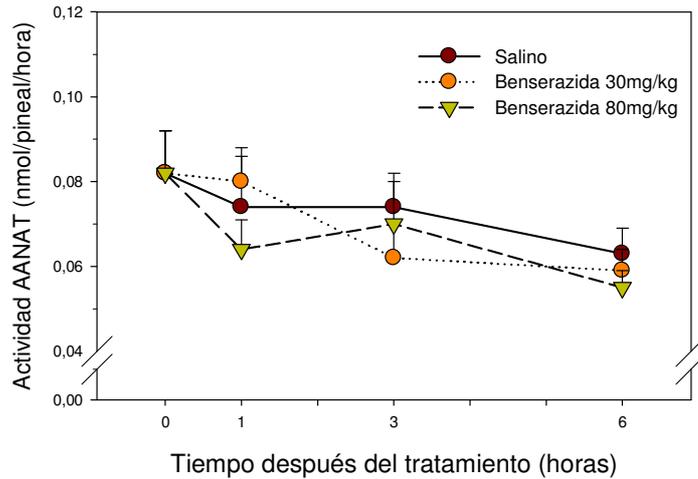
**Fig. 2.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de 5-HT y 5-HIAA tras la administración i.p. de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) a la misma hora.



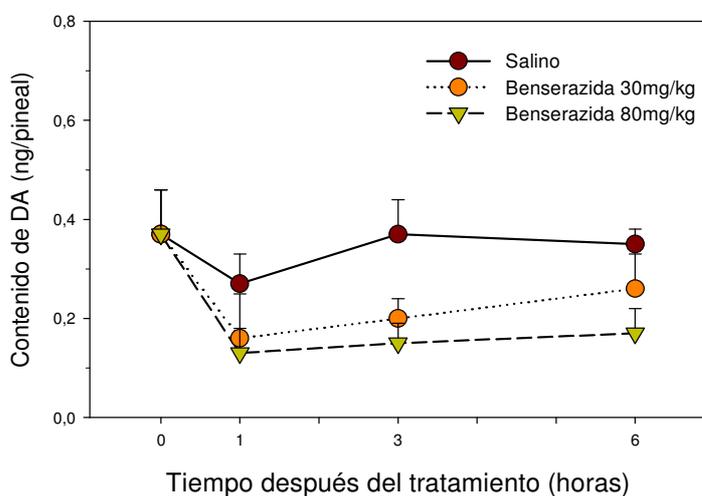
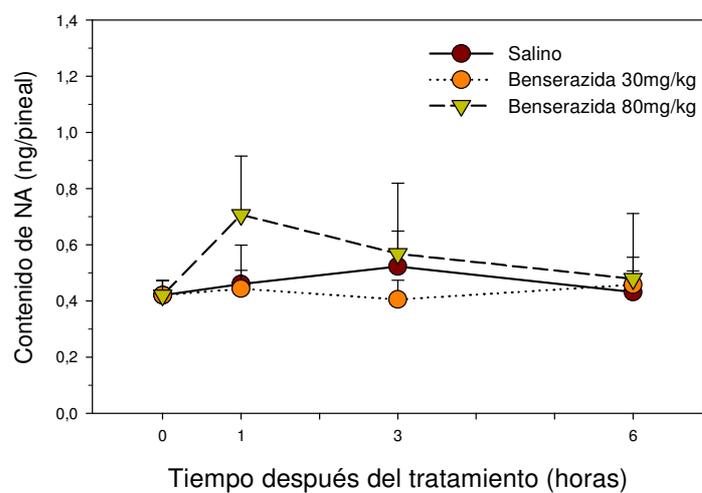
**Fig. 3.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de NAS y melatonina tras la administración intraperitoneal de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) a la misma hora y <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs benserazida 30 mg/Kg a la misma hora.

En cuanto a la actividad AANAT de la glándula pineal, ésta no se vio afectada por la aplicación intraperitoneal de benserazida durante el día (Fig. 4).

Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles pineales de NA y DA tras la aplicación de benserazida, aunque en el contenido de DA presentó una clara tendencia al descenso, sobre todo, a las seis horas tras el tratamiento (Fig. 5).



**Fig. 4.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de AANAT (ng/pineal) tras la administración intraperitoneal de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. No se observaron diferencias entre los grupos de la misma hora.



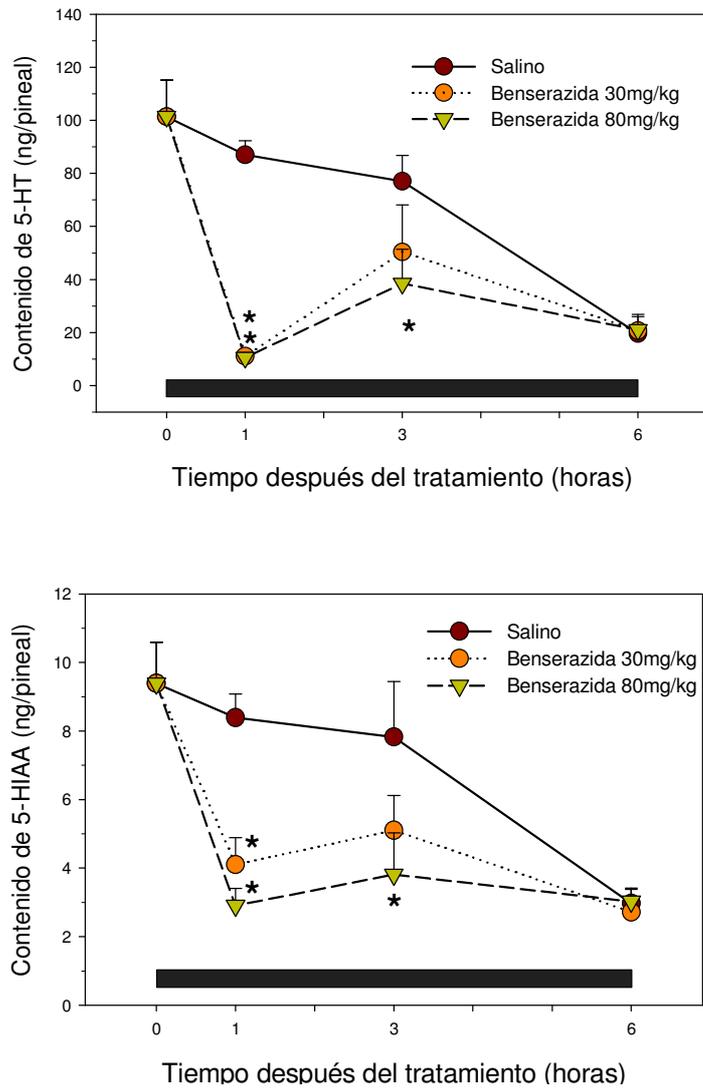
**Fig. 5.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de NA y DA tras la administración de benserazida (30 y 80 mg/Kg, i.p.) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. No hubo cambios significativos con los tratamientos efectuados.

### *3.1.2. Administración de benserazida durante la noche*

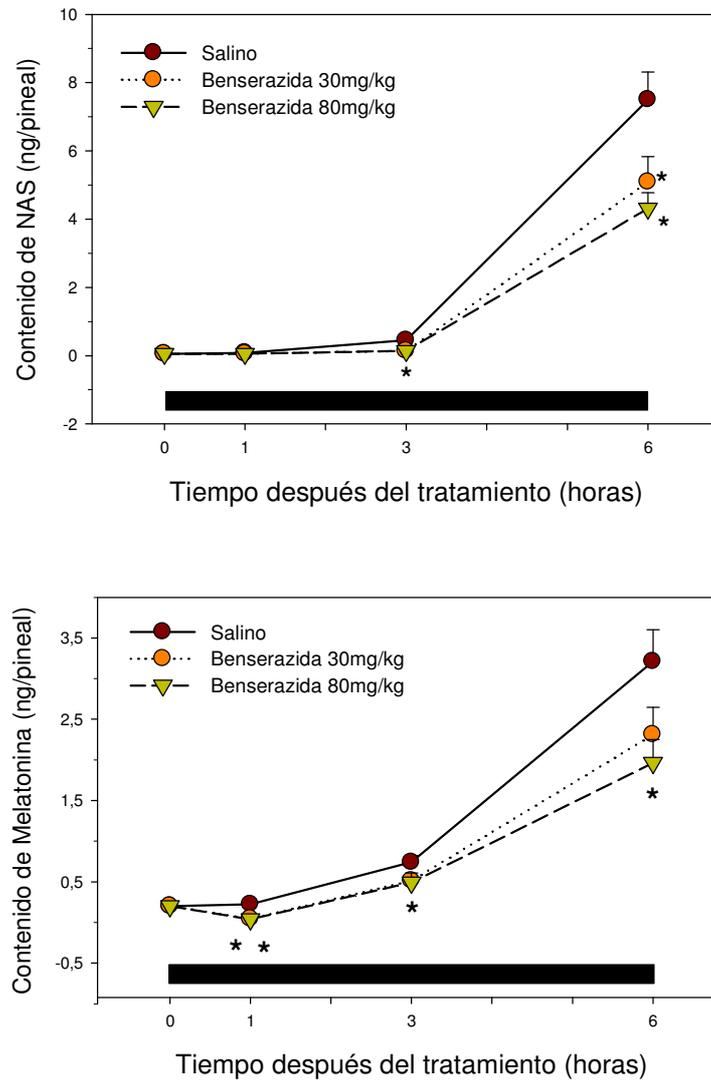
La administración i.p. de benserazida durante la noche produjo con ambas dosis (30 y 80 mg/Kg) un descenso significativo en los niveles de 5-HT en la glándula pineal en la primera hora del tratamiento (88% vs control) (Fig. 6). A las tres horas del tratamiento, solo la dosis mayor produjo un descenso significativo (50% vs control), mientras que a las 6 horas, no hubo diferencias con ninguna dosis de benserazida entre los animales tratados y control.

Los niveles de 5-HIAA presentaron unos perfiles de evolución temporal similares a los encontrados para los niveles de 5-HT (Fig. 6). De esta forma, se observó un descenso del contenido de 5-HIAA en la glándula pineal como consecuencia de la administración de benserazida a las dosis de 30 y 80 mg/Kg. En la Figura 6 se observa que dicha disminución se produjo en la primera y tercera hora tras el tratamiento, alcanzándose una caída máxima del 65% vs control para la dosis de 80 mg/Kg durante la primera hora post-inyección.

En la Figura 7 se muestran los cambios producidos por la inyección de benserazida en los niveles de NAS y melatonina en la glándula pineal, que en ambos casos se caracterizaron por disminución de sus contenidos. Con respecto a la melatonina, ambas dosis de benserazida resultaron en descensos de casi un 80% de los niveles de la hormona en la primera hora, con respecto al control. A las 3 y 6 horas del tratamiento solo la dosis mayor provocó caídas significativas de melatonina (aprox. 40% de los valores del control). Con respecto a los niveles de NAS, se encontraron disminuciones las 3 y 6 horas del tratamiento con benserazida 80 mg/Kg, y a las 6 horas con ambas dosis.



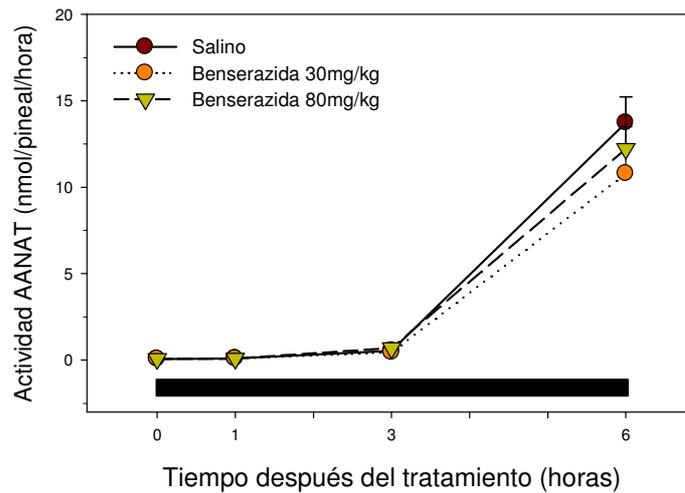
**Fig. 6.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de 5-HT y 5-HIAA tras la administración intraperitoneal de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante la noche. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) del mismo tiempo. La barra indica la fase de oscuridad.



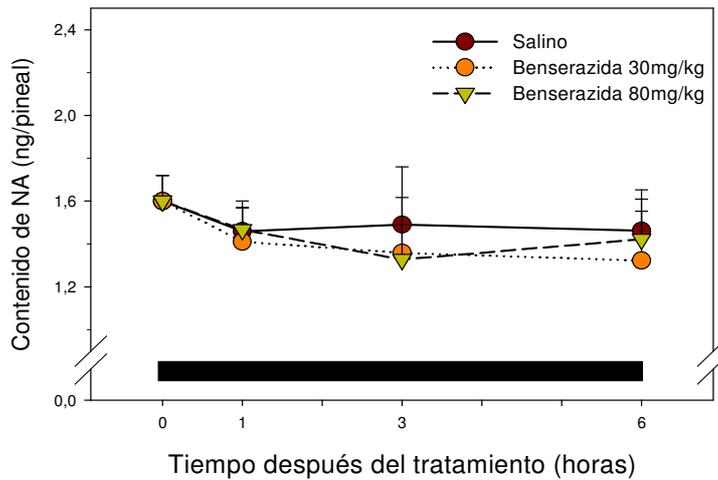
**Fig. 7.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de NAS y melatonina tras la administración intraperitoneal de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante la noche. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) del mismo tiempo. La barra indica la fase de oscuridad.

En la Figura 8 se muestra el efecto de la benserazida sobre la actividad AANAT en la glándula pineal durante la noche. No se observaron cambios significativos con ninguna de las dos dosis ensayadas.

El tratamiento con benserazida a las concentraciones de 30 y 80 mg/Kg tampoco produjo alteraciones significativas de los niveles nocturnos de NA en la glándula pineal (Fig. 9).



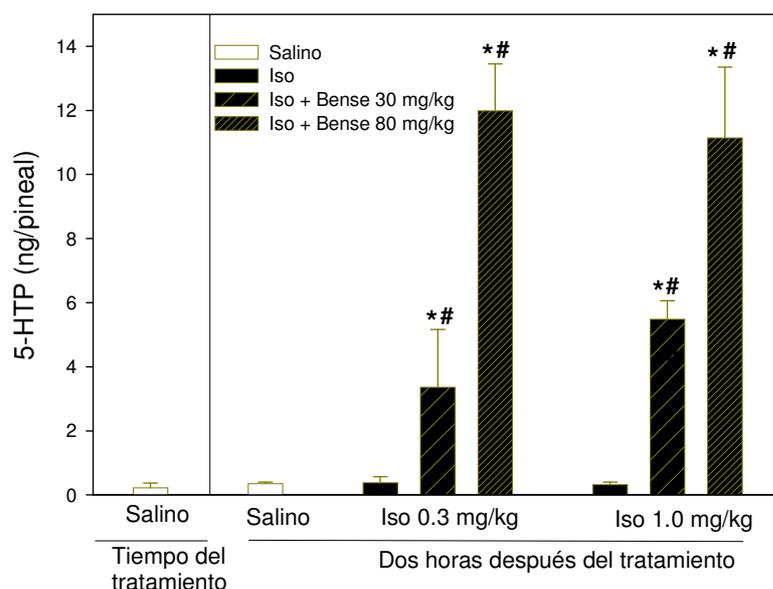
**Fig. 8.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de la actividad NAT tras la administración intraperitoneal de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante la noche. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. La barra indica la fase de oscuridad. No se observaron diferencias entre los grupos de la misma hora.



**Fig. 9.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de NA (ng/pineal) tras la administración intraperitoneal de benserazida (30 y 80 mg/Kg) durante la noche. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. La barra indica la fase de oscuridad. No se observaron diferencias entre los grupos de la misma hora.

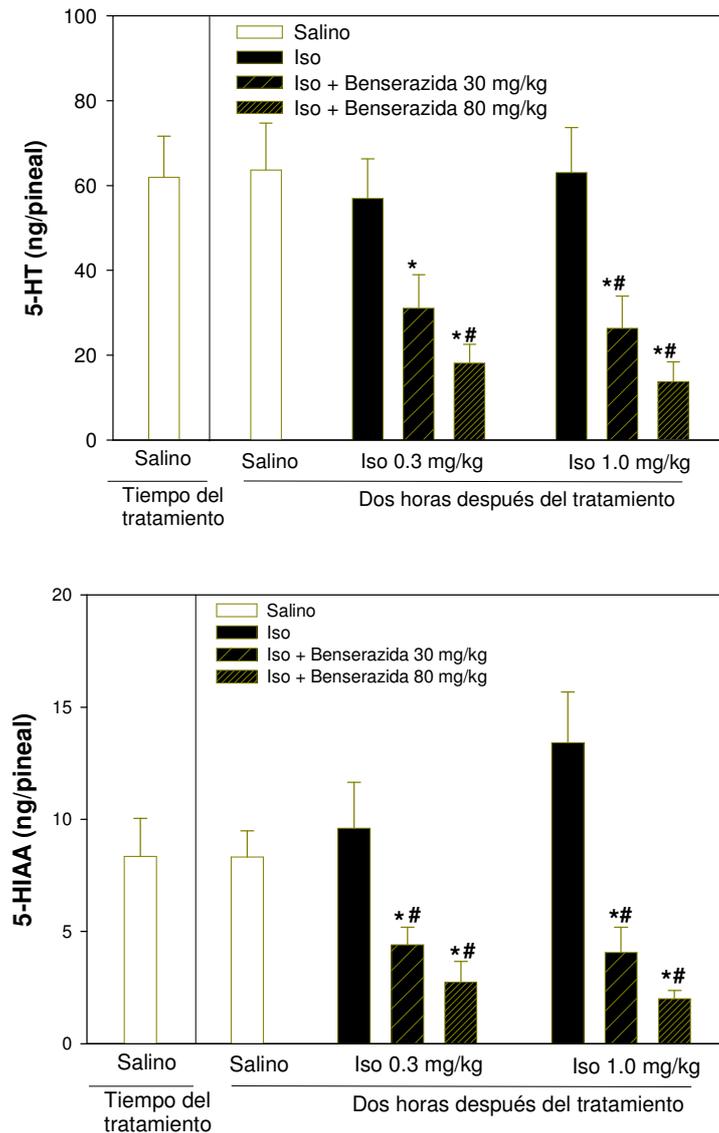
### 3.2. Experimento 2. Efecto del isoproterenol solo y/o combinado con benserazida

La administración de ISO (0.3 y 1 mg/Kg) no produjo cambios significativos en los niveles de 5-HTP en la glándula pineal (Fig. 10). Al combinar el tratamiento de ISO con benserazida, se observó un incremento en el contenido de 5-HTP que fue significativo con ambas dosis de benserazida (30 y 80 mg/Kg) tanto en relación con grupo control (salino) como el grupo que recibió solo ISO (0.3 ó 1.0 mg/Kg).

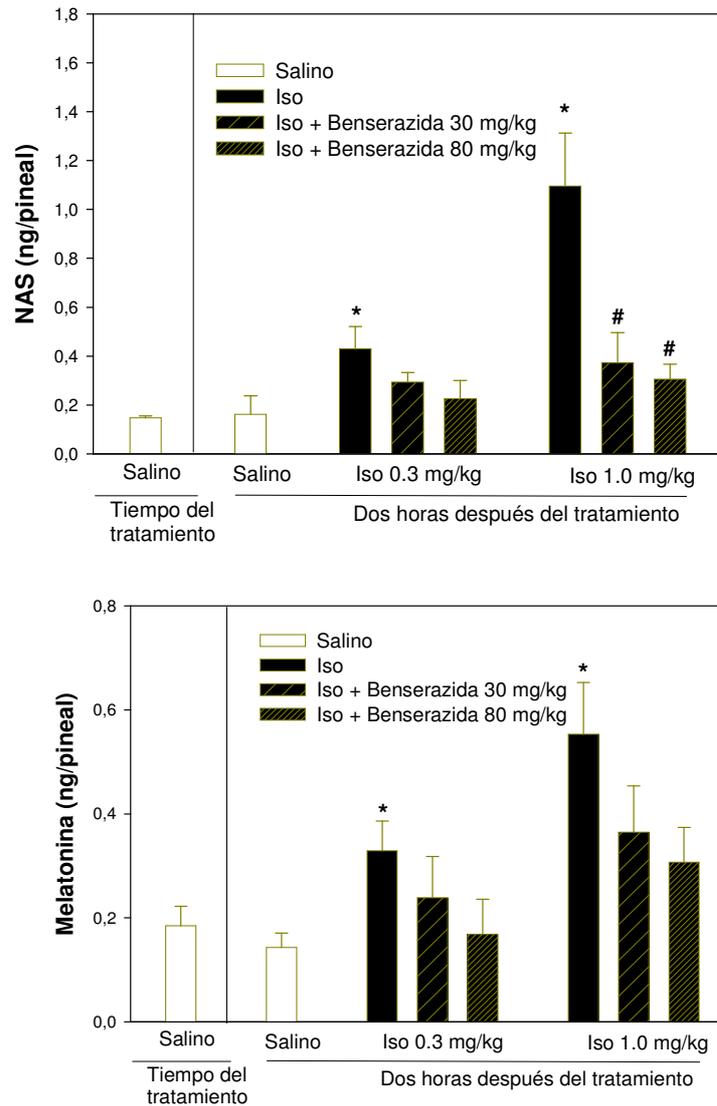


**Fig. 10.** Niveles de 5-HTP tras la administración de ISO (0.3 y 1.0 mg/Kg, i.p.) solo o en combinación con benserazida (30 y 80 mg/Kg). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) del mismo tiempo (2 horas tras el tratamiento). #  $p < 0,05$  vs grupo tratado con ISO (sin benserazida).

Los cambios provocados por el tratamiento con ISO solo y en combinación con benserazida sobre los contenidos de 5-HT y 5-HIAA siguieron un patrón similar (Fig. 11). Así, se observó que ninguna de las dosis de ISO, administrado solo, produjo cambios con respecto al grupo control. Sin embargo, al combinar ISO con benserazida 30 y 80 mg/Kg se observó un descenso en los niveles de ambas aminas que fue significativo con respecto al grupo control y al grupo tratado con ISO solo. En el caso de la 5-HT, los porcentajes de descenso estuvieron comprendidos entre -45% y -78%, lográndose éste último con la mayor dosis del tratamiento combinado de benserazida e ISO.



**Fig. 11.** Niveles de 5-HT y 5-HIAA tras la administración de ISO (0.3 y 1.0 mg/Kg, i.p.) solo o en combinación con benserazida (30 y 80 mg/Kg). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) del mismo tiempo (2 horas tras el tratamiento). #  $p < 0,05$  vs grupo tratado con ISO (sin benserazida).

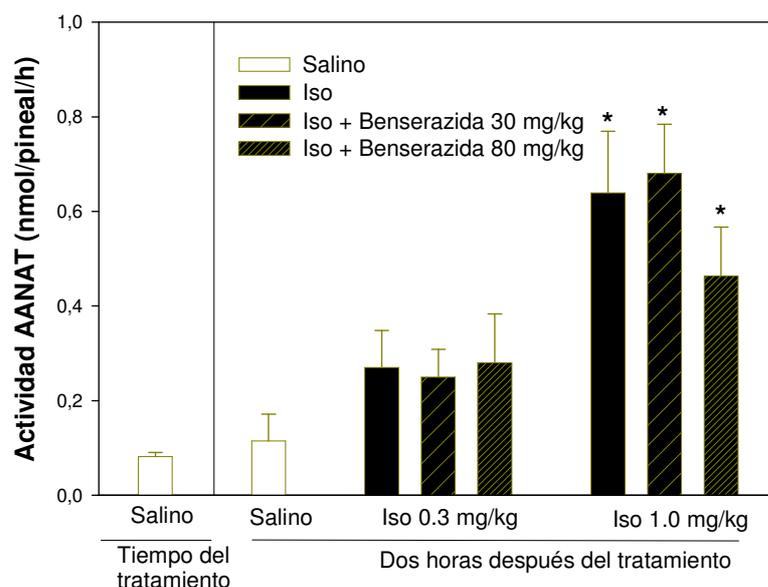


**Fig. 12.** Niveles de NAS y melatonina tras la administración de ISO (0.3 y 1.0 mg/Kg, i.p.) solo o en combinación con benserazida (30 y 80 mg/Kg). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) del mismo tiempo (2 horas tras el tratamiento). #  $p < 0,05$  vs grupo tratado con ISO (sin benserazida).

Los niveles de NAS y melatonina se muestran en la Figura 12. Tras la administración de ISO a las dosis de 0.3 y 1.0 mg/Kg, se observó un aumento en los niveles de NAS y melatonina en la glándula pineal en comparación con el grupo control sacrificado a la misma hora ( $p < 0.05$ ). La combinación de ISO 0.3 mg/Kg con benserazida 30 mg/Kg y 80 mg/Kg no provocó cambios significativos en los niveles de NAS en relación a los animales que recibieron ISO 0.3 mg/Kg solo, aunque se observó una caída de casi un 50% con la dosis mayor de benserazida (no significativo). Sin embargo, cuando se combinó ISO 1.0 mg/Kg y benserazida (30 y 80 mg/Kg) se produjo una fuerte disminución del contenido de NAS con respecto a los animales tratados solo con ISO 1.0 mg/Kg (-85% vs ISO,  $p < 0.05$ ) en relación al grupo de ISO 1.0 mg/Kg. Los grupos que recibieron ISO 1.0 mg/Kg y benserazida no fueron significativamente diferentes del grupo tratado con salino (control).

Con respecto a la melatonina, los resultados fueron similares a los observados para NAS, con aumentos provocados por el ISO (0.3 mg/Kg: +100%; 1.0 mg/Kg: +260% vs salino a la misma hora). El tratamiento conjunto de ISO + benserazida (30 mg/Kg ó 80 mg/Kg) resultó en un descenso en los niveles de melatonina, aunque en ningún caso (ni con ISO 0.3 mg/Kg, ni con ISO 1.0 mg/Kg) se alcanzó la significación, probablemente debido a la elevada variabilidad encontrada en los animales tratados con ISO.

En cuanto a la actividad AANAT, ambas dosis de ISO produjeron aumentos de la misma, pero solo se alcanzó significación con la dosis mayor (ISO 1.0 mg/Kg) con respecto a los animales que recibieron salino y que fueron sacrificados a la misma hora (Fig. 13). Cuando el ISO se administró conjuntamente con benserazida (30 y 80 mg/Kg), no se observaron cambios en relación con el efecto de ISO solo.

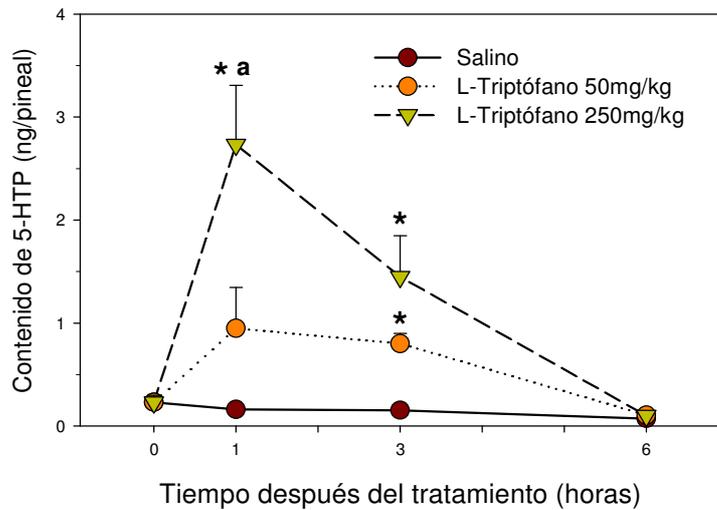


**Fig. 13.** Actividad AANAT pineal tras la administración de ISO (0.3 y 1.0 mg/Kg, i.p.) solo o en combinación con benserazida (30 y 80 mg/Kg). Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino) del mismo tiempo (2 horas tras el tratamiento).

### 3.3. Experimento 3. Administración de L-triptófano

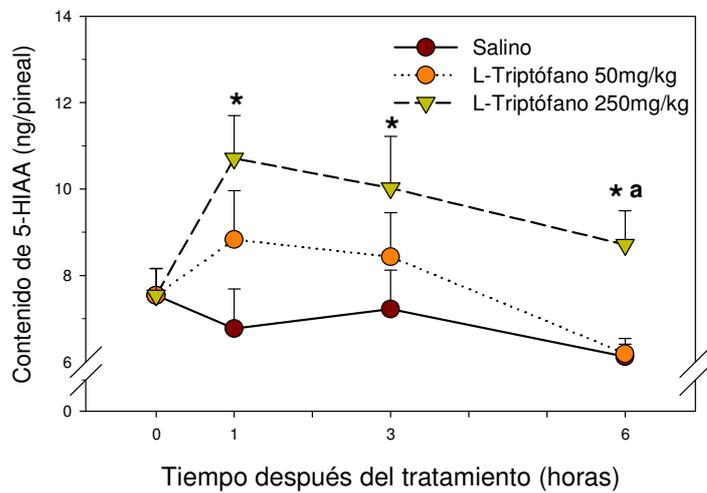
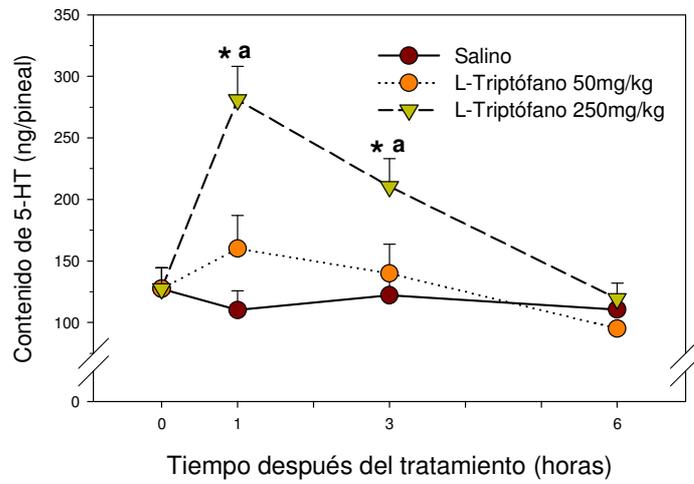
#### 3.3.1. Administración de L-triptófano durante el día

La administración del aminoácido L-triptófano durante el día, produjo un incremento de los niveles de 5-HTP en la glándula pineal. Este incremento fue significativo ( $p < 0.05$ ) con las dosis de 50 y de 250 mg/Kg, obteniéndose el mayor efecto con la dosis mayor y una hora tras el tratamiento (+1696% vs control). El efecto decayó con el tiempo de forma que a las seis horas post-inyección ya se obtuvieron valores similares al control (Fig. 14).

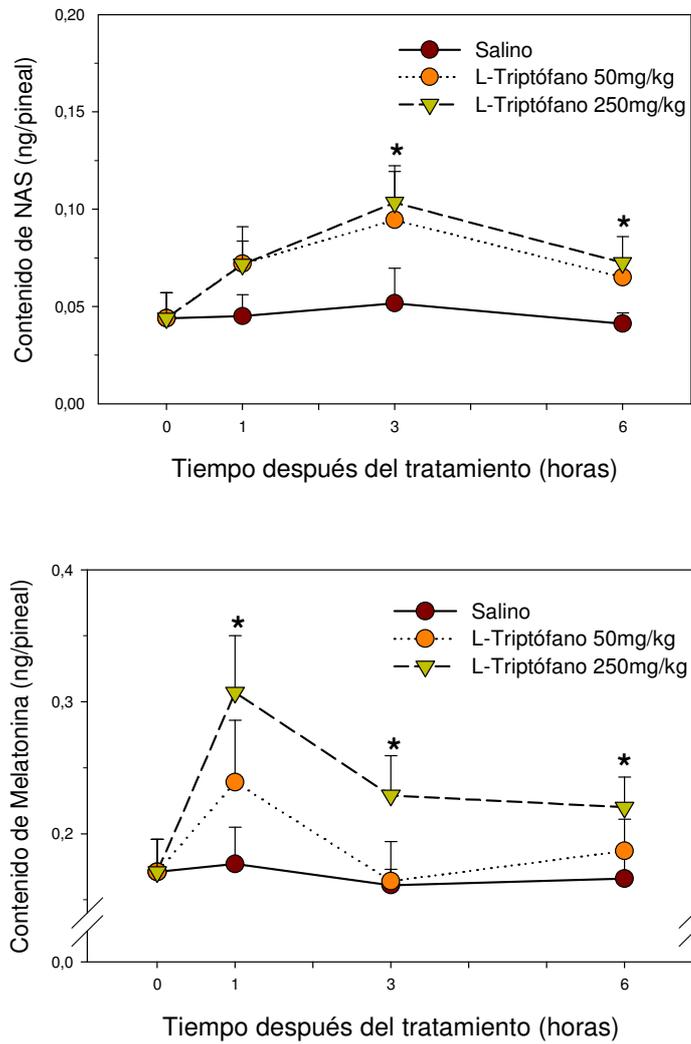


**Fig. 14.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de 5-HTP tras la administración intraperitoneal de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino), <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs L-triptófano 50 mg/Kg.

De manera similar al 5-HTP, el contenido de 5-HT aumentó fuertemente en los animales tratados con L-Trp. Los mayores efectos se obtuvieron con la dosis de 250mg/Kg, alcanzándose un máximo incremento una hora tras el tratamiento (+155% con respecto a control) que fue seguido por una reducción paulatina hasta las 6 horas. Con la dosis de L-Trp 50mg/Kg no se observaron diferencias significativas con el control (Fig. 15).



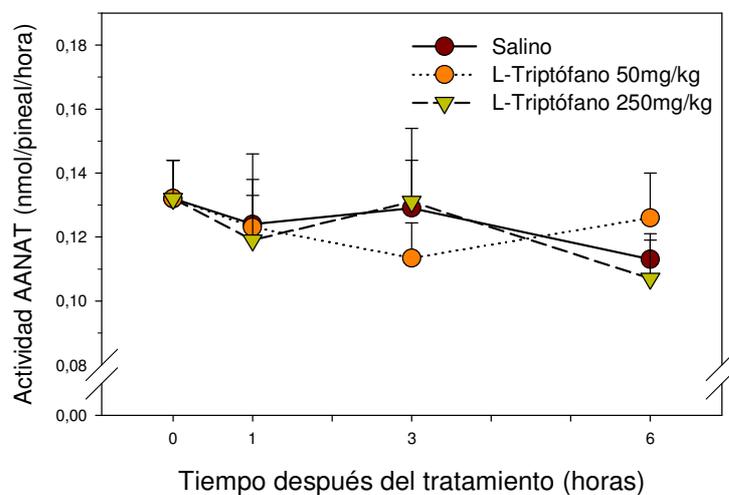
**Fig. 15.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de 5-HT y 5-HIAA tras la administración de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg, i.p.) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino), <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs L-triptófano 50 mg/Kg.



**Fig. 16.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de NAS y melatonina tras la administración intraperitoneal de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0,05$  vs control (salino), <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs L-triptófano 50 mg/Kg.

En cuanto a los niveles de 5-HIAA, se observó un aumento en los grupos tratados con L-Trp (Fig. 15). Este incremento fue significativo solo con la dosis de 250 mg/Kg en todos los tiempos estudiados, alcanzándose valores máximos del +58% con respecto al control a la primera hora posterior al tratamiento.

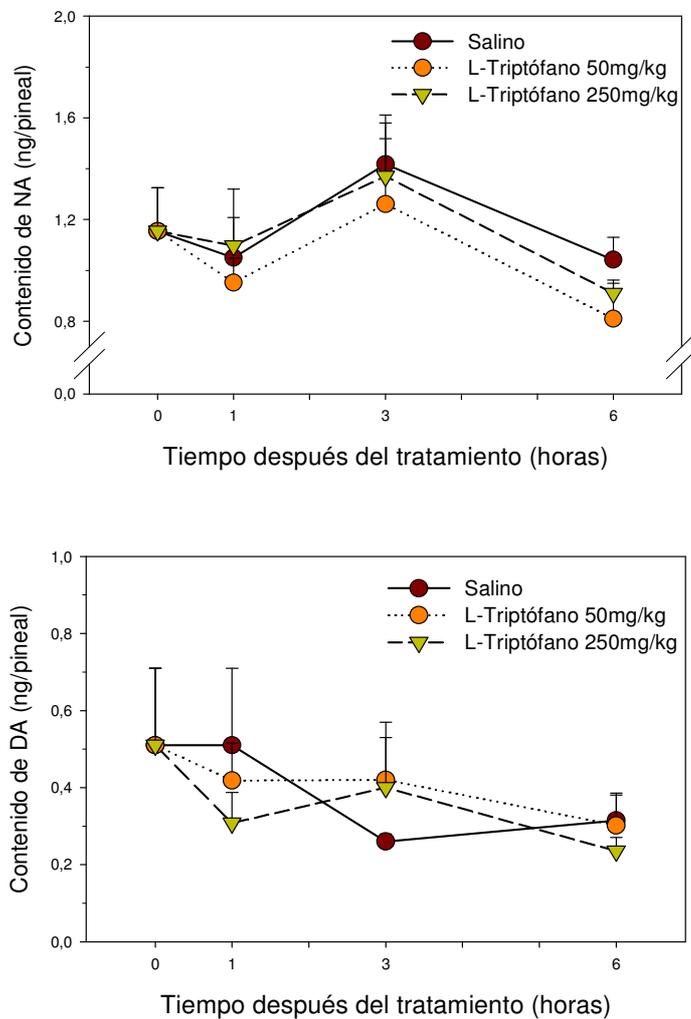
Del mismo modo, la administración de L-triptófano 250 mg/Kg produjo un aumento en los niveles de NAS (+159% con respecto al control). La dosis menor de L-Trp no produjo cambios significativos (Fig. 16). También los niveles de melatonina mostraron niveles mayores que los animales control en todos los tiempos estudiados (1, 3 y 6 horas tras el tratamiento con L-Trp 250 mg/Kg). La dosis de 50 mg/Kg no originó cambios significativos en la melatonina (Fig. 16).



**Fig. 17.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de AANAT tras la administración intraperitoneal de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. No se observaron diferencias entre los grupos de la misma hora.

Con respecto a la actividad AANAT pineal, no se observaron efectos significativos del tratamiento con L-Trp a las dos dosis ensayadas (Fig. 17).

Por último, tampoco se observaron alteraciones en el contenido de catecolaminas (NA y DA) en la glándula pineal tras el tratamiento con L-Trp (Fig. 18).



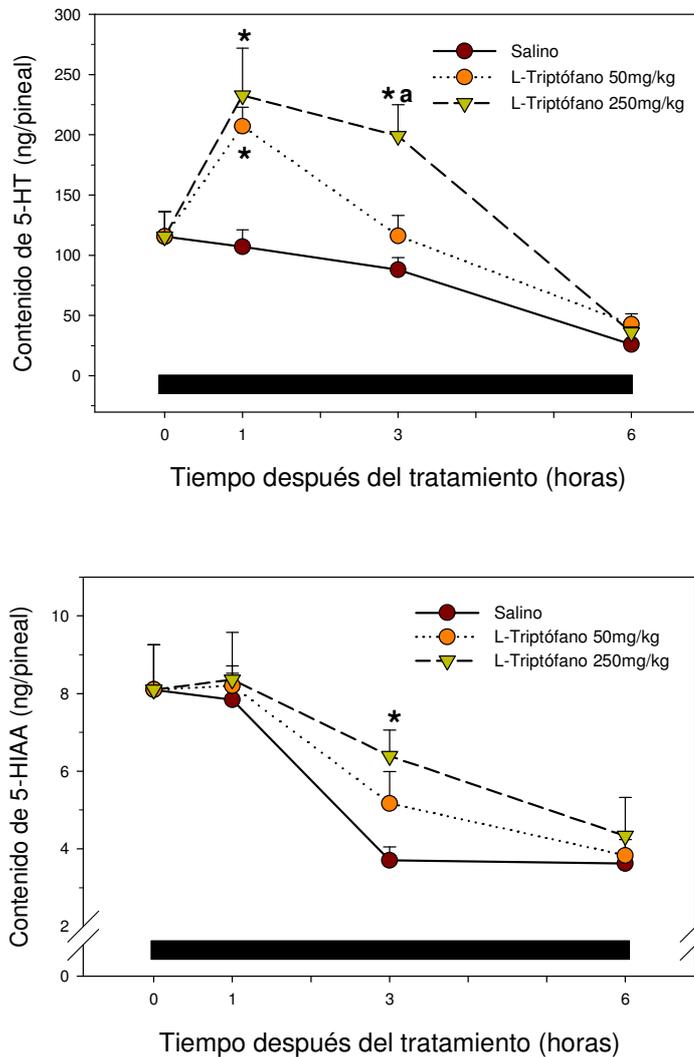
**Fig. 18.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de NA y DA tras la administración de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg, i.p.) durante el día. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. No se observaron diferencias entre los grupos de la misma hora.

### 3.3.2. Administración de L-triptófano durante la noche

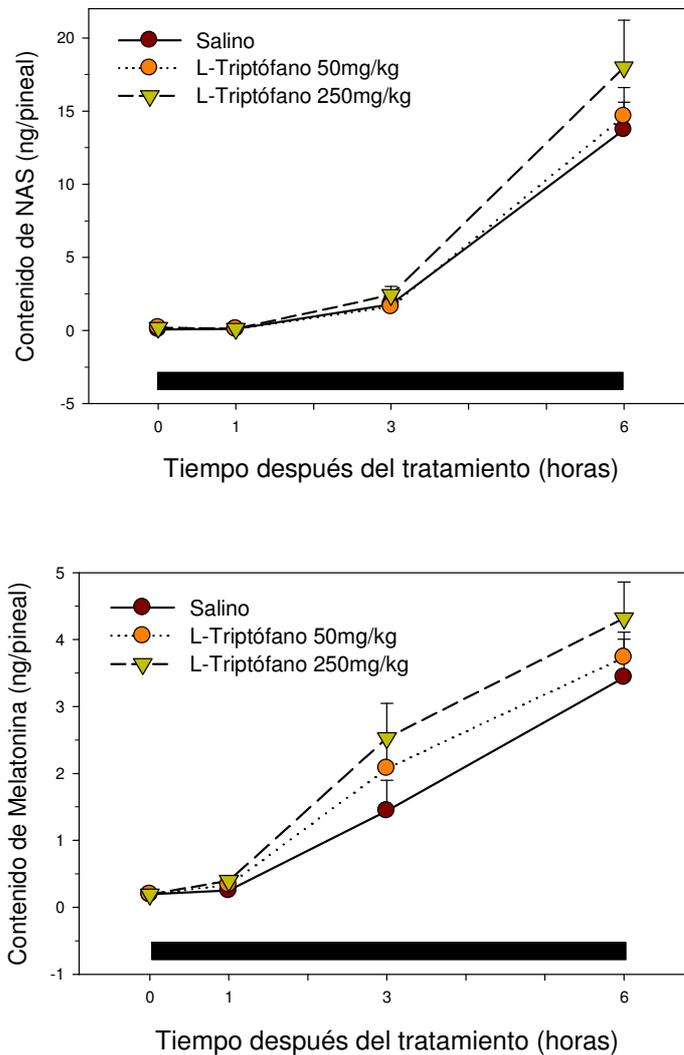
En este experimento nocturno no se pudieron medir los niveles de 5-HTP pineales debido a problemas analíticos surgidos en la experimentación. Con respecto a los otros indoles, los niveles observados en el grupo control decayeron progresivamente durante las primeras horas de la noche, siendo a las 6 horas significativamente menores que los hallados a tiempo cero (inicio de la noche). En los grupos en los que administró L-triptófano al inicio de la noche, se observó un incremento significativo en los niveles de 5-HT a 1 y 3 horas del tratamiento ( $p < 0.05$  vs respectivo control). El mayor efecto se observó a una hora tras la inyección del tratamiento y con la dosis de 250 mg/Kg (+117% vs control), el cual decayó hasta las 6 horas donde se obtuvieron valores similares al del grupo control (Fig. 19). Con la dosis de 50 mg/Kg solo se observó un aumento significativo a 1 hora post-inyección.

Con respecto a los niveles de 5-HIAA, se observó una caída paulatina en el grupo control durante las 6 primeras horas de oscuridad (Fig. 19). En los animales tratados con L-Trp esta caída no fue tan acusada, particularmente en el grupo que recibió la dosis de 250 mg/Kg que presentó niveles de 5-HIAA mayores que el grupo control a las 3 horas del tratamiento ( $p < 0.05$ ). Con la dosis de 50 mg/Kg no hubo cambios significativos.

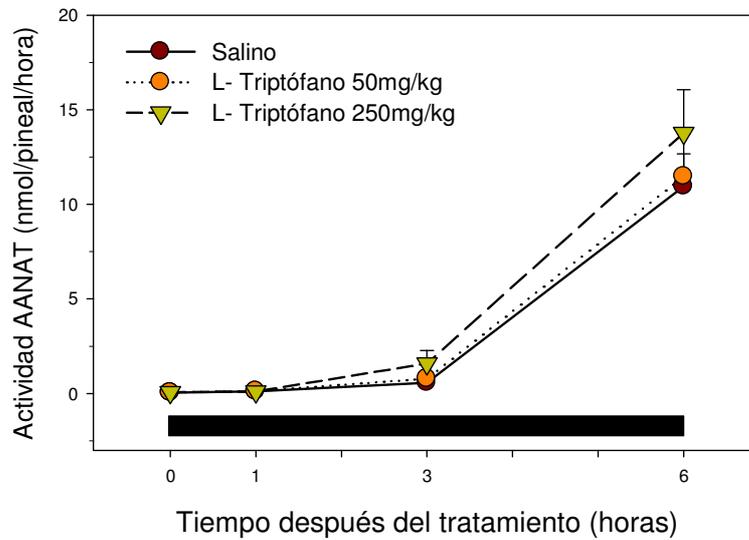
Como se observa en la Figura 20, el tratamiento con L-Trp no afectó al incremento normal que se produce durante las primeras horas de la noche en los niveles de NAS y melatonina en la glándula pineal. Solo se observaron ligeros incrementos con la dosis mayor de L-Trp a las 6 h del tratamiento, coincidiendo con los mayores niveles de NAS y melatonina, aunque estos no fueron significativos. Tampoco se detectaron cambios significativos en la actividad AANAT (Fig. 21), la cual tanto en los grupos control como en los que recibieron L-Trp, presentó un fuerte aumento durante las primeras horas de la noche.



**Fig. 19.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de 5-HT y 5-HIAA tras la administración intraperitoneal de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg) durante la noche. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. \* $p < 0.05$  vs salino al mismo tiempo, <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs L-triptófano 50 mg/Kg. La barra indica la fase de oscuridad.

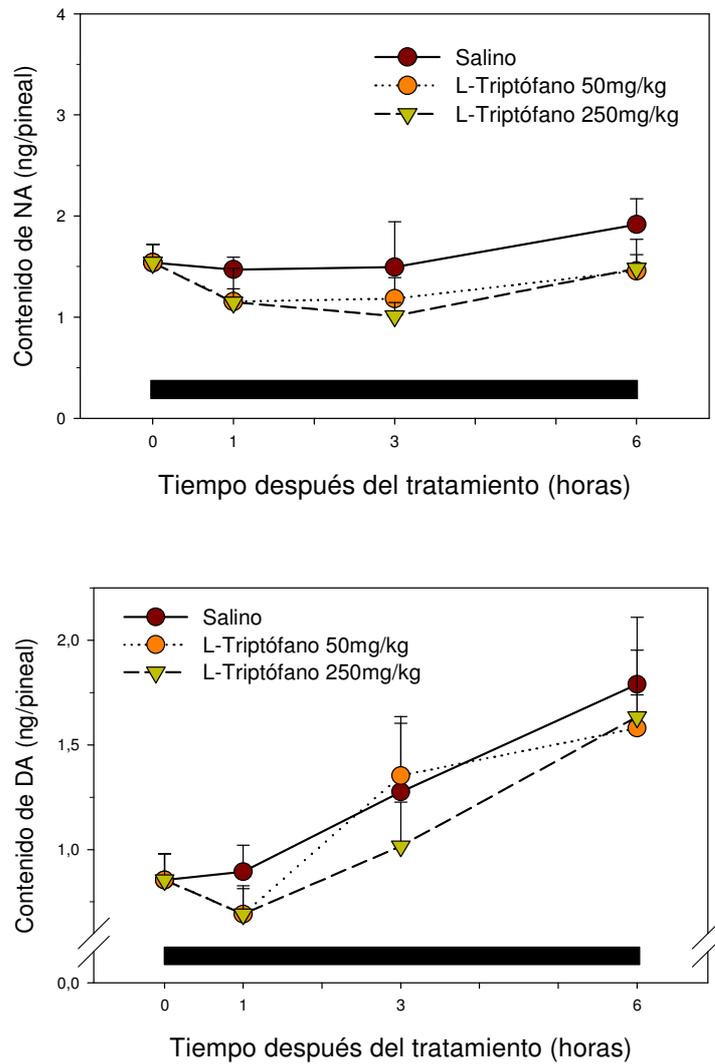


**Fig. 20.** Secuencia temporal del contenido de NAS y melatonina tras la administración intraperitoneal de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg) durante la noche. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. La barra indica la fase de oscuridad. No se observaron diferencias entre los grupos de la misma hora.



**Fig. 21.** Secuencia temporal de cambios la actividad AANAT tras la administración intraperitoneal de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg) durante la noche. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. La barra indica la fase de oscuridad. No se observaron diferencias entre los grupos de la misma hora.

Con respecto a las catecolaminas pineales, no se encontraron alteraciones en sus niveles debido al tratamiento con L-triptófano en ninguna de las dosis y tiempos estudiados (Fig. 22).



**Fig. 22.** Secuencia temporal de cambios en los niveles de NA y DA tras la administración intraperitoneal de L-triptófano (50 y 250 mg/Kg) durante la noche. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales en cada tiempo y tratamiento. No se observan diferencias entre los grupos de la misma hora. La barra indica la fase de oscuridad.

## TRABAJO EXPERIMENTAL 3

1. Puesta a punto de una técnica de microdiálisis para el estudio *in vivo* de la liberación de melatonina en la glándula pineal de la rata.
2. Evaluación mediante microdiálisis de los cambios diarios de los niveles extracelulares de indoles y melatonina en la glándula pineal de la rata en libre movimiento.



## 1. OBJETIVO

En el Trabajo experimental 1 se ha demostrado que en la glándula pineal de la rata existe un marcado ritmo en el contenido de melatonina, el cual es generado en base a la actividad circadiana emitida desde el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Klein et al., 1997). Además, hemos constatado la existencia de elevadas concentraciones de 5-HT que juegan una función importante al servir como precursor de la síntesis de melatonina, hecho que viene corroborado por la correlación inversa entre los niveles de estos compuestos a lo largo el ciclo día/noche. No obstante, esta función podría no ser la única ya que: i) no existe una clara relación estequiométrica entre los niveles diurnos y nocturnos de serotonina y melatonina, ii) los niveles de 5-HT disminuyen prontamente al inicio de la fase de oscuridad, mientras que la actividad de la N-acetiltransferasa y la síntesis de melatonina no alcanzan su máximo hasta pasadas 2-3 horas de dicho inicio, iii) existen trabajos que demuestran que una parte de la 5-HT pineal puede ser secretada extracelularmente (Sun et al., 2002), pudiendo esta contribuir a la regulación de los niveles intrapinealocitarios y, con ello, a la disponibilidad de 5-HT para la síntesis de melatonina (Míguez et al., 1997b).

A pesar de que los niveles de melatonina pueden ser determinados fácilmente en varios fluidos corporales y en el tejido pineal, la monitorización continua del proceso de secreción endocrina pineal puede ofrecer una visión más fiable de los cambios que ocurren en la síntesis de melatonina lo largo del ciclo diario y de los mecanismos de su regulación. En los últimos años, las técnicas de microdiálisis han sido utilizadas con éxito para monitorizar la liberación de neurotransmisores en diversos tejidos neuronales (Westerink y Cremers, 2007). La posibilidad de que estas técnicas puedan ser aplicadas en animales en libre movimiento las hace de especial interés para el estudio de procesos rítmicos que deben ser monitorizados de forma continuada con la menor alteración posible de la actividad animal. Por ello, un limitado número de laboratorios han intentado aplicar la microdiálisis al estudio de la función pineal en roedores (Azekawa et al., 1991; Barassin et al., 1999; Sun et al., 2003), habiéndose observado varios condicionantes técnicos que han de ser solventados en cada laboratorio de forma particular (Barassin et al.,

1999). Teniendo en cuenta esos preliminares, en el presente trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- ✓ Poner a punto una metodología de microdiálisis útil para la monitorización continua y prolongada en el tiempo de los niveles extracelulares de melatonina y de indoles en la glándula pineal de la rata en libre movimiento.
- ✓ Evaluar las fluctuaciones diarias de la liberación de melatonina e indoles pineales en la rata en libre movimiento y profundizar en la comprensión de la interacción funcional entre el principal producto de la glándula pineal, la melatonina, y su precursor metabólico, la serotonina.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos**

La melatonina, la 5-HT, la N-acetiltriptamina, y el 5-HIAA y el isoproterenol, fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Los demás reactivos fueron de grado analítico y se obtuvieron de casas comerciales. El agua utilizada fue alta calidad obtenida a partir de un sistema de desionización. Los estándares cromatográficos (5-HT, 5-HIAA, melatonina y NAS) se prepararon tal y como se describe en el Trabajo experimental 1.

### **2.2. Animales de experimentación**

Se emplearon ratas macho de la raza Sprague Dawley de  $280 \pm 20$  g de peso mantenidas bajo un fotoperiodo L:O 14:10, con una temperatura controlada de  $21 \pm 1$  °C y con libre acceso a agua y comida. A efectos de facilitar del desarrollo experimental, en el experimento 1 los animales se expusieron a un fotoperiodo en el que se invirtieron las fases de luz y oscuridad, de forma que el encendido de las luces tuvo lugar a las 20:00 horas y el apagado a las 10:00 horas. Los animales se mantuvieron en estas

condiciones durante al menos dos semanas consecutivas antes de realizar cualquier experimento. En el experimento 2 la situación lumínica fue la de un fotociclo normal con encendido de las luces a las 08:00 h y apagado a las 22:00 horas.

El manejo de los animales fue llevado a cabo según la legislación española: RD 1201/2005 del 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 252 del 21 de octubre).

## **2.3. Desarrollo de una técnica de microdiálisis válida para estudios pineales**

### ***2.3.1. Fundamentos de las técnicas de microdiálisis intracerebral***

La microdiálisis cerebral es una técnica diseñada para obtener y poder cuantificar niveles de neurotransmisores, metabolitos y otras sustancias endógenas relacionadas con la actividad del sistema nervioso en animales conscientes y en libre movimiento (Westerink et al., 1987; Di Chiara et al., 1996; Ungerstedt, 1997; Parent et al., 2001). Además, permite la administración de fármacos y tóxicos en animales de forma local, evitando interacciones inespecíficas con los sistemas generales de regulación (Westerink y Cremers, 2007). La técnica se basa en la difusión de moléculas solubles a través de una membrana semipermeable, la cual es implantada entre el medio que contiene los compuestos a medir (por ejemplo el espacio intersticial cerebral) y una solución que carece de dichas sustancias (medio de perfusión). Para los estudios en el cerebro de animales de experimentación *in vivo*, se utilizan sondas que portan en su extremo final la membrana de diálisis. La implantación de dichas sondas mediante técnicas estereotáxicas permite acceder a un tejido cerebral específico.

Esta técnica presenta una serie de ventajas con respecto a otras utilizadas para el estudio de la función nerviosa (Benveniste, 1989), entre ellas se pueden citar:

1. Puede ser utilizada en animales despiertos en libre movimiento (estudios de comportamiento) y en animales anestesiados (estudios neurofarmacológicos).
2. Puede ser aplicada a casi todas las áreas cerebrales, independientemente de su tamaño (hasta cierto límite) y localización.
3. El daño en el tejido cerebral es mínimo durante los primeros días posteriores a la implantación de la sonda.
4. Se obtienen muestras poco contaminadas que no requieren desprotección para su posterior análisis.
5. Los compuestos obtenidos no sufren degradación enzimática.
6. La sonda de microdiálisis puede ser utilizada como un sistema de suministro de fármacos *in situ*, permitiendo la localización específica de éstos en el área de investigación.

El gran desarrollo de la microdiálisis cerebral desde hace aproximadamente tres décadas ha incrementado de forma sorprendente nuestros conocimientos sobre los procesos bioquímicos que tienen lugar en el tejido cerebral, convirtiéndose en el método de referencia para la toma de muestras *in vivo*.

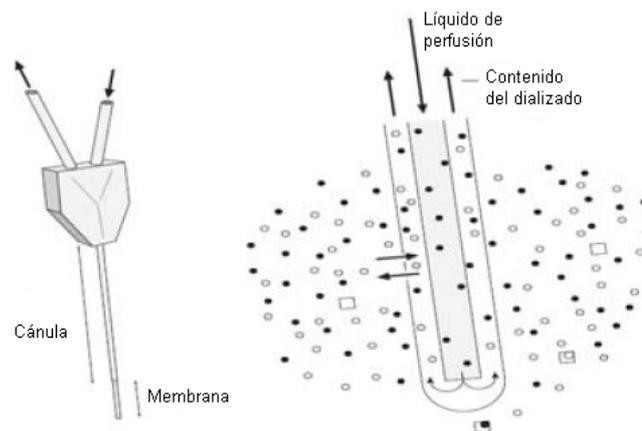
### **2.3.2. La sonda de microdiálisis: modelos y características**

Se han descrito al menos tres tipos de sondas para uso en microdiálisis: concéntricas, dobladas en U y transversales, todas ellas optimizadas para la aplicación a nivel cerebral según la zona a estudiar (Di Chiara, 1990; Ungerstedt, 1997). Tanto a nivel de uso experimental, como en lo referente a su disponibilidad comercial, las sondas de microdiálisis más habituales son las de tipo concéntrico con cánula única. En ellas la membrana de diálisis va insertada en el extremo final de una cánula metálica, por cuyo interior se hacen pasar dos capilares finos de sílice de diferente longitud y que constituyen las vías de entrada y salida del líquido de perfusión en la sonda. Estas sondas son particularmente útiles y ventajosas en la implantación vertical en la mayor parte de regiones cerebrales, ofreciendo además como

ventajas su reducido volumen muerto y tamaño. Por otro lado, las sondas en U y las transversales son menos frecuentes, aunque presentan características interesantes para su utilización en zonas cerebrales de difícil acceso y en determinados modelos experimentales (Di Chiara, 1990).

La membrana de diálisis es el componente crítico de la sonda, ya que es la interfase donde se produce la transferencia de sustancias entre el fluido extracelular en el que están presentes los compuestos de interés y el medio de perfusión utilizado (líquido cefalorraquídeo artificial: LCRa). Por ello la membrana de diálisis ideal debe de ser inerte (no irritante para el tejido) y permitir el paso selectivo de moléculas de pequeño tamaño (diámetro de poro menor de 15.000 daltons para neurotransmisores y sus metabolitos), pero prevenir el paso de enzimas para evitar la degradación de aquellos. En general, estas membranas son las mismas que se utilizan para diálisis renal y su composición suele ser sobre la base de polimeros acrílicos y de metilcelulosa.

Sonda de microdiálisis



**Esquema 1.** Estructura y funcionamiento de una sonda de microdiálisis.

La utilización de las sondas de microdiálisis *in vivo* requiere el control de parámetros tales como la naturaleza, longitud de la membrana de diálisis y tasa de flujo de la perfusión. Estos factores determinan el rendimiento de la

sonda, es decir, el porcentaje de recuperación de los compuestos presentes en el líquido intersticial, por lo que su efecto ha de ser establecido con anterioridad. Dada la enorme dificultad de realizar esta evaluación *in vivo*, ésta se lleva a cabo *in vitro* utilizando soluciones con concentraciones conocidas de las sustancias que se pretenden determinar. Aunque la difusión de sustancias a través de la membrana de diálisis debe ser diferente (presumiblemente menor) *in vivo* que *in vitro*, los valores de rendimiento de la sonda *in vitro* son un buen indicativo del funcionamiento correcto de la misma y de las condiciones de repetitibilidad del experimento.

### **2.3.3. Implantación de las sondas y medios de perfusión**

El procedimiento que se sigue para la implantación y localización de las sondas en el cerebro es similar al que se sigue en la implantación de electrodos o de cánulas intracerebrales para administración de tratamientos, teniendo en cuenta que debe realizarse una fijación permanente de la sonda al hueso del cráneo, a fin de evitar el desplazamiento y rotura de la misma.

La vida media de la sonda implantada en el cerebro es, por lo general, de unos pocos días, a partir de los cuales se produce una reacción gliótica que se desarrolla en el tejido que está en contacto con la sonda; el resultado es un revestimiento de la membrana semipermeable con células inflamadas y tejido conectivo que forma una barrera que impide la difusión entre el líquido extracelular cerebral y el medio de perfusión (Benveniste, 1989).

Las soluciones de perfusión que se utilizan en experiencias de microdiálisis cerebral son aproximaciones a la composición real del líquido extracelular cerebral y de igual osmolaridad. De este modo, la presión osmótica ejercida por los iones de los compartimentos intra- y extracánula es idéntica, lo que permite el equilibrio entre los dos compartimentos y la difusión pasiva bilateral a través de la membrana de las sustancias. Así, el desplazamiento de los solutos dependerá básicamente de la diferencia de concentraciones entre el medio extracelular y el líquido de perfusión que circula por el interior de la sonda (Sharp et al., 1987). En general los medios de perfusión son soluciones con concentraciones fisiológicas de los iones electroactivos ( $\text{Na}^+$ ,

Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, etc.) más comunes del líquido cefalorraquídeo. Es por ello que reciben la denominación de líquido cefalorraquídeo artificial.

#### **2.3.4. Componentes del sistema de microdiálisis utilizado en los estudios**

El sistema básico de microdiálisis utilizado incluyó una bomba de microinfusión (KDSscientific, Letica, Barcelona) con jeringas adaptables (Hamilton; 1 ml de volumen máximo), tubos de polietileno (CMA, diámetro interno de 0.38 mm y diámetro externo de 0.7 mm), conectores de plástico (CMA) y sondas de microdiálisis (fabricadas en nuestro laboratorio). Los tubos de polietileno y las conexiones fueron acortados al mínimo posible a fin de reducir el volumen muerto; los conectores plásticos sirvieron para unir las jeringas rellenas de LCRa con los tubos de polietileno y a estos con la entrada y salida de la sonda. Para la recolección de las muestras se utilizaron viales de cristal de volumen mínimo con sección cónica (Waters M144) especiales para autoinyectores.

El LCRa utilizado en los experimentos, estuvo compuesto por: NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.26 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.18 mM. (pH= 6.5-6.8). Este medio fue seleccionado de acuerdo con lo descrito por Adell y Artigas (1991).

#### *Construcción de sondas de microdiálisis "tipo L"*

La glándula pineal de la rata se sitúa justo por debajo de la confluencia del seno sagital superior y el seno transversal, lo que complica enormemente la implantación de sondas de tipo vertical. Por ello, y con el fin de no dañar el aporte sanguíneo, la implantación de la sonda debe realizarse de forma que evite estos senos. En este sentido, se han descrito métodos de implantación en sentido diagonal (Sun et al., 2003) y transversal (Drijfhout et al., 1993), todos ellos con aparataje específico y maniobras complejas que hacen difícil su incorporación a otros laboratorios.

En nuestro laboratorio hemos realizado una novedosa modificación de la sonda de microdiálisis para facilitar su implantación en la glándula pineal, permitiendo la realización de experimentos en animales en libre movimiento de forma continuada. Por ello la sonda fue construida expresamente para tal fin, presentando como característica principal la formación de un ángulo de 90°, haciendo una “L” en la cánula de implantación (Fig. 1). La inserción de la sonda en el cerebro hasta alcanzar el tejido pineal implicó atravesar un hemisferio cerebral, introduciendo la sonda en un acceso lateral realizado en el temporal derecho del cráneo de la rata.

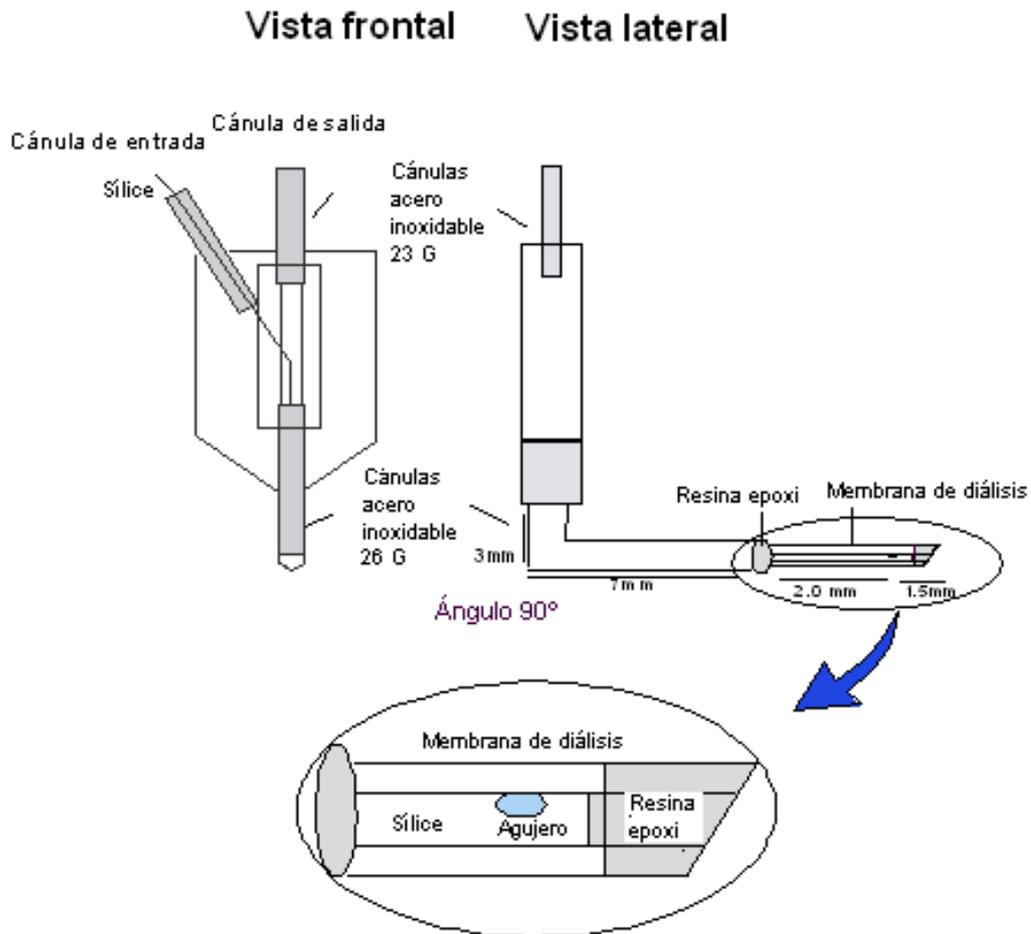
Los detalles de la construcción de la sonda de microdiálisis fueron expuestos en el *III Congreso de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental*. Alicante, 2000, (Paz-Valiñas et al., 2000). En el *3<sup>rd</sup> European Conference on Comparative Neurobiology: Modern Views on Brain Homologies*. Murcia, 2001, (Paz-Valiñas et al., 2001), y en la reunión de “*Cronobiología 2000*”, celebrado en el *Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département de Neurobiologie des Rythmes de la Universidad de Estrasburgo, Francia*, (Paz-Valiñas, 2000).

A continuación se detallan brevemente los principales pasos para la fabricación de la sonda de microdiálisis, que utilizó los siguientes materiales específicos:

- 1.-Membrana de diálisis de celulosa (Spectra/Por Hollow Fiber bundles; Spectrum Med. Inc.; LA, USA; diámetro interno de 200  $\mu\text{m}$ ). *Cutoff* de 9000 daltons.
- 2.-Cánulas metálicas de acero inoxidable de 26 G (d. i. de 450  $\mu\text{m}$ ) y 23 G (diámetro interno de 600  $\mu\text{m}$ ).
- 3.-Capilares de sílice fundida de 40  $\mu\text{m}$  d.i. x 150  $\mu\text{m}$  d.e. (Harvard apparatus, Ma, EEUU).
- 4.-Resina epoxi (Araldite rápido; Ciba-Geigy, Suiza).
- 5.-Micropinzas, microtijeras, minitaladro con equipamiento diverso y lupa.

La secuencia de pasos para la realización de la sonda fue la siguiente (Fig.1):

1. Introducir el capilar de sílice (aproximadamente 4 cm) por el interior de una cánula de acero inoxidable (26 G; 15 mm longitud), hasta la mitad de su longitud. Se realiza entonces un pequeño agujero en el lateral del sílice, a 1.5 mm del extremo final del mismo. Dicho extremo se había cortado previamente en bisel.
2. Se dobla el tubo de acero inoxidable hasta realizar un ángulo de 90°. Se desliza con cuidado el sílice por el interior de la cánula metálica de tal forma que sobresalga 2 mm desde el extremo final.
3. Se coloca una sección de membrana alrededor del extremo final del tubo de sílice, de un tamaño ligeramente mayor, de forma que se introduzca 2 mm en la cánula metálica. Se sella la membrana a la cánula con resina epoxi. Además, con dicha resina se taponan el extremo final (ambos: membrana y sílice) de la sonda con cuidado de no bloquear el agujero lateral realizado anteriormente en el sílice.
4. Finalmente se realiza el cuerpo de la sonda. Para ello en el extremo superior de la sonda, se introducen dos cánulas 26 G alrededor del sílice (cánula de entrada y cánula de salida). Estas cánulas metálicas actúan dan soporte y protección externa a los capilares de sílice por dentro de los cuales discurre el líquido de perfusión. Por último, se sitúan los elementos ensamblados en un molde y éste se rellena con resina epoxi formado el cuerpo de la sonda.



**Fig. 1.** Sonda de microdiálisis “tipo L”, con ángulo de 90° para facilitar la implantación hemitranscerebral y la localización en la glándula pineal.

#### 2.4. Ensayos de recuperación *in vitro* para determinar el rendimiento de las sondas de microdiálisis

Previamente a su utilización, las sondas fueron testadas *in vitro* a fin de establecer el porcentaje de rendimiento de las mismas. Para ello, las sondas fueron primeramente lavadas a fin de eliminar los posibles residuos que pudieran quedar en el interior de las cánulas y en la membrana de diálisis. El

lavado se realizó con metanol 15% (15 min a 4  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) seguido por agua desionizada (15 min a 4  $\mu\text{l}/\text{min}$ ).

El rendimiento de cada sonda fue evaluado mediante pruebas *in vitro*. Para ello, se preparó una solución de LCRA en la que se diluyeron los compuestos de interés: 5-HT, 5-HIAA y NAS (todos a la concentración de 25  $\text{pg}/\mu\text{l}$ ) y melatonina (100  $\text{pg}/\mu\text{l}$ ). Las sondas se introdujeron en esta solución y fueron perfundidas a diferentes flujos (1-4  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Los compuestos extraídos fueron analizados mediante HPLC.

#### **2.4.1. Implantación de la sonda en la glándula pineal de la rata**

Los animales fueron anestesiados con cloral hidrato (450  $\text{mg}/\text{Kg}$ , i.p.). Una vez bajo los efectos de la anestesia, la piel de la cabeza del animal fue afeitada y se realizó una incisión en la zona que cubre el cráneo con unas microtijeras a fin de dejar éste al descubierto. Tras observar las suturas craneales se efectuó la colocación de dos tornillos que servirán de punto de sujeción para la sonda. Posteriormente el animal fue fijado al aparato de estereotáxia (Narishige Sci. Instr. Lab., Tokio, Japón) y se tomaron como referencia el bregma y el lambda para realizar las medidas verticales a fin de localizar el cráneo en posición horizontal. Se realizó también un corte en el lateral y se limpió el cráneo en una pequeña zona del temporal derecho. Con la ayuda de un microtorno (Narshige, Tokio, Japón) se realizó un acceso para facilitar la inserción hemitranscerebral de la sonda, en dirección a la glándula pineal. Dicho proceso se realizó con ayuda del micromanipulador y tomando las coordenadas oportunas dadas por atlas esterotáxicos (Pellegrino et al., 1979; Palkovitz y Brownstein, 1988) (Fig. 2).

El bregma fue utilizado como punto de referencia de las coordenadas antero-posterior (AP: -8.3 mm) y la superficie del cráneo para la coordenada dorso-ventral (+2.4 mm). La distancia medio-lateral se calculó en el momento de la implantación situando la sonda encima del cráneo, justo por detrás del lambda. Seguidamente se perforó la duramadre para asegurar la accesibilidad en el momento de la inserción de la sonda. Este proceso fue

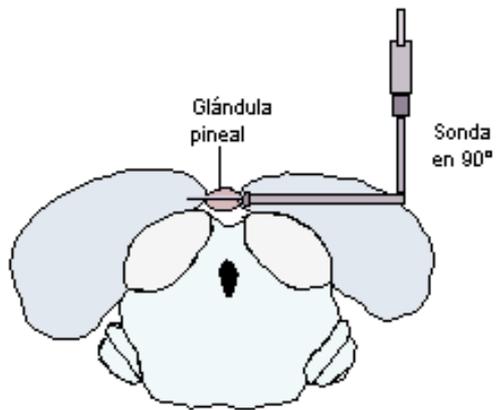
realizado con sumo cuidado para evitar el daño del tejido cerebral y/o los senos adyacentes.

Para su implantación las sondas fueron colocadas en el micromanipulador del aparato de estereotáxia y se mantuvieron perfundidas a un flujo de 4  $\mu$ l/min para aumentar la tensión intramembrana y evitar su rotura. Una vez implantadas, la sonda se fijó con cemento dental al cráneo y a los tornillos insertados en él. En la Figura 3 se esquematiza la localización ideal de la sonda en la glándula pineal.



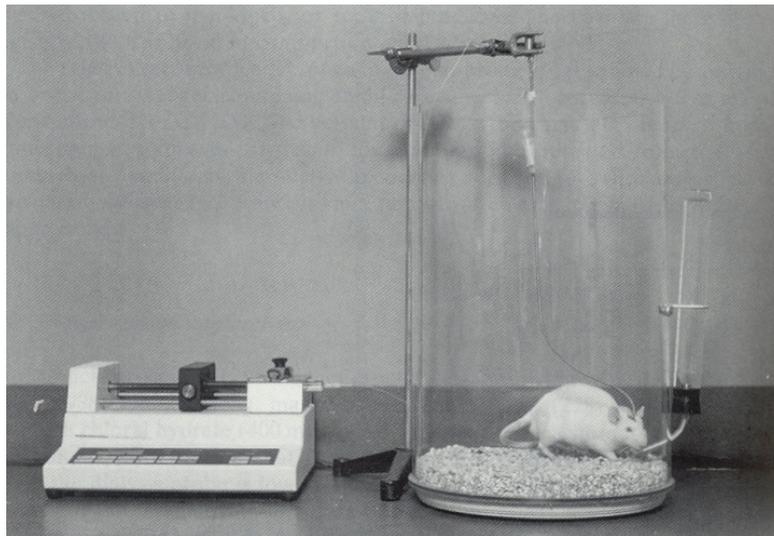
**Fig. 2.** Animal de experimentación en el aparato de estereotáxia con la sonda de microdiálisis implantada.

Una vez finalizada la implantación, se procedió a suturar la piel del cráneo, añadiéndose un antiséptico de uso tópico. El tiempo requerido para realizar todo el proceso de implantación fue de 30-40 min. Durante este tiempo las ratas anestesiadas se dispusieron de manera continuada sobre una manta calefactora a fin de mantener una temperatura corporal constante.



**Fig. 3.** Dibujo esquemático de la sonda implantada en la glándula pineal.

Tras la operación, el animal se retiró del aparato de estereotáxia y se colocó en el sistema de *freely moving* en el cual se recuperó de la anestesia (Fig. 4). Los animales se dejaron recuperar durante al menos 15 horas antes de realizar cualquier experimento.

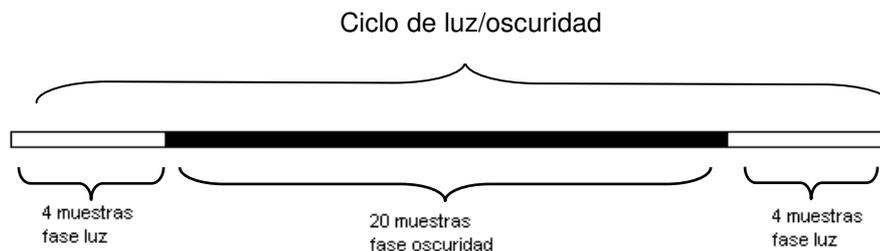


**Fig. 4.** Sistema experimental de microdiálisis *in vivo* y en libre movimiento utilizado para la perfusión de las sondas implantadas en la glándula pineal de la rata.

## 2.5. Experimento 1. Estudio *in vivo* de los cambios diarios de los niveles extracelulares de 5-HT, 5-HIAA, NAS y melatonina en la glándula pineal de la rata

Este experimento tuvo la finalidad de, por un lado, validar la técnica de microdiálisis descrita anteriormente analizando el contenido extracelular de indoles y melatonina en la glándula pineal de rata, así como establecer su validez para estudios crónicos (recolección de muestras durante varios días consecutivos). Por otro lado, se monitorizaron los cambios diarios de dichos compuestos a fin de establecer sus características rítmicas y estudiar la relación entre ellos.

Las ratas utilizadas fueron expuestas a un fotoperiodo invertido desde dos semanas antes de realizar el experimento. Dada la complejidad de las intervenciones y del muestreo, el experimento se llevó a cabo individuo a individuo, es decir que no se simultanearon animales. El día previo al experimento, se canuló la rata correspondiente que se dejó recuperando de la operación toda la noche, perfundiendo medio salino (2  $\mu$ l/min) a través de la sonda implantada en la glándula pineal. A la mañana siguiente se procedió a la recolección de muestras cada 30 min, empezando a las 8:00 de la mañana y finalizando a las 22:00 horas. En total se tomaron 28 muestras cada día, las cuatro primeras correspondieron con el final de la fase de luz, las 20 siguientes en la fase de oscuridad, y para finalizar 4 muestras más en la fase en la que se encendieron de nuevo las luces (Esquema 2).



**Esquema 2.** Recogida de muestras en la fase luz/oscuridad.

Con el objeto de comprobar el rendimiento a largo plazo de la sonda de microdiálisis, el proceso de recolección de muestras se llevó a cabo sobre el mismo animal durante 3 días consecutivos y luego el quinto y séptimo día. Este proceso se repitió en cuatro animales.

Tras la finalización de cada experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación y la correcta implantación de la sonda en la glándula pineal fue determinada *in situ* visualmente, es decir, comprobando que la sonda estaba insertada en la pineal. Aquellos animales en los que la sonda se implantó externamente, o de forma muy lateralizada en la glándula, fueron excluidos.

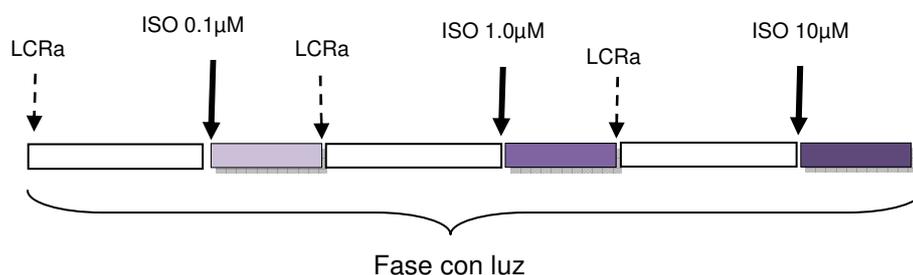
## **2.6. Experimento 2. Efecto de la administración del agonista $\beta$ -adrenergico L- isoproterenol**

Mediante este experimento se pretendió comprobar la eficacia del sistema de microdiálisis pineal en la respuesta a fármacos aplicados de forma local. Para ello se usaron ratas que fueron expuestas a un ciclo L:O normal (sin inversión de las fases lumínicas). La administración de isoproterenol se realizó de forma local en la glándula pineal a través de la sonda de microdiálisis que se implantó tal y como se ha descrito previamente. La administración del fármaco se realizó durante la fase de luz y consistió en tres dosis de ISO aplicados de forma consecutiva durante 40 minutos, dejando un intervalo entre ellas de 120 minutos en el cual se administró LCRa. En pruebas previas se estimó que este tiempo entre tratamientos era suficiente para la recuperación del efecto ejercido por la infusión previa de isoproterenol. Las dosis administradas fueron:

- 0.1  $\mu$ M (n=4) durante 40 minutos.
- 1.0  $\mu$ M (n=4) durante 40 minutos.
- 10  $\mu$ M (n=4) durante 40 minutos.

Se tomaron muestras del dializado pineal cada 20 minutos, manteniendo un flujo de perfusión constante de 2  $\mu$ l/min. Las tres muestras anteriores a la

administración de cada concentración de isoproterenol (solo LCRa) fueron tomadas como referencia de niveles basales.



**Esquema 3.** Administración del tratamiento con ISO.

## 2.7. Determinaciones analíticas de los niveles de 5-HT, NAS y melatonina

### 2.7.1. 5-HT, 5-HIAA y NAS

Muestras (20 µl) del dializado se inyectaron directamente al sistema cromatográfico. Este estaba formado por una bomba Waters M515 (Milford, MA, USA), equipada con un amortiguador de pulsos y conectada a una columna de fase estacionaria Tracer Extrasil ODS2 (3 µm de partícula, 7.5 x 0.46 cm; Tecknocroma, Barcelona), precedida por una precolumna rellena de la misma fase estacionaria. La fase móvil utilizada fue la de ácido cítrico-fostato [NaHP0<sub>4</sub> 43 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 mM, ácido cítrico 0.8 mM, ácido octano sulfónico 0.3 M y 18% de metanol (v/v), pH final 3.1 ajustado con ácido *o*-fosfórico)] que fue posteriormente filtrada y desgasificada por medio de una bomba de vacío. Las separaciones fueron hechas a temperatura ambiente y el flujo utilizado fue de 0.75 ml/min.

La detección de las sustancias se llevó a cabo mediante un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Bedford, MA, EEUU), el cual estaba equipado con una célula analítica ESA M5011 mantenida a un potencial

oxidativo de +30 mV en el primer electrodo y +280 mV en el segundo electrodo. La inyección de las muestras se efectuó mediante un autoinyector Waters M717 (Milford, MA, EE.UU.). La identificación y cuantificación de los picos del cromatograma se llevó a cabo mediante un paquete informático Kontron Integration 450.

### **2.7.2. Melatonina**

Se tomaron 20  $\mu$ l de la muestra de microdiálisis y se inyectaron directamente en el sistema de HPLC. La fase móvil estuvo compuesta de acetato sódico anhídrico ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 10 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  0.01 mM y acetonitrilo (35%, v/v) (pH final 5.1), y fue filtrada y desgasificada por medio de vacío antes de su uso. El flujo de la fase móvil fue de 1.0 ml/min y la separación de los compuestos se llevó a cabo a temperatura ambiente. La melatonina se detectó por fluorescencia, con las siguientes longitudes de onda:  $\lambda_{\text{ex}}$ : 280 nm y de  $\lambda_{\text{em}}$ : 345 nm.

### **2.8. Análisis estadístico**

En los experimentos de validación de la técnica y descripción de ritmos diarios de los compuestos pineales, los datos se expresaron como la media  $\pm$  E.E.M. del porcentaje de descenso o incremento de los valores de cada punto con respecto los niveles basales. Los niveles basales fueron calculados como la media de las cuatro muestras con luz, antes del inicio de la fase de oscuridad. En los experimentos de administración de isoproterenol, los datos están expresados como la media  $\pm$  E.E.M. del porcentaje de descenso o incremento sobre los niveles basales, calculados como la media de las tres muestras anteriores a la aplicación de este agonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la prueba de la  $t$  de Student para comparación de dos grupos (Systat Software, Inc.).

Para caracterizar los patrones rítmicos de secreción de melatonina y NAS, así como las características temporales del pico nocturno de liberación, se

llevó a cabo un análisis de regresión no lineal mediante el software SigmaPlot 11.0 (SPSS ASC GMBH, Erkrath, Alemania). A partir de la secuencia temporal de datos obtenidos de cada animal, se seleccionó la curva de mejor ajuste y sobre ella se calculó el momento del día (primeras horas de la noche) en el que se alcanzó el 50% del aumento máximo (AN50) del pico nocturno, así como el momento temporal en el que se alcanzó el 50% de descenso (DN50) del pico nocturno. La anchura del pico nocturno se calculó como la diferencia entre AN50 y DN50 y permitió establecer su duración temporal.

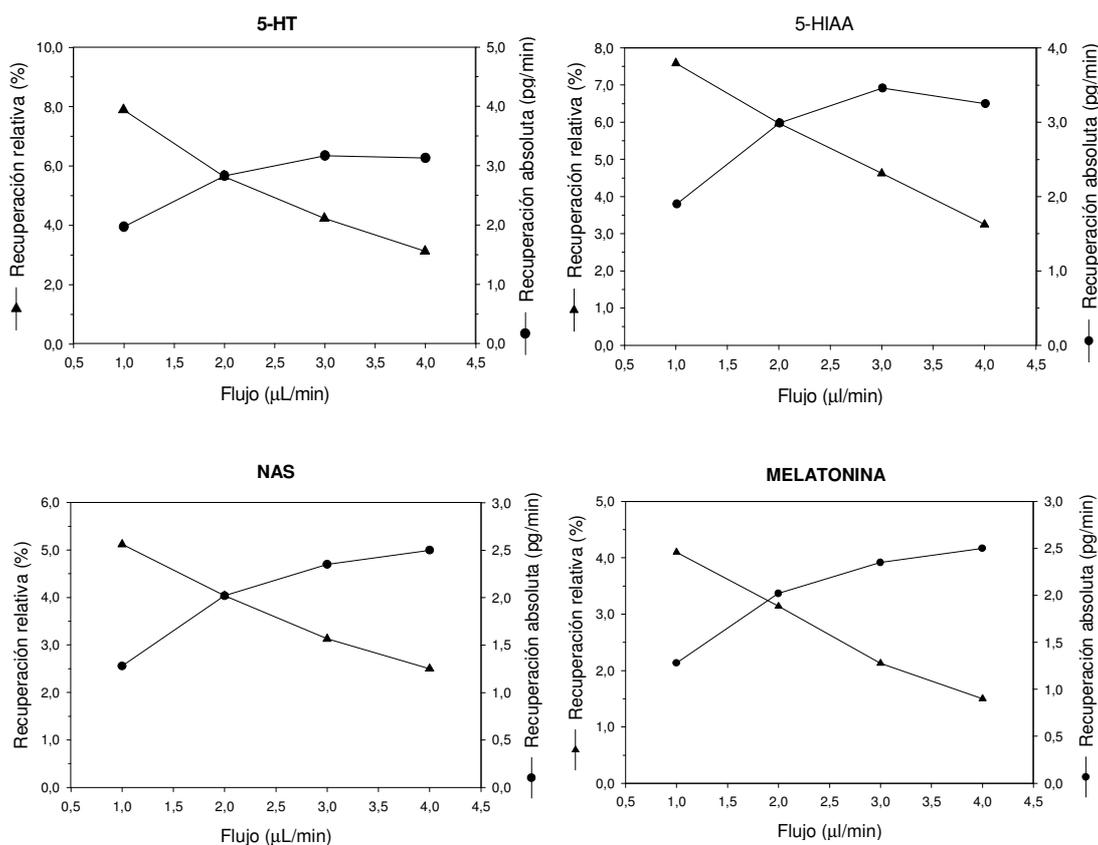
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Ensayos *in vitro* para determinar el rendimiento de las sondas**

Los patrones de recuperación *in vitro* pueden verse en la Figura 5. La determinación de la recuperación de las sondas se estableció sobre la base de los valores absolutos (cantidad total recuperada en un tiempo determinado) y relativos (% recuperado del total presente en el medio de incubación).

La recuperación relativa fue inversamente proporcional al flujo de perfusión, hallándose para 5-HT valores de 8% con un flujo de 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  y de 3.1% con flujo de 4  $\mu\text{l}/\text{min}$ . En el caso de la melatonina se obtuvo un patrón similar aunque con valores menores (4.1% a 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ , pasando a 1.5% con un flujo de 4  $\mu\text{l}/\text{min}$ ).

Tal y como era de esperar, la recuperación absoluta de los compuestos aumentó a medida que se incrementó el flujo de perfusión, aunque con una clara tendencia a estabilizarse, sobre todo con flujos superiores a 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Así, se recuperaron un total de 2 pg/min de 5-HT con un flujo de 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  y 3.1 pg/min con flujos de 4  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Para la melatonina se pasó de valores del 1.3 a 2.5 pg/min al variar el flujo de 1 a 4  $\mu\text{l}/\text{min}$  respectivamente.



**Fig 5.** Efecto del flujo de perfusión sobre los valores absolutos y relativos de recuperación *in vitro* de las sondas de microdiálisis para 5-HT, 5-HIAA, NAS y melatonina.

### 3.2. Validación de la técnica de microdiálisis para su aplicación a estudios de la función pineal

En los experimentos llevados a cabo para la validación de las técnicas de microdiálisis no se observó mortalidad debido a las intervenciones quirúrgicas motivadas por la implantación de las sondas de microdiálisis. La verificación de la correcta implantación tisular de la sonda se llevó a cabo

tras decapitación de los animales al final de los experimentos correspondientes (inspección *post-mortem*). Se encontró que en aproximadamente un 30% de los animales canulados, la implantación de la sonda fue fallida, es decir que se localizó fuera del tejido pineal o muy lateralizado. En estos casos, los niveles de compuestos pineales analizados (indoles, melatonina) fueron muy bajos, aunque en la mayoría se obtuvieron evidencias de un cierto patrón rítmico de liberación, probablemente derivado de la presencia de los compuestos en las inmediaciones de la glándula. Estos individuos no fueron tenidos en cuenta en los experimentos. En las ratas en los cuales la sonda estuvo correctamente implantada, se obtuvieron niveles muy variables entre los distintos individuos, pero relativamente constantes en cada individuo, en los que además se puso en evidencia también la existencia de variaciones muy marcadas a lo largo del ciclo día/noche. Por lo tanto, los datos obtenidos de estos individuos fueron tomados como válidos para los experimentos realizados.

En las figuras 6, 7, 8 y 9 se muestran los patrones individuales de liberación de 5-HT y melatonina establecidos en base a los niveles extracelulares medidos en muestras de microdiálisis obtenidas de las glándulas pineales de cuatro ratas. En cada animal, los datos se expresaron en porcentaje de los valores de cada una de las muestras tomadas a lo largo del ciclo día/noche con respecto a la media de los valores obtenidos en las cuatro primeras muestras (tomadas antes de la fase de oscuridad), la cual fue considerada como el 100% de liberación de cada compuesto analizado.

El hecho de expresar los datos como porcentaje y no como valor real de cada compuesto fue motivado, en primer lugar, por la fuerte variación interindividual observada en los niveles de los compuestos analizados, que impidió establecer valores homogéneos considerando los datos obtenidos del conjunto de los animales. En segundo lugar, se observó una caída paulatina en el rendimiento de las sondas implantadas, de forma que los niveles diurnos y nocturnos decrecieron ligeramente durante el segundo día de implantación y fuertemente a partir de tercer día tras implantar la sonda, no siendo detectables en algunos animales durante el cuarto (solo en 2 de las 4 ratas) y séptimo día (solo una rata). A pesar de esta reducción, todos

los animales incluidos en el experimento mostraron (en mayor o menor medida) un perfil rítmico, con fuertes cambios diarios que se mantuvieron sin gran alteración al menos durante los dos primeros días del ensayo (Tabla 1).

	Nº rata	5-HT	5-HIAA	NAS	Melatonina
<b>Día</b>	1	87,7	231,7	2,9	7,6
	2	178,5	130,7	3,0	8,2
	3	238,1	108,0	3,3	16,9
	4	197,8	114,6	1,6	2,5
<b>Noche</b>	1	31,2	150,5	162,7	43,7
	2	58,7	67,0	233,4	79,6
	3	136,1	92,1	368,9	141,0
	4	83,4	33,5	165,1	72,9

**Tabla 1.** Niveles (pg/20 µl) basales de 5-HT, 5-HIAA, NAS y melatonina detectados en los dializados obtenidos de la glándula pineal de cuatro ratas distintas durante el día (dos horas antes de apagado de luces) y la noche (mitad de la noche).

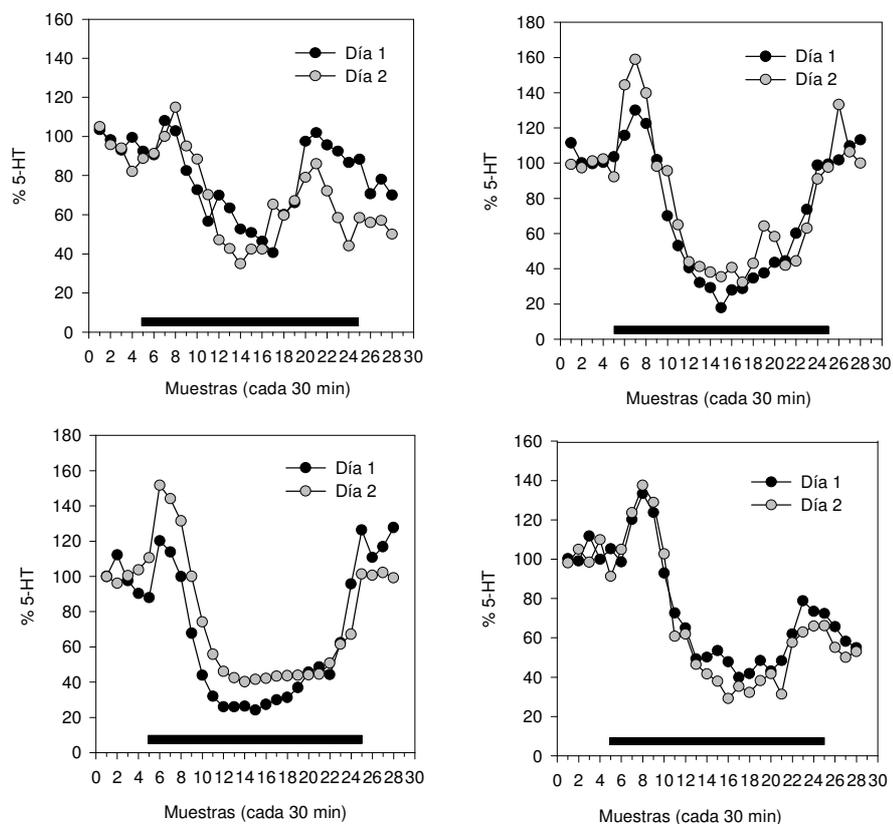
Con estas premisas, se estableció como prioritario el análisis de los datos de cada animal con respecto a sus valores basales, considerando estos como las muestras obtenidas durante las fases de luz del primer y segundo día.

### 3.3. Ritmos diarios de la liberación de 5-HT, 5-HIAA, NAS y melatonina en la glándula pineal de la rata

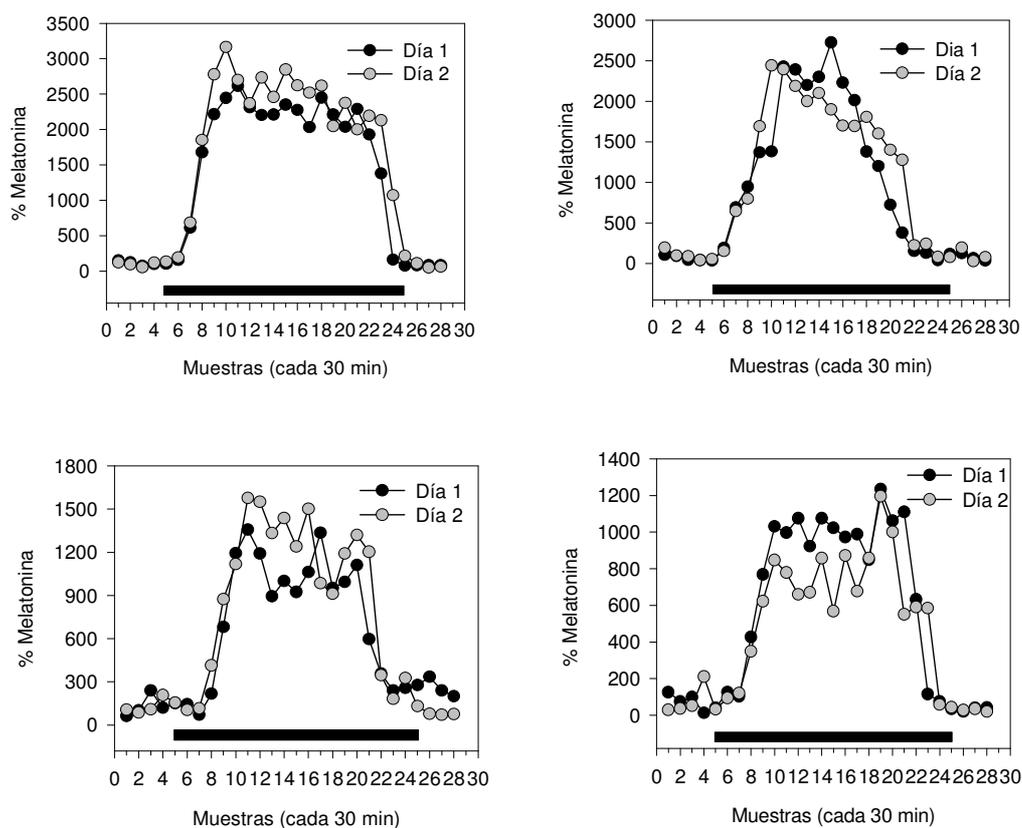
Tal y como se observa en la Figura 6, los niveles extracelulares de 5-HT mostraron un patrón diario rítmico (día/noche) y con tres fases bien definidas. Durante el periodo de luz existe una fuerte liberación de 5-HT que todavía se incrementa más durante las dos primeras horas de la noche. Este incremento durante la transición luz/oscuridad fue rápido pero observable (aunque con distinto grado) en los cuatro animales y osciló entre un 20-50% con respecto a los valores previos de día. Posteriormente, tuvo lugar un fuerte descenso de la cantidad liberada alcanzando valores mínimos (del orden del 60-80% con respecto al porcentaje de liberación de los valores de día) a medianoche y gran parte de la segunda mitad de la noche.

Finalmente, los niveles de la amina se recuperaron ya antes de finalizada la noche, alcanzando valores similares a los de la fase de luz.

Como se muestra en la Figura 7, la liberación de melatonina pineal también se caracterizó por un patrón rítmico similar en todas las ratas. No obstante, la cantidad liberada durante la fase de oscuridad de este compuesto mostró fuertes variaciones entre los distintos animales, con valores que aumentaron del orden de 1200-1500% hasta 2500-3000% con respecto a los valores de día. Sin embargo, los perfiles rítmicos fueron muy homogéneos entre animales, debido a que los momentos en los que tuvo lugar el aumento y el descenso del pico nocturno de melatonina fueron muy reproducibles.

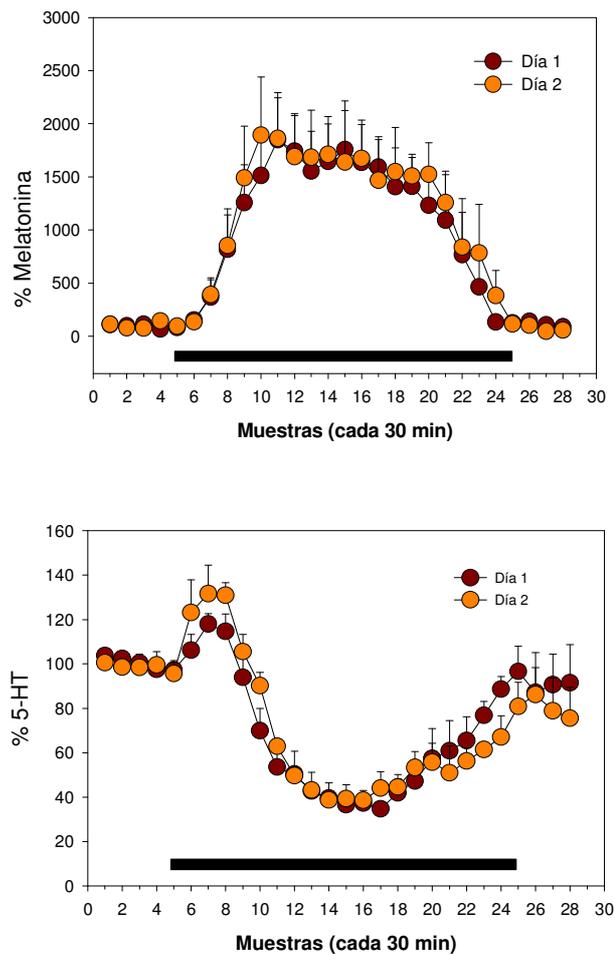


**Fig. 6.** Variación interindividual de la liberación *in vivo* de 5-HT monitorizada mediante microdiálisis pineal en cuatro ratas durante dos días consecutivos. La barra indica la duración de la fase de oscuridad.



**Fig. 7.** Variación interindividual de la liberación *in vivo* de melatonina monitorizada mediante microdiálisis pineal en cuatro ratas durante dos días consecutivos. La barra indica la duración de la fase de oscuridad.

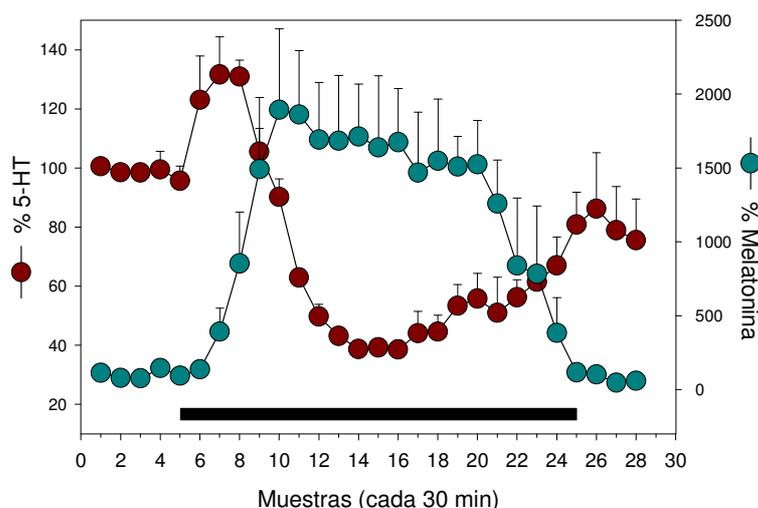
En la Figura 8 se muestra el perfil de liberación de melatonina cuando se consideraron de forma agrupada los valores obtenidos de los cuatro animales incluidos en el experimento. Mediante regresión no lineal se pudo estimar las características de dicho ritmo, estableciéndose el momento diario en el cual se alcanzó el 50% de aumento (AN50) y descenso (DN50) del pico nocturno. Teniendo en cuenta los valores monitorizados durante el primer día, se pudo establecer que el AN50 tuvo lugar a los  $104 \pm 8$  min tras el encendido de la luz, mientras que el DN50 aconteció  $89 \pm 22$  min antes del fin de la oscuridad.



**Fig. 8.** Valores medios de los niveles extracelulares de melatonina y serotonina en la glándula pineal de rata (n=4) sometidas a microdiálisis durante dos días consecutivos. La barra indica la duración del periodo de oscuridad.

La duración media del pico nocturno de melatonina (bajo un fotociclo con 10 horas de oscuridad), determinada como la diferencia entre AN50 y DN50, fue de 6.78 horas, mientras que la amplitud media fue de 1650% respecto a los valores de día. Estos valores fueron reproducibles, con mínimas diferencias (no significativas), en el segundo día de monitorización.

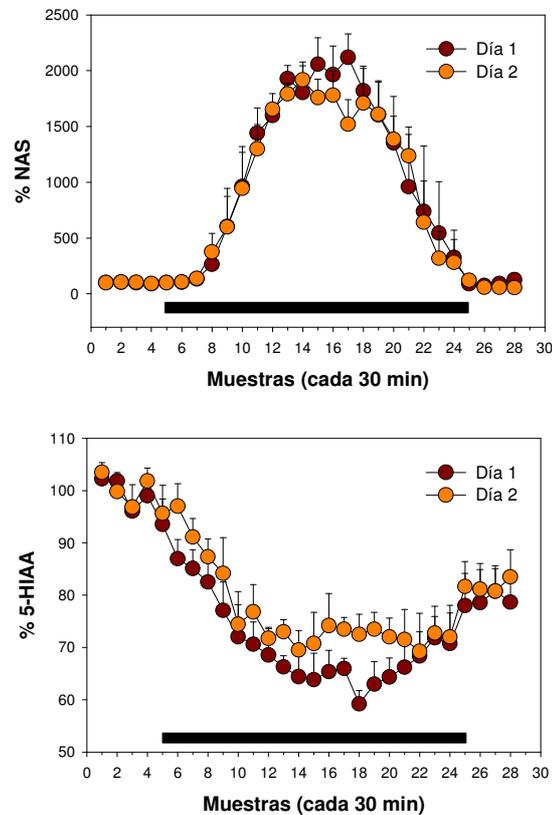
De forma similar, se puede observar que los valores medios de 5-HT extracelular obtenidos de los dializados de las cuatro ratas (Fig. 6) siguen un perfil muy homogéneo en el que destaca el aumento brusco y transitorio de los niveles de la amina al inicio de la noche ( $25 \pm 5\%$  respecto a los valores de día) y su posterior caída a medianoche. La comparación gráfica simultánea de los patrones de liberación de melatonina y serotonina durante un ciclo de luz-oscuridad muestra la fuerte correlación negativa entre ambos compuestos (Fig. 9). Además, se observa claramente que el pico de 5-HT extracelular al inicio de la noche antecede temporalmente al pico de melatonina, superponiéndose con la fase de inicio y ascenso de dicho pico.



**Fig. 9.** Superposición de los perfiles diarios de los niveles de melatonina y serotonina en dializados obtenidos de glándulas pineales de rata ( $n=4$ ). La barra indica la duración del periodo de oscuridad.

Con respecto a los niveles extracelulares de NAS (Fig. 10) se pudo observar una fuerte correlación positiva con los de melatonina, con un pico nocturno de características (duración y amplitud) similares. Al igual que para la melatonina, los niveles de NAS fueron altamente reproducibles durante los dos primeros días, aunque conviene señalar que la monitorización de este compuesto ya no fue posible en buena parte del tercer día tras la implantación de la cánula debido a la fuerte reducción de sus niveles.

Por último, en la Figura 10 también se pueden observar los ritmos diarios de liberación de 5-HIAA. Como puede verse, el perfil de este metabolito serotoninérgico se correlacionó de forma inversa con los de melatonina y NAS y positivamente con los de 5-HT.



**Fig. 10.** Valores medios de los niveles extracelulares de NAS y 5-HIAA en la glándula pineal de rata (n=4) sometidas a microdiálisis durante dos días consecutivos. La barra indica la duración del periodo de oscuridad.

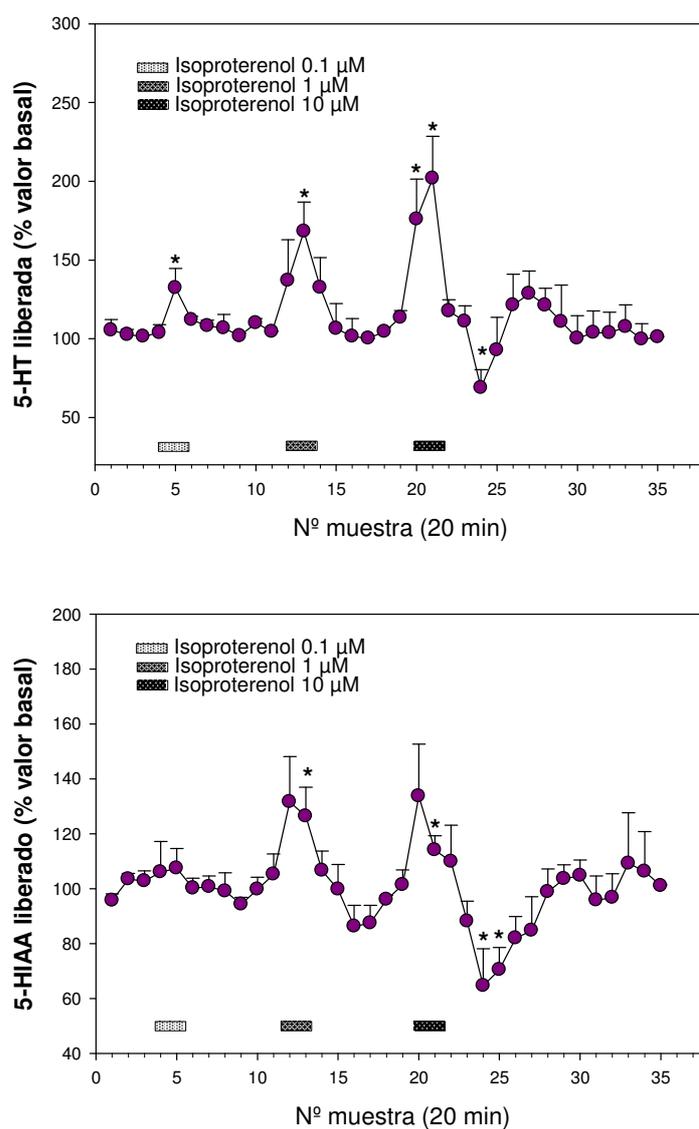
A diferencia de lo reflejado para la 5-HT, el ritmo de 5-HIAA extracelular se caracterizó por una única inflexión diaria dada por la fuerte caída de sus niveles durante la noche, alcanzándose los valores mínimos a mitad del periodo de oscuridad. La recuperación de los valores de día también tiene lugar con bastante paralelismo a la descrita para la 5-HT pineal.

### **3.4. Efecto de la aplicación local de isoproterenol sobre la liberación de compuestos pineales**

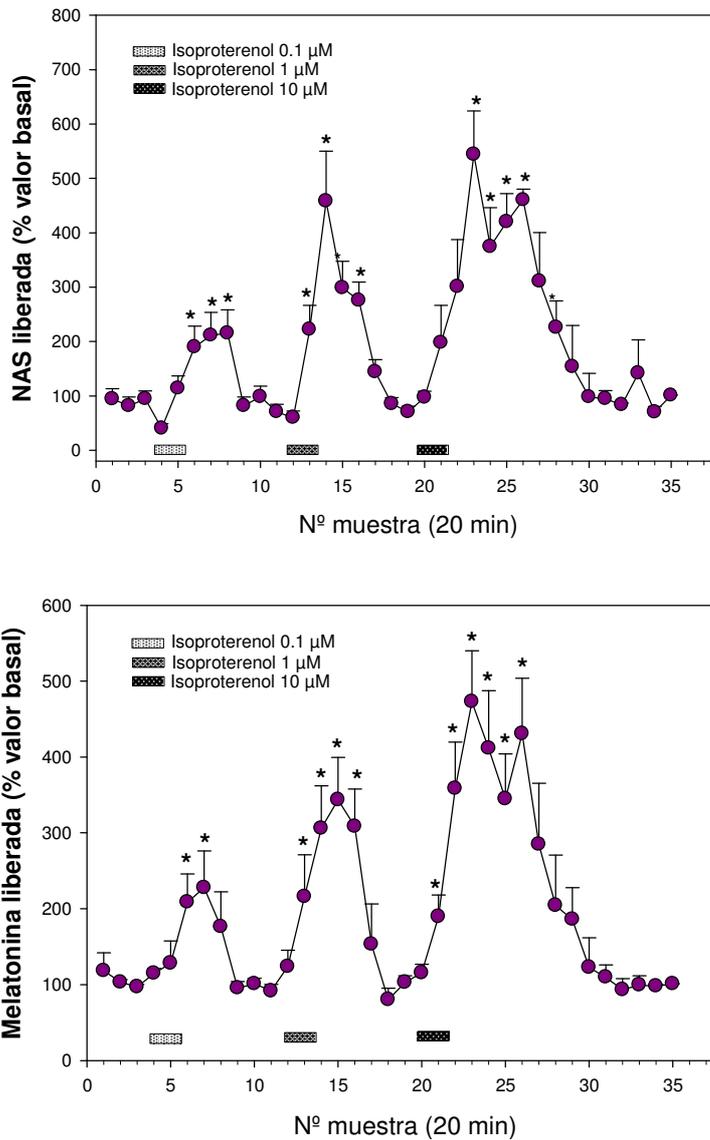
Como se observa en la Figura 11, el isoproterenol provocó incrementos en los niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA que fueron breves y directamente proporcionales en magnitud a las concentraciones administradas. Así, la liberación de 5HT sufrió incrementos máximos del 28%, 60% y del 90% a concentraciones de ISO de 0.1, 1.0 y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas en relación a la administración de salino ( $p < 0.05$ ).

En la liberación de 5-HIAA, este incremento no fue tan acusado, de forma que con la concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  de ISO solo se observó un ligero aumento no significativo. Con las concentraciones de 1.0 y 10  $\mu\text{M}$  se hallaron incrementos máximos de aproximadamente un 40% sobre los valores basales, los cuales fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Al igual que en la 5-HT y el 5-HIAA, la administración local de isoproterenol también produjo incrementos en la liberación de NAS y melatonina, aunque estos fueron de magnitud mucho mayor (Fig. 12). Además, el efecto alcanzado en estos compuestos estuvo directamente relacionado con la concentración del agonista  $\beta$ -adrenérgico. Así, en el caso de la NAS se observó un aumento de los niveles extracelulares de aproximadamente un 140% (con respecto al valor basal) con la concentración de 0.1  $\mu\text{M}$ , de 450% y 500% con las concentraciones de 1.0 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente. En todos los casos, el efecto fue estadísticamente significativo en comparación con los niveles basales ( $p < 0.05$ ). En cuanto a la liberación de melatonina, ésta sufrió un incremento de 150%, 250% y 450% a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente, ( $p < 0.05$  vs valores basales en todos los casos).

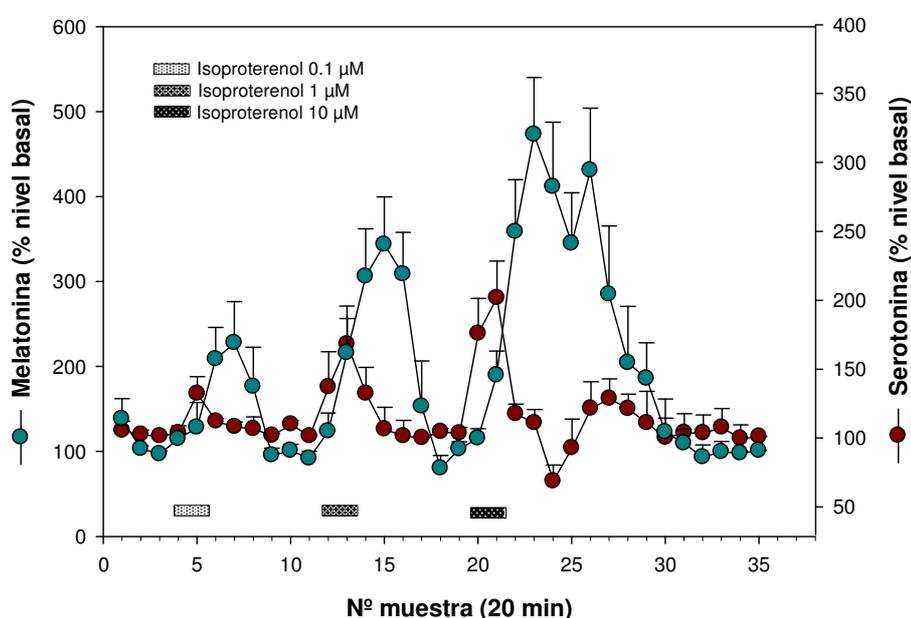


**Fig. 11.** Niveles extracelulares de 5-HT y 5-HIAA en la glándula pineal de rata tras la administración local de isoproterenol. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4 animales, \* $p < 0.05$  vs niveles basales previos a la aplicación del fármaco.



**Fig. 12.** Niveles extracelulares de NAS y melatonina en la glándula pineal de rata tras la administración local de isoproterenol. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4 animales, \* $p < 0.05$  vs niveles basales previos a la aplicación del fármaco.

La Figura 13 muestra de forma conjunta los perfiles de liberación de 5-HT y melatonina tras la administración de isoproterenol. Como se observa, los niveles extracelulares de ambos compuestos mantienen una estrecha relación temporal de forma que la activación farmacológica de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con isoproterenol provoca un aumento rápido de liberación de 5-HT que se sigue de un aumento mayor, pero ligeramente retrasado, de la liberación de melatonina. Este efecto fue especialmente evidente con la concentración más elevada del fármaco ( $10 \mu\text{M}$ ), observándose que el incremento máximo alcanzado por los niveles extracelulares de 5-HT tiene lugar cuando los niveles de melatonina son todavía relativamente bajos. Por otro lado, se puede observar que mientras el incremento de 5-HT extracelular fue de corta duración, la liberación de melatonina se prolongó mucho más allá de la duración de la aplicación de isoproterenol.



**Fig. 13.** Representación conjunta de los valores medios de liberación de 5-HT y melatonina pineal tras la administración de 3 concentraciones de isoproterenol a través de la cánula de microdiálisis. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 4 animales.

## **TRABAJO EXPERIMENTAL 4**

### **EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTAGONISTAS y AGONISTAS SEROTONINÉRGICOS SOBRE EL CONTENIDO DE MELATONINA PINEAL**



## 1. OBJETIVO

Durante la noche, el incremento de la liberación de NA desde las terminales presinápticas pineales conlleva la estimulación de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, con el consiguiente incremento de los niveles intracelulares de AMPc, de la síntesis de 5-HT y de la actividad AANAT, esta última responsable en última instancia del pico nocturno de formación de melatonina (Ganguly et al., 2002). Sin embargo, existen cada vez más pruebas de que, además del control noradrenérgico, la función de la pineal está bajo una extensa acción de modulaciones. Pruebas de ello son la existencia de innervación de diversa naturaleza (Moller y Baeres, 2002), así como la presencia de receptores para distintos tipos de moduladores (incluyendo aminoácidos, péptidos y aminas biógenas) diferentes a los de NA en la glándula pineal de mamíferos, así como los efectos descritos para algunos de ellos sobre la producción de melatonina (Simonneaux y Ribelayga, 2003).

La existencia de receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT<sub>2</sub> en la glándula pineal de mamíferos (Sparks y Little 1990, Govitrapong et al., 1991) abre la puerta a la hipótesis de que esta amina pueda tener un papel importante en la regulación de la síntesis de melatonina. No obstante, la función de estos receptores no ha sido estudiada en profundidad, no estando claros hasta que punto su activación podría condicionar la función endocrina de la glándula pineal. Diferentes estudios indican que la 5-HT, además de servir de precursor de la melatonina, podría estar implicada en el control fisiológico de su producción. La concentración de 5-HT en la glándula pineal es una de las más elevadas del cerebro, presentando, además, fuertes fluctuaciones circadianas (Young y Anderson, 1982, Azekawa et al., 1991). Además, en pinealocitos de rata en cultivo, la adición de 5-HT amplifica la activación de la AANAT inducida por la estimulación de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, aunque no afecta a la actividad enzimática basal (Sugden, 1990; Olcese y Münker, 1994; Míguez et al., 1997b). En base a ello, se ha propuesto que la 5-HT, a través de receptores serotoninérgicos del subtipo 5-HT<sub>2</sub>, podría ejercer un papel modulador sobre la actividad AANAT nocturna y, por tanto, sobre la síntesis de melatonina (Steardo et al., 2000). Por ello, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la administración de

agonistas y antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> sobre la producción nocturna de melatonina en la glándula pineal de la rata.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos**

Al igual que en los anteriores experimentos, la melatonina y la N-acetilriptamina fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), el L-triptófano, ketanserina, SDZ-SER 082,  $\alpha$ -metil-5-hydroxytryptamina a Tocris (Biogen Sci., Madrid) y el (-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane hydrochloride (DOI) a RBI (Sigma Chem. Co). Los demás reactivos fueron de grado analítico y de distintas casas comerciales. Los estándares cromatográficos de melatonina y de la AANAT se prepararon tal y como se describe el Trabajo experimental 1.

### **2.2. Animales de experimentación**

Se utilizaron 54 ratas macho adultas (peso  $310 \pm 15$  g) de la raza Sprague-Dawley que fueron acondicionadas bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas (encendido de las luces a las (8:00 horas) durante al menos dos semanas previas al experimento. Se distribuyeron seis animales por jaula, que en todo momento tuvieron acceso libre a agua y comida, con una temperatura estable de la estancia ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). El manejo de los animales fue llevado a cabo según la legislación existente sobre uso de animales en experimentación (RD 1201/2005 del 10 de octubre, BOE nº 252 de 21 de octubre).

### **2.3. Experimento 1. Efecto de la administración de antagonistas y agonistas de los receptores de serotonina 5-HT<sub>2</sub>**

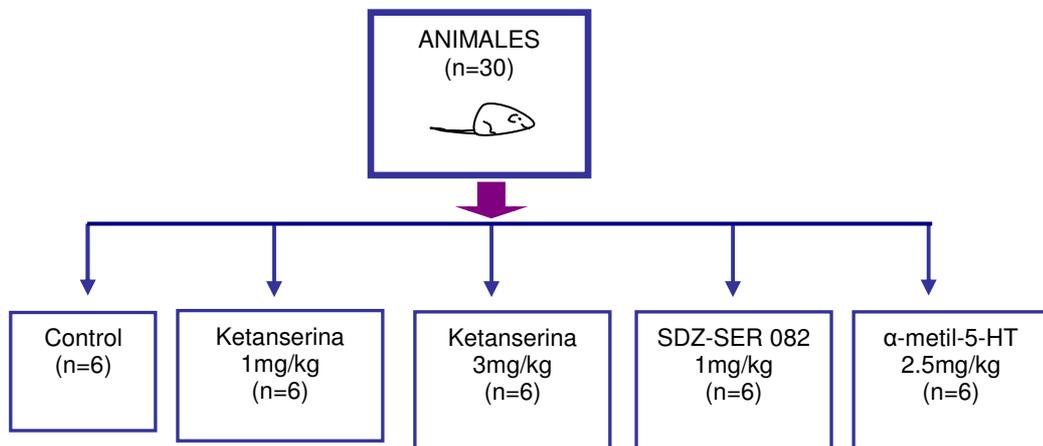
Se estudió el efecto de los diferentes agonistas y antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub>, que se indican a continuación:

- Ketanserina, antagonista selectivo 5-HT<sub>2A/2C</sub>
- SDZ-SER 082, antagonista selectivo 5-HT<sub>2B/2C</sub>

- $\alpha$ -metil-5-HT, agonista no selectivo 5-HT<sub>2</sub>
- DOI, agonista selectivo 5-HT<sub>2A/2C</sub>

Se establecieron diferentes grupos de animales (n = 6) que fueron tratados por vía intraperitoneal con uno de los siguientes tratamientos: 1) salino (grupo control), 2) ketanserina 1 mg/Kg, 3) ketanserina 3 mg/Kg, 4) SDZ-SER 082 1mg/Kg, 5)  $\alpha$ -metil-5-HT 2.5 mg/Kg, y 6) DOI 0.5 mg/Kg (ver esquema 1).

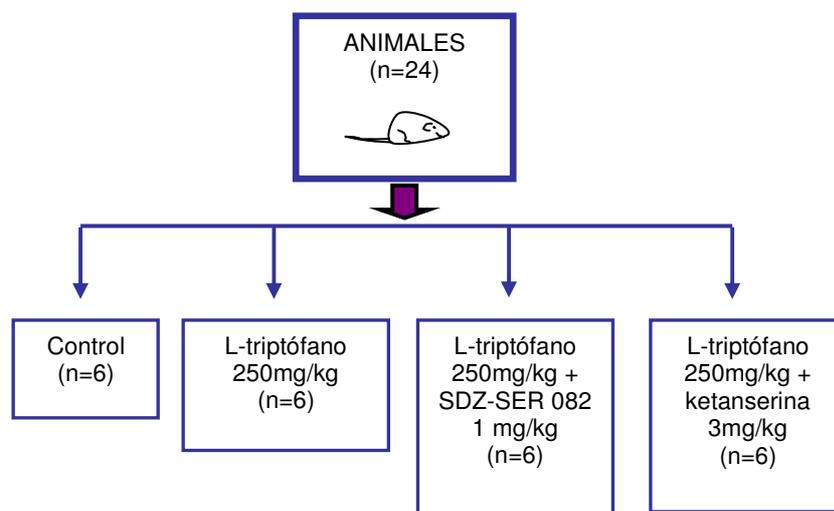
Para su administración, todas las drogas fueron disueltas en cloruro sódico 0.9% y administradas por vía intraperitoneal. El grupo control recibió el vehículo salino. Todos los tratamientos se administraron justo antes del apagado de las luces. Los animales de todos los grupos fueron sacrificados por decapitación seis horas después del tratamiento, es decir a las 2:00 horas de la noche.



**Esquema 1.** Esquema de los diferentes tratamientos administrados.

## 2.4. Experimento 2. Efecto de la administración conjunta de L-Trp y antagonistas de los receptores de serotonina 5-HT<sub>2</sub>

Se procedió de manera similar al experimento anterior. Los animales fueron divididos en cuatro grupos (n = 6) que recibieron los siguientes tratamientos por vía intraperitoneal: 1) salino (grupo control), 2) L-triptófano 250 mg/kg, 3) L-triptófano 250 mg/kg + Ketanserina 3 mg/kg, 4) L-triptófano 250 mg/kg + SDZ-SER 082 1 mg/Kg. Los tratamientos se administraron justo antes del apagado de las luces y los animales fueron sacrificados 6 horas más tarde, coincidiendo con la mitad del periodo nocturno.



**Esquema 2.** Esquema de los tratamientos administrados a los diferentes grupos de animales.

## 2.5. Toma de muestras y determinaciones analíticas

Inmediatamente tras el sacrificio de los animales, se extrajeron las glándulas pineales para viales mantenidos sobre nieve carbónica, los cuales fueron posteriormente guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. En ese momento, las

glándulas pineales fueron descongeladas sobre hielo, se eliminaron los posibles restos de sangre y se introdujeron individualmente en viales tipo Eppendorf de 1.5 ml, en donde fueron sonicadas en frío en un procesador ultrasónico de alta intensidad a 30 ciclos (3x3 seg) en 100  $\mu$ l de tampón fosfato 0.1 M (pH de 6.8) conteniendo 0.5 mM de Acetil-CoA. Posteriormente, los tejidos se centrifugaron a 14000rpm durante 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante se tomaron alícuotas para la determinación inmediata de la actividad enzimática de la AANAT, mientras que otras alícuotas fueron congeladas a -80°C para el posterior análisis cromatográfico del contenido de melatonina e indoles en la glándula pineal.

Se determinó el efecto de los tratamientos sobre la actividad del enzima AANAT siguiendo los procedimientos descritos en el trabajo experimental 1 para los ensayos de esta enzima. Por otro lado, se cuantificaron los niveles de melatonina en el sobrenadante del tejido pineal mediante técnicas de HPLC con detección fluorimétrica, tal y como se describe previamente (Trabajo 1).

## **2.6. Análisis estadístico**

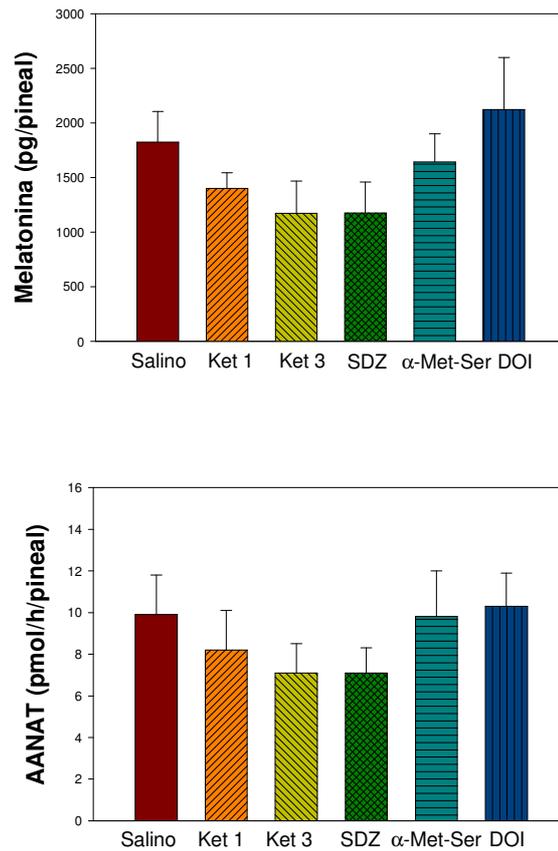
Los datos se presentan como la media  $\pm$  E.E.M. de los valores obtenidos en los diferentes grupos experimentales. En el experimento 1 el efecto del tratamiento con respecto al control fue determinado mediante el análisis estadístico por el test de ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Student-Newman Keuls (Systat Software, Inc.). Estas mismas pruebas estadísticas se usaron en el experimento 2 para la comparación del efecto de antagonistas serotoninérgicos con respecto al grupo control y al grupo tratado con L-Trp.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Experimento 1. Efecto de la administración de antagonistas y agonistas de los receptores de serotonina 5-HT<sub>2</sub>**

En la Figura 1 se muestran las variaciones del contenido nocturno de melatonina y de la actividad enzimática AANAT en la glándula pineal de la rata Sprague-Dawley tras la administración de agonistas y antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub>.

Se puede observar que los niveles de melatonina fueron afectados negativamente tanto por la administración de ketanserina (1 mg/kg: -15% vs control; 3 mg/kg: -25% vs control) como la de SDZ-SER 082 1 mg/kg (-50% vs control). De manera similar, la ketanserina descendió la actividad AANAT en un -25% (dosis de 3 mg/Kg), mientras que con la SDZ-SER 082 la redujo en un -28%. Sin embargo, en ningún caso las disminuciones fueron estadísticamente significativas con respecto al control.



**Fig. 1.** Contenido nocturno de melatonina y actividad AANAT en la glándula pineal ratas tras la administración i.p. de salino (control) y de agonistas y antagonistas de receptores de serotonina del tipo 5-HT<sub>2</sub>. Los datos representan la media ± E.E.M. de 6 animales.

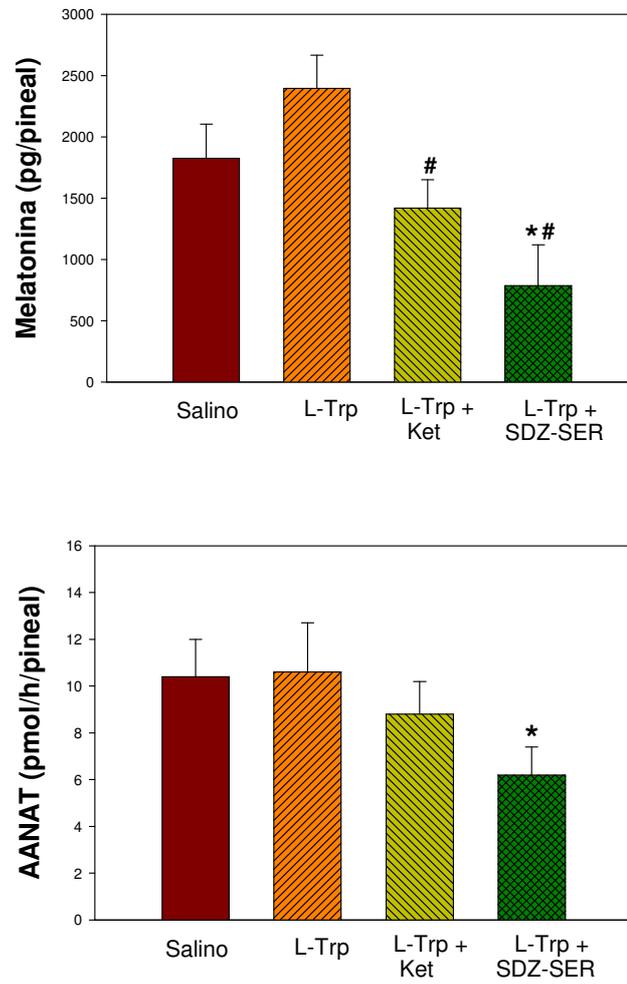
En cuanto a la administración de los agonistas, ni la  $\alpha$ -metil-5HT (agonista 5-HT<sub>2</sub> no selectivo) ni el DOI (agonista 5HT<sub>2A/2C</sub>) produjeron cambios destacables ni en la melatonina ni en actividad AANAT (Fig. 1).

### **3.2. Experimento 2. Efecto de la administración conjunta de L-Trp y antagonistas de los receptores de serotonina 5-HT<sub>2</sub>**

El grupo tratado sólo con L-triptófano aumentó ligeramente el contenido de melatonina en relación a los animales que recibieron salino (control), pero sin cambios significativos. Ver figura 2.

Cuando se administraron los antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (ketanserina y SDZ-SER 082) en combinación con el L-triptófano (250 mg/kg), se observó un descenso en el contenido de melatonina en la glándula pineal. En el caso del SDZ-SER 082 (1 mg/Kg) este efecto fue significativo con respecto al grupo control y al tratado con L-trp (-57% y -67% respectivamente). La administración de ketanserina (3 mg/Kg) conjuntamente con el L-triptófano, también produjo una disminución del contenido de melatonina que fue estadísticamente significativa frente al grupo tratado con L-triptófano (-41%), pero no en comparación con el grupo tratado con salino (Fig. 2).

En cuanto a la actividad AANAT, sólo se observaron cambios significativos en el grupo tratado conjuntamente con L-triptófano y SDZ-SER 082, en el que se produjo un descenso de un 30% en la actividad de este enzima ( $p < 0.05$  vs grupo control; Fig. 2).



**Fig. 2.** Contenido nocturno de melatonina y actividad del enzima AANAT en la glándula pineal de ratas tras la administración de salino (control) o de L-trp + ketanserina y L-Trp + SDZ SER 082. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6 animales <sup>\*</sup>( $p < 0.05$ ) vs salino; <sup>#</sup>( $p < 0.05$ ) vs L-triptófano.

## TRABAJO EXPERIMENTAL 5

### MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA *IN VIVO*. PAPEL DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>2</sub> PINEALES



## 1. OBJETIVO

En los mamíferos se acepta de una forma bastante generalizada que la síntesis de melatonina en la glándula pineal está controlada por el aumento de la actividad del enzima AANAT (Borjigin et al., 1995), la cual a su vez está regulada por la inervación adrenérgica procedente del ganglio cervical superior (Klein et al., 1997). Los cambios que a lo largo del ciclo día/noche ocurren en la liberación de NA resultan determinantes de las variaciones rítmicas de la síntesis de melatonina. Por otro lado, la vía adrenérgica pineal también integra la información rítmica generada en el reloj circadiano localizado en el NSQ del hipotálamo, lo que permite que la oscilación del proceso de síntesis de melatonina se mantenga en situaciones de ambiente constante y se ajuste al ciclo luz/oscuridad (Liu y Borjigin, 2005).

Como se ha demostrado en los trabajos anteriores, la 5-HT es una molécula esencial en la función de la glándula pineal. En el trabajo 2 hemos visto que la reducción en el contenido de 5-HT en los pinealocitos promovida por un déficit en su síntesis, supone una limitación en la producción normal de melatonina y en la capacidad de la glándula de mantener el ritmo día/noche de la hormona. Por otro lado, mediante técnicas de microdiálisis hemos monitorizado de forma local la secreción pineal, aportando evidencias de que, en circunstancias normales, una parte de 5-HT es liberada al medio extracelular (Trabajo 3). Dicha liberación sigue un patrón diario contrario en líneas generales al de la melatonina, lo que está de acuerdo con que el papel que tienen la 5-HT pineal como sustrato metabólico a partir del cual se forma la melatonina. No obstante, hemos observado que existe un aumento de la liberación de 5-HT pineal al inicio de la noche, justo antes del pico nocturno de melatonina, hecho que concuerda con lo mostrado por otros autores utilizando microdiálisis *in vivo* (Azekawa et al., 1991; Sun et al., 2002). Se ha especulado con que dicha 5-HT extracelular podría jugar un papel relevante en la modulación de la producción de melatonina pineal, ya que: *i)* se han localizado receptores del tipo 5-HT<sub>2</sub> en la glándula pineal de mamíferos (Govitrapong et al., 1991), *ii)* la aplicación de 5-HT en cultivos de pinealocitos produce un aumento de la actividad AANAT promovida por agonistas β-adrenérgicos tales como el isoproterenol (Sugden, 1990), *iii)* la aplicación de antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> bloquea el aumento de la

acumulación de AMPc intracelular y de la producción de melatonina inducida por isoproterenol (Olcese y Munker, 1994; Míguez et al., 1997b), *iv*) la administración i.p. de antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> puede llegar a bloquear el aumento nocturno de la actividad AANAT y del contenido de melatonina pineal (Steardo et al., 2000).

Aunque los estudios *in vitro* son relevantes a la hora de verificar mecanismos celulares que regulan un proceso fisiológico, no cabe duda de que la evaluación *in vivo* permite descartar posibles influencias del mantenimiento del tejido (o células) en los ensayos *in vitro*. Por el contrario, los estudios *in vivo* en lo que se evalúa la respuesta de una función específica a un fármaco (ej, agonista/antagonista de receptores) administrado por vía sistémica son susceptibles de contener acciones no específicas del fármaco llevadas a cabo sobre localizaciones diferentes a la que se desea evaluar (ej., el efecto de un fármaco sobre la producción de melatonina pineal podría derivar de su acción sobre el NSQ hipotalámico y no sobre la propia pineal). Mediante las técnicas de microdiálisis *in vivo* se pueden reducir estos efectos inespecíficos de los tratamientos, dado que estos pueden ser incluidos en el propio medio que se utiliza para monitorizar de forma local la liberación de compuestos desde el tejido de interés. Teniendo esto en cuenta, el presente trabajo fue diseñado para estudiar mediante microdiálisis el posible papel que juegan los receptores 5-HT<sub>2</sub> pineales en la producción nocturna de melatonina en la rata en libre movimiento, valorando la respuesta de dicho proceso a diferentes antagonistas serotoninérgicos.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos**

Al igual que en los anteriores experimentos, la melatonina y la NAS fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). La Ketanserina (antagonista 5-HT<sub>2A,2B</sub>), el SDZ-SER (antagonista 5-HT<sub>2C</sub>) fueron adquiridos a RBI (Sigma Chem. Co.). Los demás reactivos fueron de grado analítico y de distintas casas comerciales.

## **2.2. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas macho de la raza Sprague Dawley con un peso comprendido entre los  $270 \pm 25$  g. Los animales fueron acondicionados a un fotoperiodo invertido de luz/oscuridad de 14/10 horas, con encendido de las luces a las 20:00 horas y apagado de las mismas a las 10:00 horas. Se mantuvieron a una temperatura controlada de  $21 \pm 1$  °C y con libre acceso a agua y comida. Los animales permanecieron en estas condiciones durante al menos dos semanas antes de realizar cualquier experimento.

El manejo de los animales fue llevado a cabo según la legislación española: Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 252 del 21 de octubre).

## **2.3. Microdiálisis pineal *in vivo***

Los procedimientos de microdiálisis pineal fueron llevados a cabo tal y como se detalla en el Trabajo Experimental 3. Las sondas fueron construídas en nuestro laboratorio y su implantación en el cerebro del animal se llevó a cabo el día previo al comienzo de la monitorización del fluido extracelular pineal. Los animales se mantuvieron en condiciones de libre movimiento y las sondas fueron profundidas de manera continua con LCRa a un flujo de 2  $\mu$ l/minuto.

En cada animal implantado, tras un periodo de recuperación de 16 horas, se procedió a analizar cromatográficamente los valores de los compuestos recuperados del medio extracelular, como un índice previo de la correcta implantación de la sonda en la glándula pineal. Posteriormente se tomaron muestras del dializado cada 30 minutos durante dos días consecutivos.

Los tratamientos fueron disueltos en el LCRa a la concentración deseada e incluidos en el medio de diálisis. Cada animal fue monitorizado durante dos días consecutivos, de forma que el primer día fue utilizado como valores control y el segundo día como valores tras la aplicación del tratamiento respectivo. Al final del experimento los animales fueron sacrificados por decapitación, tras lo cual se procedió a verificar la correcta localización de la sonda en el órgano pineal

mediante inspección visual. Los casos en los que la localización de la sonda fue extrapineal, o de forma muy marginal en la pineal, fueron descartados.

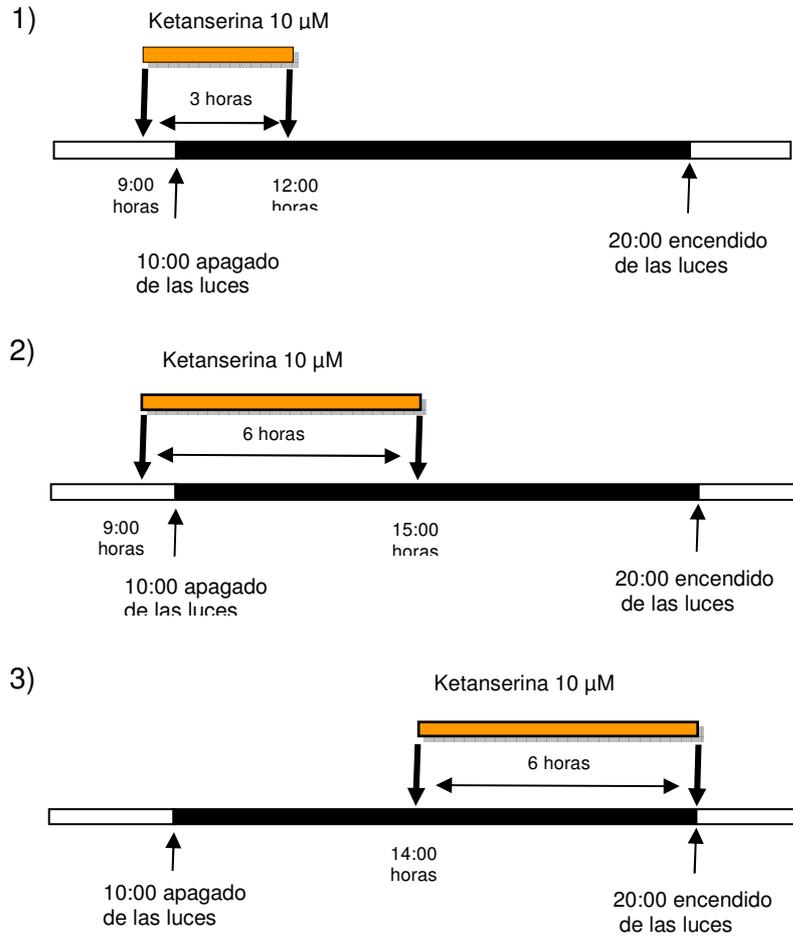
#### **2.4. Tratamientos administrados**

Como ya se mencionó previamente, los tratamientos con fármacos específicos se administraron vía intracánula durante el segundo día de monitorización. Esos mismos animales recibieron durante el primer día un tratamiento similar pero que contenía solo el LCRa en el que se disolvieron los fármacos (control).

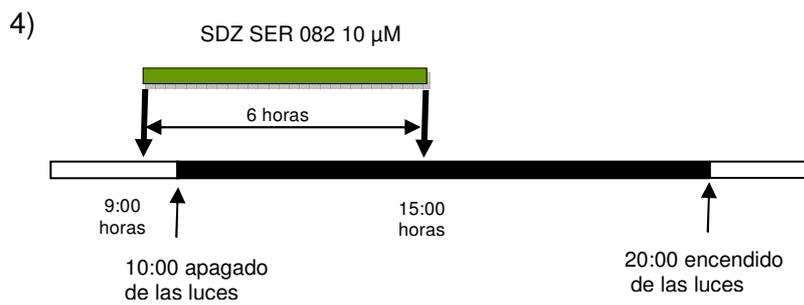
Los tratamientos farmacológicos (ver esquema 1), administrados el segundo día, fueron tal y como se indica a continuación:

1. ***Ketanserina 10  $\mu$ M durante tres horas al inicio de la noche:*** desde una hora antes del apagado de las luces hasta dos horas posteriores al apagado de las mismas (9:00-12:00 horas).
2. ***Ketanserina 10  $\mu$ M durante seis horas al inicio de la noche:*** desde una hora antes del apagado de las luces hasta cinco horas posteriores al apagado de las mismas (9:00-15:00 horas).
3. ***Ketanserina 10  $\mu$ M durante seis horas en la segunda mitad de la noche:*** desde la mitad de la fase de oscuridad hasta el final de la misma (14:00-20:00 horas).
4. ***SDZ SER O82 10  $\mu$ M durante 6 horas desde el inicio de la noche:*** desde una hora antes del apagado de las luces hasta cinco horas posteriores al apagado de las mismas (9:00-15:00 horas)

**Esquema 1.** Administración de Ketanserina 10  $\mu$ M localmente en la glándula pineal.



**Esquema 2.** Administración de SDZ SER 082 10  $\mu$ M localmente en la glándula pineal.



## **2.5. Determinaciones analíticas de los niveles extracelulares de 5-HT, NAS y melatonina**

Las determinaciones analíticas de los niveles de 5-HT, NAS y MEL se llevaron a cabo directamente sobre el dializado pineal mediante las técnicas de HPLC con detección fluorimétrica (melatonina) y electroquímica (5-HT, NAS) descritas previamente (ver Trabajo experimental 3).

## **2.6. Análisis estadístico**

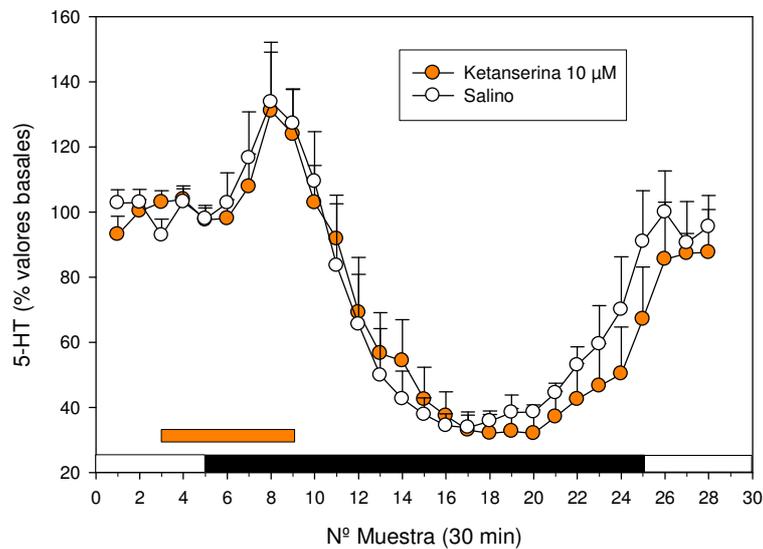
Los datos obtenidos de cada animal fueron tratados individualmente, de forma que el día 1 fue tomado como control y el día 2 como aplicación del tratamiento con el correspondiente antagonista serotoninérgico. Para cada animal, los datos obtenidos en cada muestra se expresaron en porcentaje de descenso o incremento con respecto a los valores basales de ese mismo animal. Los valores basales fueron calculados como la media de 3 muestras de la fase de luz (previas al tratamiento). Posteriormente los datos del día 1 (control) y día 2 (tratamiento) de los animales que recibieron el mismo tratamiento fueron agrupados y expresados como la media  $\pm$  E.E.M (n=4-5). Las comparaciones estadísticas se realizaron entre los mismos puntos temporales de los dos días, utilizando la prueba de la *t* de Student (Systat Software, Inc.).

Para las cantidades totales de cada compuesto, se calculó la cantidad total liberada durante la noche del día 1 (control) y del día 2 (tratamiento). En cada animal dicha cantidad fue calculada como el sumatorio de los niveles obtenidos en todos los puntos temporales de la noche del día 1 y del día 2. A fin de establecer comparaciones entre los diferentes tratamientos efectuados, se expresó la cantidad total liberada en el día 2 (tratamiento) como porcentaje de la liberada en el día 1 (control), adjudicándosele a esta última un valor del 100%. Posteriormente se agruparon los datos de los animales que recibieron el mismo tratamiento y se expresaron como media  $\pm$  E.E.M. Las comparaciones se llevaron a cabo mediante un ANOVA de una vía seguido de un test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación fue fijado con  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

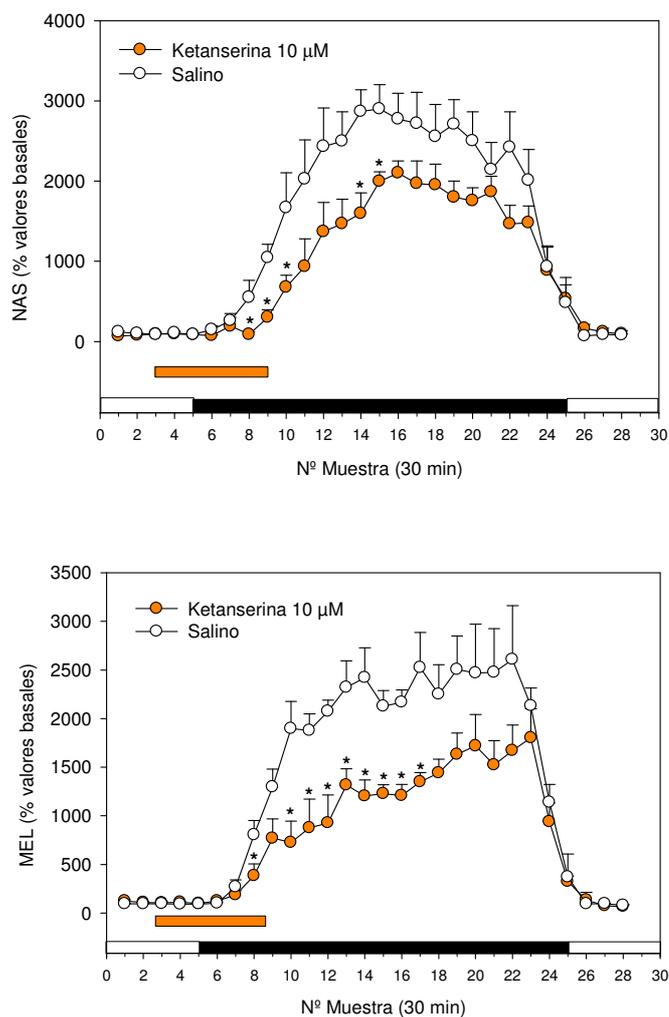
#### 3.1. Administración de ketanserina 10 $\mu\text{M}$ durante 3 horas al inicio de la oscuridad

La administración local del antagonista 5-HT<sub>2A/C</sub> ketanserina a la dosis de 10  $\mu\text{M}$  durante tres horas al inicio de la noche (9-12 horas) no produjo cambios significativos en los niveles extracelulares de 5-HT en la glándula pineal a lo largo de la fase nocturna en comparación con los valores hallados en los mismos animales cuando recibieron el tratamiento salino (día 1) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Efecto de administración local de ketanserina 10  $\mu\text{M}$  durante 3 horas al inicio de la fase de oscuridad (desde las 9:00 hasta las 12:00 horas) sobre los niveles extracelulares de 5-HT pineal. Los datos se expresan en porcentaje del nivel basal (media de tres muestras previas al tratamiento) y representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales. La barra indica la fase de luz/oscuridad.

Sin embargo, la ketanserina administrada durante las primeras horas de la noche produjo una disminución de la liberación de NAS que se mantuvo durante la mayor parte de la noche (Fig. 2).



**Fig. 2.** Efecto de administración local de ketanserina 10  $\mu$ M durante 3 horas al inicio de la noche (desde las 9:00 a las 12:00 h) sobre la liberación de NAS y melatonina en la glándula pineal. Los datos se expresan en porcentaje del nivel basal (media de tres muestras previas al tratamiento) y representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales. La barra indica la fase de luz/oscuridad. \* $p < 0.05$  vs salino.

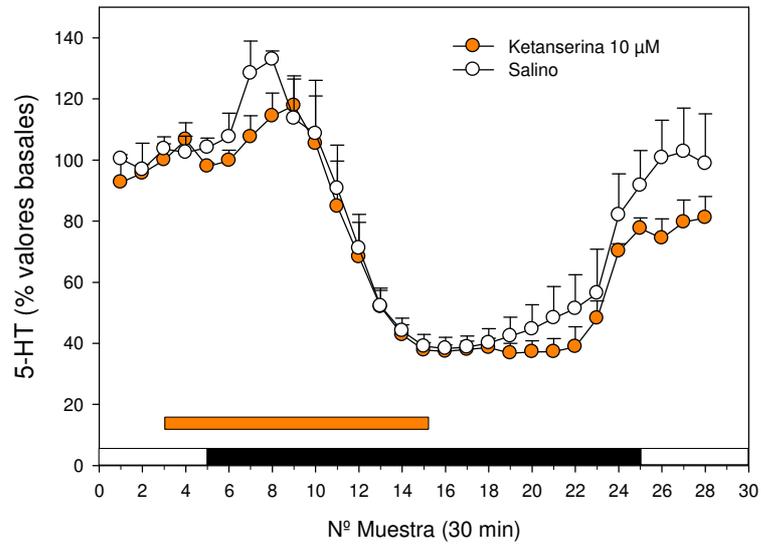
Los mayores efectos se lograron desde el final de la aplicación local del tratamiento y hasta la mitad de la noche, alcanzándose niveles que fueron un

30% menores que los encontrados durante el tratamiento con salino ( $p < 0.05$ ). Durante la segunda mitad de la noche, los niveles de NAS continuaron siendo menores que los del control, pero sin llegar a alcanzar significación estadística. De forma similar a la NAS, los niveles extracelulares de melatonina en la pineal fueron reducidos por la aplicación local de ketanserina durante 3 horas al inicio de la noche, de forma que los valores de melatonina fueron del orden del 40% más bajos que los observados con el tratamiento salino (Fig. 2). De manera similar a la NAS, las diferencias fueron significativas desde la parte final del tratamiento hasta bien pasada la media noche.

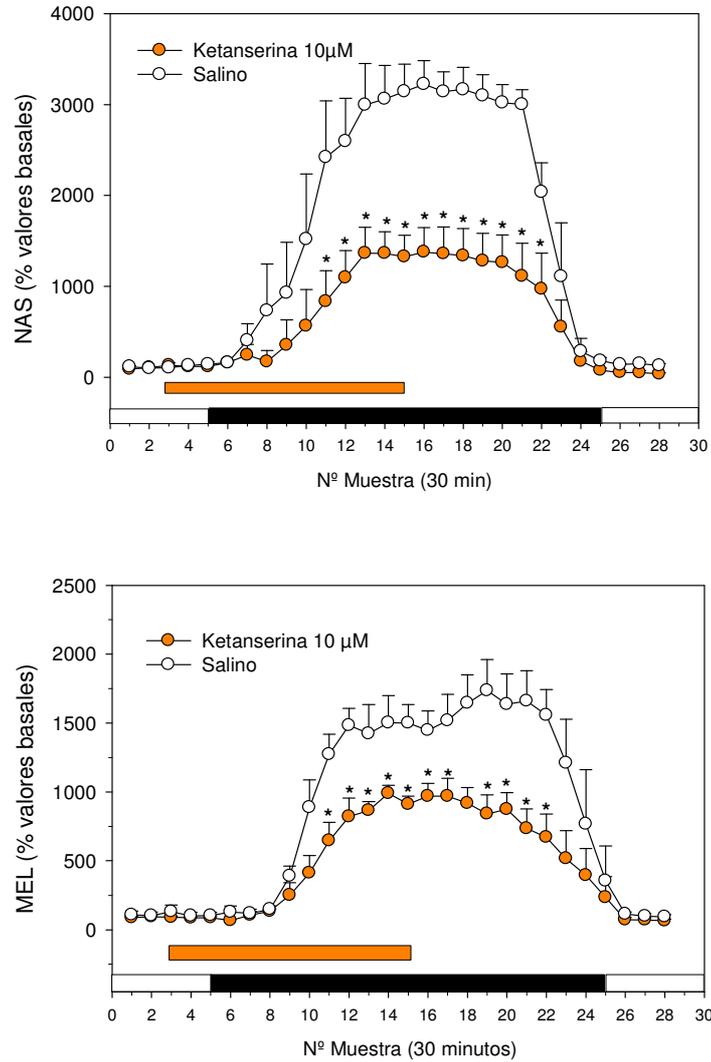
### **3.2. Administración de ketanserina 10 $\mu\text{M}$ durante 6 horas en la primera mitad de la noche**

El aumento de la duración (seis horas) de la exposición de los animales a ketanserina administrada desde el inicio de la noche no produjo cambios significativos en la liberación de 5-HT, en relación con la administración de salino (Fig. 3). La liberación de NAS se vió fuertemente reducida tras la administración de este antagonista de receptores serotoninérgicos, siendo esta disminución evidente durante toda la fase de oscuridad. La reducción de la liberación de NAS supuso que los niveles extracelulares fuesen de aproximadamente un 60% menores que con el tratamiento salino (Fig. 4).

Al igual que con la NAS, la liberación de melatonina también se redujo tras la administración durante 6 horas de ketanserina (Fig. 4), alcanzándose valores que fueron aproximadamente un 57% de los hallados en los tratamientos con salino (día 1). La reducción provocada por la ketanserina fue significativa con respecto al tratamiento salino durante la mayor parte de la noche.



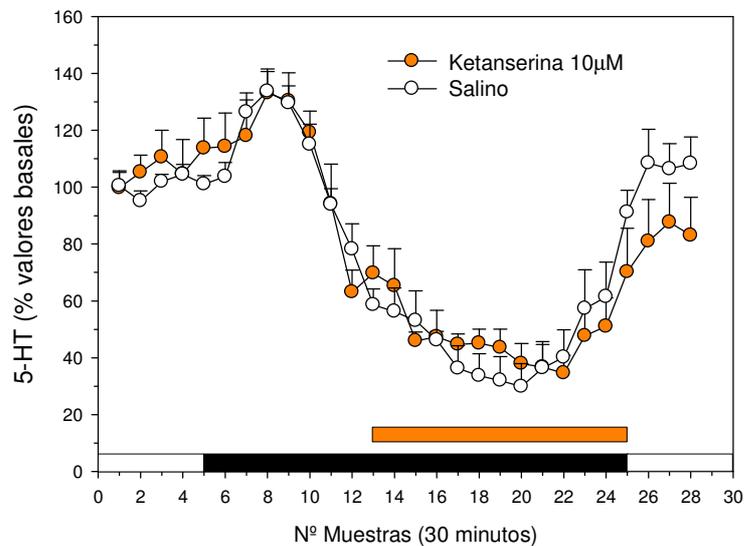
**Fig. 3.** Efecto de administración local de ketanserina 10  $\mu$ M durante 6 horas al inicio de la noche (desde las 9:00 a las 12:00 h) sobre los niveles de 5-HT extracelular pineal. Los datos se expresan en porcentaje del nivel basal (media de 3 muestras previas al tratamiento) y representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales. La barra indica la fase de luz/oscuridad.



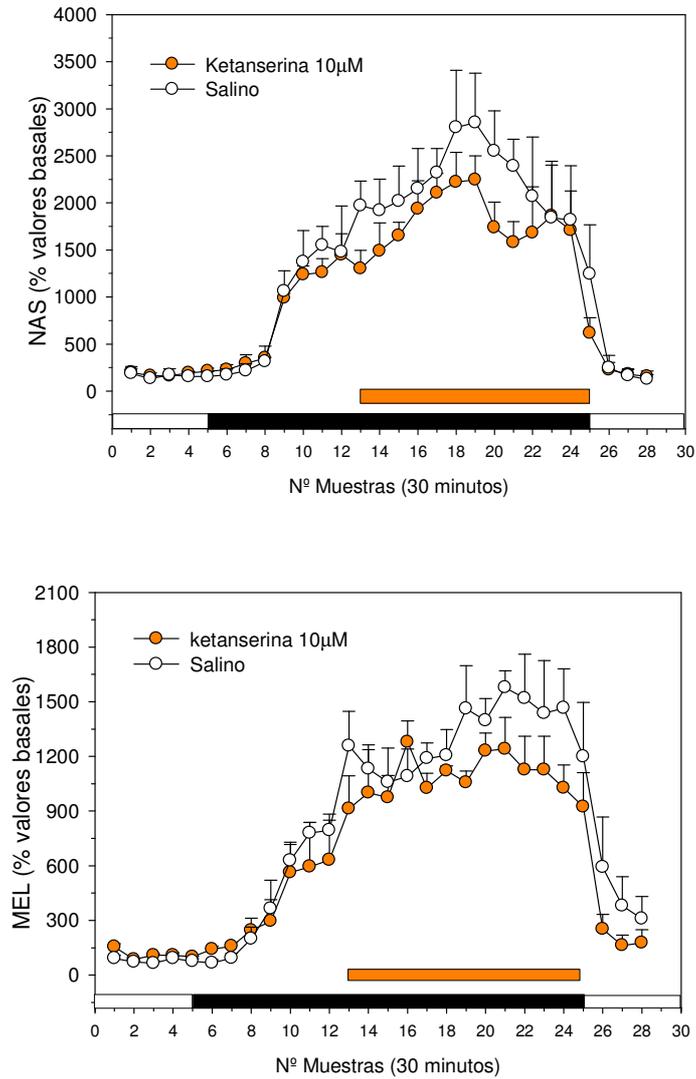
**Fig. 4.** Efecto de administración local de ketanserin 10 μM durante 6 horas al inicio de la noche (desde las 9:00 h hasta las 15:00 horas) sobre la liberación de NAS y melatonina pineal. Los datos se expresan en porcentaje del nivel basal (media de 3 muestras previas al tratamiento) y representan la media ± E.E.M. de 5 animales. La barra indica la fase de luz/oscuridad. \*p<0.05 vs salino.

### 3.3. Administración de ketanserina 10 $\mu\text{M}$ durante 6 horas en la segunda mitad de la noche

La aplicación local de ketanserina 10  $\mu\text{M}$  en la glándula pineal durante seis horas, desde la mitad de la fase de oscuridad hasta el encendido de las luces al día siguiente (14-20 horas), no produjo cambios significativos en la liberación de 5-HT en comparación con los valores obtenidos en los mismos animales tras recibir un tratamiento control (Fig. 5). Tampoco se observaron diferencias debidas al tratamiento con ketanserina durante la segunda mitad de la noche en los niveles de NAS o de melatonina en los dializados (Fig. 6).



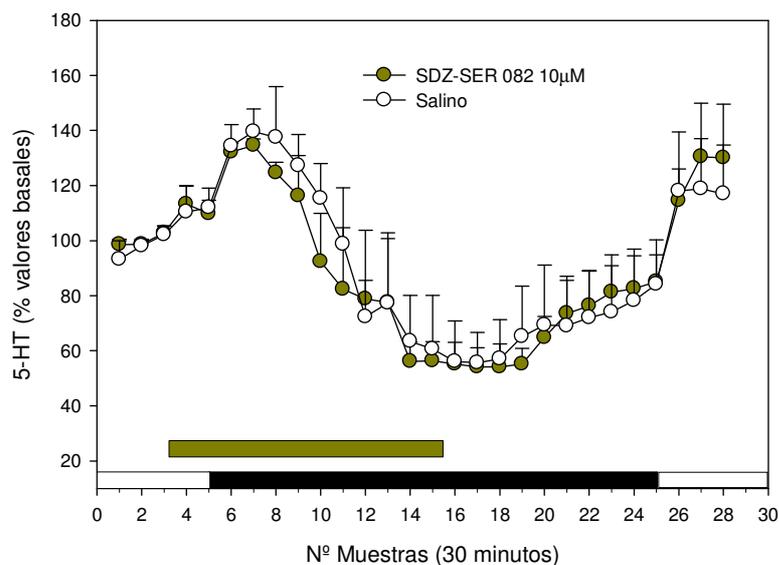
**Fig. 5.** Efecto de administración local de ketanserina 10  $\mu\text{M}$  durante 6 horas en la segunda mitad de la noche (desde las 14:00 h hasta las 20:00 h) sobre los niveles extracelulares de 5-HT en la pineal. Los datos se expresan en porcentaje del nivel basal (media de las muestras antes de la oscuridad) y representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales. La barra indica la fase de luz/oscuridad.



**Fig. 6.** Efecto de administración local de ketanserina 10  $\mu$ M durante 6 horas en la segunda mitad de la noche (desde las 14:00 h hasta las 20:00h) sobre la liberación de NAS y melatonina pineal. Los datos se expresan en porcentaje del nivel basal (media de las muestras antes de la oscuridad) y representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales. La barra indica la fase de luz/oscuridad.

### 3.4. Administración de SDZ SER 082 10 $\mu\text{M}$ durante 6 horas en la primera mitad de la noche

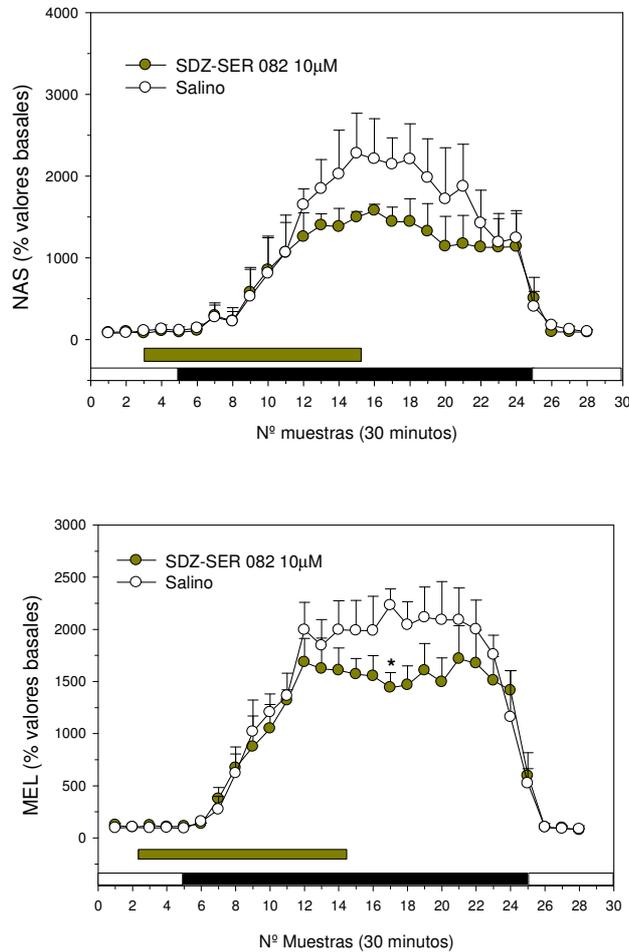
La administración local en la glándula pineal del antagonista de receptores 5-HT<sub>2B/C</sub>, SDZ SER 082, durante seis horas en la primera mitad de la noche (desde una hora antes del apagado de las luces hasta la mitad del ciclo de oscuridad) no produjo cambios significativos en la liberación de 5-HT en relación con los valores obtenidos en el día 1, cuando se administró un tratamiento similar con solución salina (Fig. 7).



**Fig. 7.** Efecto de la administración local de SDZ SER 082 10  $\mu\text{M}$  durante 6 horas en la primera mitad de la noche (desde una hora antes de la oscuridad hasta la medianoche: 9:00-15:00 horas) en la liberación de 5-HT en la glándula pineal. Los datos se expresan en porcentaje del nivel basal (media de las muestras antes de la oscuridad) y representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales. La barra indica la fase de luz/oscuridad.

En cuanto a la liberación de NAS, se observó una cierta caída en la mitad de la fase de oscuridad tras el tratamiento con SDZ-SER 082 pero la diferencia no fue estadísticamente significativa comparada con la administración de salino (día 1) (Fig. 8). Una reducción similar tras el tratamiento con el fármaco se observó en

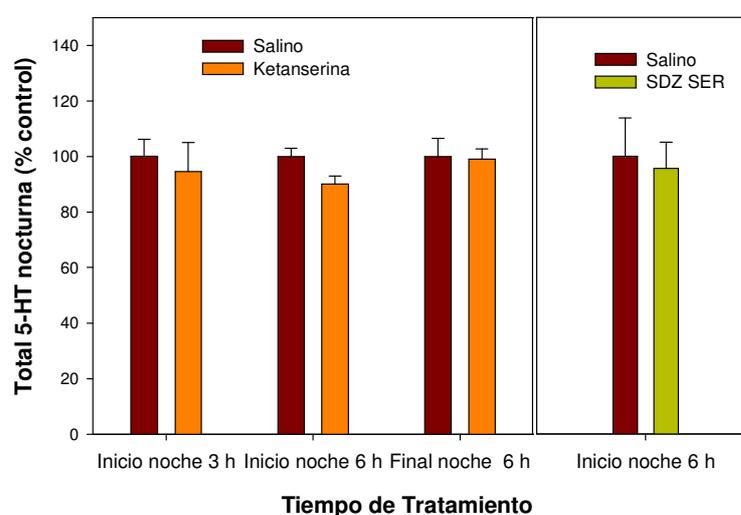
en la liberación de melatonina de la glándula pineal. No obstante, esta reducción sólo fue puntualmente (justo a la finalización de la infusión del fármaco) significativa con respecto a los valores del día 1 (tratamiento con salino).



**Fig. 8.** Efecto de la administración local de SDZ SER 082 10 µM durante 6 horas en la primera parte de la noche (desde una hora antes de la oscuridad hasta la medianoche: 9:00-15:00 horas) sobre la liberación de NAS y melatonina en la glándula pineal. Los datos se expresan en porcentaje del nivel basal (media de las muestras antes de la oscuridad) y representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales. \* $p < 0.05$  vs salino. La barra indica la fase de luz/oscuridad.

### 3.5. Efecto de los tratamientos con ketanserina y SDZ-SER 082 sobre la cantidad total de 5-HT, NAS y melatonina liberadas a la noche en la glándula pineal

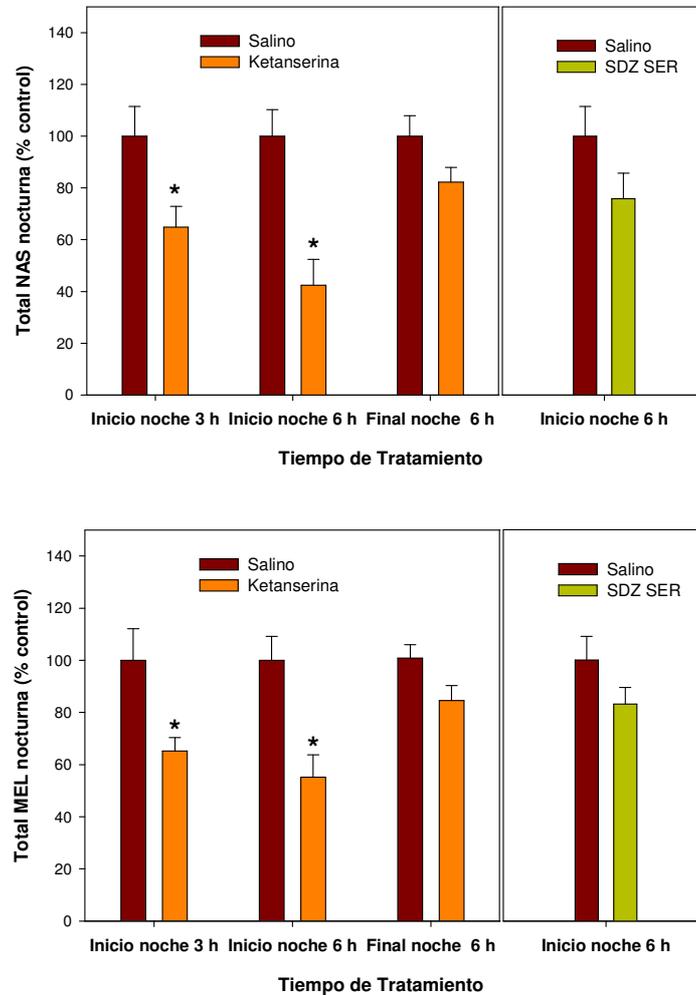
Las Figuras 9 y 10 resumen las cantidades totales de los compuestos pineales liberados al medio extracelular tras los tratamientos efectuados. Los datos se expresan en porcentaje del respectivo control, es decir, de los niveles monitorizados durante el día 1 tras la canulación en el que los animales recibieron un tratamiento salino (valores tomados como 100%). Se puede observar que no hubo cambios significativos en la cantidad total de 5-HT extracelular con ninguno de los tratamientos efectuados (Fig. 9).



**Fig. 9.** Cantidad total de 5-HT liberada durante la noche en la glándula pineal tras la administración local de ketanserina (diferentes momentos y duraciones) y SDZ-SER 082. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales.

Con respecto a las cantidades totales de NAS y de melatonina (Fig. 10) se observaron cambios similares en ambos compuestos tras los tratamientos respectivos. Así, cuando el tratamiento con ketanserina se administró al principio de la noche y con una duración de 3 o de 6 horas, se produjo un fuerte descenso del total liberado de NAS (-35% y -58% a las 3 y 6 horas respectivamente) y melatonina (-35% y -45% a las 3 y 6 horas respectivamente). En contraste, la

aplicación local de ketanserina durante la segunda mitad de la noche no provocó cambios significativos en la cantidad total liberada, aunque si hubo un ligera tendencia al descenso. El SDZ-SER también redujo los niveles de NAS (-24% con respecto al control) y de melatonina (-17% con respecto al control), pero estos efectos no alcanzaron la significación estadística.



**Fig. 10.** Cantidades totales de NAS y melatonina liberadas durante la noche desde la glándula pineal tras la administración local de ketanserina (diferentes momentos y duraciones) y SDZ-SER 082. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 5 animales. \* $p < 0.05$  vs salino.



## DISCUSIÓN



## **1. Variaciones diarias del contenido de catecolaminas, indolaminas y derivados 5-metoxindólicos en la glándula pineal**

En el primer trabajo de la presente Tesis se estudiaron de forma detallada las fluctuaciones diarias del contenido de catecolaminas, indolaminas y 5-metoxindoles implicados en la vía de síntesis de melatonina en la glándula pineal de la rata de laboratorio, así como las principales actividades enzimáticas de dicha ruta metabólica. Los datos obtenidos confirman en líneas generales que la función de la glándula pineal de los mamíferos está afectada de manera primordial por los cambios derivados del ciclo lumínico diario (Binkley, 1983; Mefford et al., 1983; Klein, 1985; King y Steinlechner, 1985; Goldman y Darrow, 1983; Hermes et al., 1994; Míguez et al., 1995a, 1996a). Los elevados niveles de melatonina producidos durante la noche en relación a los bajos valores durante el día, son la base para la integración fotoperiódica y el ajuste rítmico de muchas funciones en el organismo. Dado que la actividad del órgano neurosecretor pineal está bajo control nervioso directo del NSQ en el que reside el reloj circadiano principal (Klein y Moore, 1979), los ritmos de melatonina representan una señal fiable de la actividad del sistema circadiano y, al mismo tiempo, la principal vía de salida de dicha información hacia las células del organismo (Pévet, 2003). Desde este punto de vista, es destacable el hecho de que el ritmo diario de melatonina descrito en la rata de laboratorio presente características similares a las halladas en especies estacionales de roedores, en las que el ritmo de melatonina (bien en base a la amplitud del pico nocturno o bien en base a su duración) juega un papel fundamental en el ajuste anual de la función reproductiva, entre otras (Illnerova et al., 1983, 1984; Pévet et al., 1989; Vivien-Roels et al., 1992; Hermes et al., 1994; Míguez et al., 1995a, 1996a). Ello apoya la hipótesis generalmente aceptada de que el ritmo de la melatonina formada en la glándula pineal sirve para integrar la información del fotoperiodo ambiente, tanto en el plano diario como a nivel estacional (Pévet, 2003).

En la mayor parte de los mamíferos la actividad del enzima AANAT es el principal mecanismo celular que condiciona el incremento nocturno de la melatonina (Ganguly et al., 2002). De acuerdo con ello, los datos del trabajo experimental 1 muestran que en la rata existe una fuerte correlación entre la

actividad AANAT y las concentraciones de NAS y melatonina a lo largo del ciclo día/noche. El incremento nocturno en estos parámetros se produce de manera simultánea y con un retardo de cerca de tres horas desde el inicio de la oscuridad, probablemente motivado por el tiempo necesario para la activación de los elementos intracelulares pineales que llevan a la síntesis de *novoo* del ARNm de la AANAT (sus niveles son casi nulos de día) y la acción de la enzima HIOMT sobre la NAS para formar melatonina. Entre estos elementos intracelulares se encuentran el incremento en los niveles de AMPc derivado de la estimulación nocturna de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos localizados en los pinealocitos. El AMPc formado activa la fosforilación del factor CREB mediada por una PKA, lo que redundo en un aumento de la transcripción del gen de la AANAT (Roseboom y Klein, 1995; Roseboom et al., 1996). Nuestros datos muestran que el descenso del pico nocturno de NAS y melatonina ya comienza antes del final de la noche y tiene lugar de forma drástica, derivada de una rápida caída de la actividad AANAT. Los mecanismos implicados en la finalización de la actividad nocturna de este enzima no son bien conocidos, pero parecen implicar un descenso en los niveles de AMPc, la desfosforilación de CREB y el cese de la transcripción de la AANAT. Diversos estudios han puesto en evidencia la importancia de la acción de las ARNasas sobre el ARNm residual de la AANAT, así como la acción proteolítica sobre la proteína AANAT residual, las cuales contribuyen a limitar de forma rápida la actividad de este enzima (Klein et al., 1997; Ganguly et al., 2002).

Como ya se ha indicado con anterioridad, la 5-HT juega un papel central en el metabolismo indolaminérgico de la glándula pineal de mamíferos. Nuestros datos muestran la existencia de niveles muy elevados de 5-HT en la glándula pineal, así como de fuertes cambios diarios en esos niveles, que pasan desde máximos de 150 ng/glándula al final de la fase de luz, hasta mínimos de 20 ng/pineal en mitad de la noche. Estas variaciones fueron similares a las descritas por otros autores en la rata y algunas especies de hámster (Mefford et al., 1983; Steinlechner et al., 1983; Champney et al., 1984; McNulty et al., 1986; Lerchl y Schlatt, 1992; Hermes et al., 1994; Míguez et al., 1995a, 1996a; Harumi y Matsushima, 1998). También hemos hallado una fuerte correlación entre el ritmo diario de 5-HT y el de su precursor metabólico, el 5-HTP. Sin embargo, la actividad del enzima TP-OH, la cual representa el paso limitante de la síntesis de

5-HT pineal, muestra una fuerte correlación negativa con los niveles de 5-HTP y 5-HT, con máximos localizados durante la fase nocturna que representan alrededor de un 100% de aumento frente a los niveles de día. Datos similares sobre la actividad diaria de la TP-OH fueron mostrados en estudios previos en roedores (Shibuya et al., 1977; Ehret et al., 1991; Besançon et al., 1996). Además, Sugden (2003) demostró la existencia de un aumento nocturno (niveles cuatro veces superiores a los de día) en los niveles de ARNm de la TP-OH en la pineal de rata, lo que concuerda con lo mostrado en este trabajo. Todo ello indica que, durante la noche, se produce un incremento de la síntesis y de la actividad enzimática de la TP-OH, y sugiere que este proceso podría determinar la concentración de 5-HT pinealocitaria disponible para la formación de melatonina.

Tal y como se observa en la Tabla 1 incluida en esta discusión, hemos encontrado una fuerte correlación estadística negativa entre el contenido de 5-HT pineal con el contenido de NAS y de melatonina. Además, dicha correlación también existe con la actividad del enzima AANAT que regula la síntesis de ambos derivados serotoninérgicos. En general se puede ver que el análisis de correlaciones establecido sobre la media de los distintos grupos a lo largo del ciclo día/noche, ofrece valores de correlación mayores que cuando se analizan datos individuales, lo que refleja probablemente la existencia de una importante variabilidad entre animales. Estos efectos se evidencian todavía con mayor claridad en la correlación negativa existente entre 5-HT y la actividad TP-OH, que aunque más débil que en los casos anteriores, también fue estadísticamente significativa incluso en el análisis de datos individuales. El conjunto de estos datos indica claramente que el descenso del contenido de 5-HT pineal durante la noche es debido principalmente al fuerte aumento de la actividad AANAT que provoca su rápida transformación en NAS y melatonina. Al final de la noche, la caída de la actividad de este enzima redundará en una caída de la síntesis de melatonina y una recuperación de los niveles de 5-HT. Estos cambios de los niveles de 5-HT y melatonina se observaron ya una hora antes del encendido de las luces (fin de la noche), lo que prueba que el contenido de 5-HT pineal sufre variaciones pasivas en función de su utilización para formar melatonina.

Tabla 1. Correlación entre las variaciones diarias de los niveles de diferentes indoles y derivados presentes en la glándula pineal de la rata.

Parámetros correlacionados		Medias de grupos a lo largo del ciclo día/noche	Datos individuales a lo largo del ciclo día/noche
5-HT	vs 5-HTP	0.92 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>
	vs 5-HIAA	0.93 <sup>a</sup>	0.79 <sup>a</sup>
	vs NAS	-0.80 <sup>b</sup>	-0.63 <sup>a</sup>
	vs MEL	-0.83 <sup>b</sup>	-0.67 <sup>a</sup>
	vs NAT	-0.86 <sup>b</sup>	-0.67 <sup>a</sup>
	vs TP-OH	-0.62	-0.31 <sup>c</sup>
5-HIAA	vs NAS	-0.85 <sup>b</sup>	-0.44 <sup>b</sup>
	vs MEL	-0.89 <sup>a</sup>	-0.55 <sup>a</sup>
	vs NAT	-0.91 <sup>a</sup>	-0.58 <sup>a</sup>
	vs TP-OH	-0.67 <sup>c</sup>	-0.28
NAS	vs MEL	0.99 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>
	vs NAT	0.98 <sup>a</sup>	0.84 <sup>a</sup>
	vs TP-OH	0.87 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>
MEL	vs NAT	0.98 <sup>a</sup>	0.91 <sup>a</sup>
	vs TP-OH	0.84 <sup>b</sup>	0.67 <sup>a</sup>

Las correlaciones entre medias de grupos fueron estimadas a partir de ocho valores de cada uno de los parámetros. Cuando se consideraron datos obtenidos de animales individuales, se utilizaron entre 46-48 datos para cada parámetro. Estadística: Test de correlación de Pearson. <sup>a</sup>: p<0.001; <sup>b</sup>: p<0.01; <sup>c</sup>: p<0.05.

Estudios muy iniciales de Snyder et al. (1967) han sugerido que el ritmo diario en el contenido de 5-HT pineal posee un carácter endógeno, tanto en cuanto parece persistir en ratas cegadas o mantenidas en oscuridad constante. Más recientemente, Sun et al. (2002) usando técnicas de microdiálisis pineal mostraron pruebas de un ritmo de liberación de 5-HT (probablemente asociado al ritmo de síntesis de la amina) con características endógenas. En el presente trabajo usando condiciones lumínicas cíclicas hemos hallado que la concentración de 5-HT pineal desciende ya en la primera hora de la noche, aunque la síntesis de melatonina no parece comenzar hasta pasadas tres horas de oscuridad. Este dato pone de manifiesto que otros factores diferentes de los cambios diarios en la actividad AANAT podrían afectar al contenido endógeno de

5-HT pineal. De hecho, que la 5-HT pineal sea utilizada como sustrato en diferentes rutas metabólicas, así como que una parte pueda ser liberada al medio extracelular (ver más adelante), pueden ser aspectos que lleguen a condicionar el ritmo de contenido de 5-HT pineal.

El metabolismo de la 5-HT en la glándula pineal es sumamente complejo. A parte de una acetilación para formar NAS y posteriormente melatonina, la 5-HT puede participar en al menos otras dos rutas: oxidación para formar 5-HIAA, 5-HTOL y 5-MTOL, y *orto*-metilación directa para formar 5-MT. De ellas, la ruta de oxidación es muy activa debido a la alta actividad constitutiva del enzima MAO mitocondrial (King y Steinlechner, 1985). En la pineal de rata se han descrito dos tipos de MAO en función de su sensibilidad a inhibidores y sustratos: la MAO A, presente en las terminales nerviosas, y la MAO B presente en los pinealocitos. En lo que respecta a la oxidación de 5-HT pineal, la MAO A es más activa (Oxenkrug et al., 1985; Masson-Pévet y Pévet, 1989; Yeung Lam et al., 2004) y en consecuencia se ha propuesto que la 5-HT saldría de los pinealocitos para ser oxidada en las terminales noradrenérgicas (Masson-Pévet y Pévet, 1989). No obstante esta posibilidad ha sido puesta en entredicho dado que la incubación de pineales de ratas ganglionectomizadas (se elimina la inervación simpática pineal) muestra liberación de 5-HIAA, aunque menos que las pineales de ratas normales, sugiriendo que una gran parte de la 5-HT podría ser oxidada en los propios pinealocitos (Míguez et al., 1995b). Por otro lado, se ha descrito la existencia de variaciones diarias en la actividad MAO pineal con niveles más elevados durante el día que de noche (King y Steinlechner, 1985), aunque Yeung Lam et al. (2004) no encuentran diferencias día/noche en el contenido de ARNm y actividad enzimática de la MAO A pineal. Tampoco se ha demostrado si el presunto ritmo de MAO podría condicionar el ritmo del contenido de 5-HT y la producción de melatonina.

En nuestro trabajo hemos observado un claro ritmo diario en el contenido de 5-HIAA pineal, que muestra altos niveles diurnos y bajos nocturnos. Este ritmo está correlacionado directamente con el contenido de 5-HT, e inversamente con los niveles de NAS y melatonina. Todo ello indica que existe una importante oxidación de 5-HT de forma continuada a lo largo del ciclo de 24 horas y que los niveles de 5-HIAA que se forman no dependen de variaciones en la actividad

MAO, sino de la disponibilidad de 5-HT. La caída nocturna de este indol, debido a su transformación en melatonina, redonda en una caída paralela en la formación de 5-HIAA. Estos datos están de acuerdo con los mostrados previamente por Mefford et al. (1983) en la rata y por Miguez et al. (1995a, 1996a) en hámsters. Todo ello permite concluir que existe una relación metabólica estricta y recíproca entre las rutas de N-acetilación y oxidación de 5-HT pineal, de forma que son fundamentalmente las variaciones de la actividad AANAT las que provocan cambios simultáneos e inversos en los niveles de los derivados indólicos que se forman en ambas rutas pineales.

En la mayor parte de los mamíferos estudiados, el aumento de la síntesis nocturna de melatonina es precedido por la liberación de NA desde las fibras nerviosas simpáticas que inervan la glándula pineal (Moore y Klein, 1974; Drijfhout et al., 1993). En la rata, se ha demostrado un ritmo en el contenido de NA pineal con niveles más elevados durante la noche que durante el día (Brownstein y Axelrod, 1974; Fujiwara et al., 1980; Saavedra et al., 1973). Nuestros datos confirman la existencia de dicho ritmo diario, aunque con algunas particularidades dado que los niveles mínimos de NA se detectaron al inicio de la noche y fueron seguidos por una reactivación que llevó a alcanzar el máximo nivel en la parte final de la noche. La razón de este descenso nocturno de NA pineal es desconocida. No obstante, estudios de microdiálisis han demostrado que existe una fuerte liberación de este neurotransmisor desde los primeros momentos de la noche, la cual podría reducir su contenido intracelular (Drijfhout et al., 1993, 1996c). En todo caso, no hay trabajos que demuestren específicamente una relación entre síntesis, almacenaje a nivel de las terminales neuronales y liberación al medio extracelular de NA en la glándula pineal. Los elevados niveles de DA durante la noche hallados en el presente trabajo, apuntan a una mayor síntesis catecolaminérgica como consecuencia de la alta actividad neuronal simpática nocturna, lo que concuerda con estudios en la rata (Craft et al., 1984; Hernández et al., 1994). La falta de correlación entre las variaciones diarias de DA y NA, sugieren que pueda existir algún tipo de almacenamiento de NA en las terminales nerviosas, lo que podría enmascarar el efecto que sobre su contenido tendría una mayor liberación a la noche.

Nuestros datos indican la existencia de un claro ritmo diario del contenido de DA en la glándula pineal de la rata y concuerdan plenamente con los presentados por otros autores en diferentes especies de roedores (Fujiwara et al., 1980; Hermes et al., 1994; Míguez et al., 1995a, 1996a). Todo ello sugiere que la DA, actuando como neurotransmisor, podría jugar un papel en la síntesis de melatonina pineal. En esta misma dirección apuntan algunos estudios que han demostrado que la DA puede regular la actividad AANAT y la síntesis de melatonina *in vitro* (Govitrapong et al., 1989a), así como también la existencia de receptores dopaminérgicos de los subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> que han sido puestos de manifiesto en pineales bovinas (Govitrapong et al., 1984; Simonneaux et al., 1991). Por último, Rey et al. (2001) muestran que la DA puede interactuar con receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 para inducir señales de Ca<sup>++</sup> intracelular en la pineal de la rata. Es evidente, por tanto, que todos estos datos refuerzan la consideración de la DA como un neurotransmisor pineal, aunque se desconoce su posible papel fisiológico.

En suma, los datos obtenidos midiendo los ritmos diarios del contenido de diversos indoles y metoxindoles pineales resaltan el papel central de la 5-HT en la actividad rítmica pineal. El elevado contenido de esta amina ha sido considerado como un almacén de sustrato para la síntesis de melatonina, hecho que es avalado porque su ritmo diario es claramente opuesto al de melatonina. Sin embargo, esta podría no ser solo su función dado que durante las transiciones luz/oscuridad y oscuridad/luz no existe una buena correlación entre el contenido de ambos compuestos. Los resultados obtenidos descartan que el uso de 5-HT en rutas metabólicas de no N-acetilación, tales como la oxidación o la metilación, sea causante de tales discrepancias, y apuntan a que otros procesos, tales como la liberación de 5-HT al medio extracelular, puedan jugar algún papel regulando el contenido intrapinealocitarios de 5-HT. En este sentido, los resultados también resaltan la importancia que podría tener la síntesis de 5-HT como un factor de regulación de la disponibilidad de 5-HT para la formación de melatonina durante la noche. Este hecho será discutido a continuación.

## **2. Papel de la síntesis y disponibilidad citoplasmática de serotonina pineal en la producción rítmica diaria de melatonina**

A nivel celular, la 5-HT pineal se encuentra localizada en los pinealocitos, donde es sintetizada, y en las terminaciones adrenérgicas que los inervan donde podría ser almacenada y presumiblemente catabolizada por la MAO (King y Steinlechner, 1985). En pinealocitos de bovinos también se ha descrito la presencia de transportadores de 5-HT que podrían tener algún papel en el intercambio entre las terminales nerviosas y los pinealocitos (Ducis y Stephano, 1980), hecho que también ha sido constatado en pineales de rata *in vitro* (Míguez et al., 1995c). En cuanto a la 5-HT pinealocitaria, los escasos estudios existentes apuntan a que se encuentra mayoritariamente almacenada dentro de vesículas que se han localizado en extensiones de los pinealocitos (Hayashi et al., 1999). También se han localizado transportadores vesiculares de 5-HT del tipo 1, que podrían tener un papel en la regulación de los niveles vesiculares/citoplasmáticos de 5-HT (Hayashi et al., 1999). Evidentemente todos estos mecanismos van a contribuir a regular los niveles de 5-HT de los pinealocitos y su uso en la producción de melatonina.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento 1 y los datos existentes en la bibliografía, hemos orientado el segundo trabajo de la tesis doctoral a profundizar en el papel que puede tener disponibilidad pinealocitaria de 5-HT en la capacidad de la glándula para sintetizar cantidades apropiadas de melatonina durante el día y la noche. Así, los resultados demuestran que la administración de benserazida, un inhibidor de la enzima LAAD, resulta en un aumento de los niveles de 5-HTP y descenso en el contenido de 5-HT, NAS y melatonina, tanto de día como de noche. Estos datos están de acuerdo con los encontrados a nivel de la melatonina plasmática por Ho y Smith (1982) que también aplicaron benserazida en la rata. Asimismo, los resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos tras la administración de p-clorofenil-alanina (pCPA), un inhibidor de la TP-OH (Deguchi y Barchas, 1972; Niles et al., 1984; Nonaka y Reiter, 1990; King et al., 1994) que resulta en un reducido contenido de 5-HT y de melatonina en la pineal.

King et al. (1984b) comparando el efecto de pCPA en ratas normales y en ratas denervadas por extracción quirúrgica del ganglio cervical superior, mostraron que la reducción del contenido de 5-HT pineal por pCPA era mayor en ratas denervadas que en ratas intactas, sugiriendo que gran parte de la 5-HT que era afectada por el tratamiento estaba contenida en los pinealocitos. Además, estos autores demostraron que la estimulación del tratamiento con pCPA reducía fuertemente el efecto estimulador del ISO sobre la síntesis de melatonina pineal en las ratas intactas, mientras que lo anulaba totalmente en las ratas denervadas. Por otra parte, Míguez et al. (1997b) utilizando pinealocitos de rata en cultivo demostraron que la incubación con pCPA reducía fuertemente en contenido intracelular y la liberación de 5-HT. En estas condiciones, el efecto estimulador de ISO sobre la liberación de melatonina también era reducido por el tratamiento con pCPA. Nuestros datos actuales concuerdan plenamente con estos estudios y demuestran, además, que el mantenimiento de la síntesis de 5-HT de forma continuada es un proceso importante para asegurar la adecuada producción de melatonina. Este hecho es especialmente evidente durante el día, dado que la benserazida, al reducir la cantidad de 5-HT presente en la pineal, anuló prácticamente la síntesis basal de melatonina. Durante la noche, la benserazida redujo el contenido de 5-HT pineal en similar grado a lo observado durante el día, y también redujo el contenido de melatonina, pero en un porcentaje menor que lo observado durante el día. Cabe destacar también que los efectos de la benserazida sobre la producción de melatonina no fueron mediados por cambios en la actividad AANAT ni de día ni de noche.

Con estos resultados, se pueden extraer las siguientes conclusiones: *i)* en la pineal de rata existe un almacén pinealocitario de 5-HT que es fácilmente reducido por la inhibición de la síntesis de esta amina, tanto de día como de noche. Ello sugiere que el *turnover* de 5-HT pineal es muy rápido y solo una elevada síntesis de 5-HT permite asegurar un nivel estable, aunque transitorio, de la amina; *ii)* la dinámica de uso de 5-HT pineal es notoriamente diferente durante el día y la noche, como probablemente lo sea también la disponibilidad de la amina para su uso en diferentes rutas metabólicas. Durante el día, esta disponibilidad condiciona totalmente los niveles basales de melatonina que son producidos en la glándula pineal, de forma que la inhibición de la síntesis *de novo* de 5-HT anula prácticamente la producción de melatonina. Durante la noche, sin embargo, el bloqueo farmacológico de la síntesis de 5-HT pineal

afecta en menor grado a la producción de melatonina, lo que podría significar que existe un *pool* de 5-HT citoplasmático fácilmente movilizable que no es afectado por la síntesis *de novo* de 5-HT, pero que resulta ser fundamental para la producción rápida de melatonina. En este sentido, los datos permiten especular con que la 5-HT pinealocitaria se encuentra ligada, almacenada o de alguna manera que dificulta su inminente uso metabólico. Con un apropiado estímulo fisiológico, por ejemplo la activación adrenérgica pineal nocturna, se produce un desligamiento de esa 5-HT que pasa a estar disponible para su uso por la elevada cantidad de AANAT presente en los pinealocitos. En estos cambios, sin embargo, permanece incierto que papel jugarían los niveles de 5-HT que podrían estar almacenados en las terminaciones adrenérgicas pineales.

La administración de benserazida también provocó una fuerte reducción en la concentración pineal de 5-HIAA tanto de día como de noche. En ambos casos se observó una elevada correlación entre los cambios que provocó el fármaco en los niveles de 5-HT y en los de 5-HIAA, lo que apoya las conclusiones extraídas en el trabajo 1 acerca de las relaciones entre estos dos indoles. Dado que la MAO es una enzima mitocondrial, su acción sobre la 5-HT va a estar dirigida sobre la forma que permanece libre en el citoplasma, es decir sobre la misma que también será utilizada por la AANAT para formar melatonina. Los datos mostrados en este experimento apuntan a que hay un uso prioritario de la 5-HT para formar NAS, dado que durante la noche, los animales tratados con benserazida mantienen unos niveles relativamente elevados de NAS y melatonina (aunque menores que los controles), pero con un contenido mínimo de 5-HIAA. De alguna manera se podría decir que se preserva la función de síntesis de melatonina, favoreciendo la accesibilidad de la 5-HT como sustrato para la enzima AANAT en detrimento de la MAO. Ello podría ser debido a la simple localización espacial de los enzimas (AANAT en citoplasma; MAO en mitocondrias) en relación al mismo sustrato sobre el que actúan, o bien a que estos enzimas podrían actuar de forma paralela sobre otros sustratos y ello condicionara, en parte, su capacidad para transformar la 5-HT disponible.

Los datos obtenidos con la administración diurna y nocturna de benserazida se complementaron con aquellos derivados del experimento en que se administró conjuntamente benserazida e ISO. Es bien conocido que el agonista adrenérgico

ISO produce una fuerte estimulación de la producción de melatonina pineal debido a la activación de los receptores postsinápticos  $\beta$ -adrenérgicos y, en menor grado, los  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Klein et al., 1983). De acuerdo con ello, nuestros datos mostraron un fuerte efecto dosis-dependiente del ISO sobre los niveles de NAS y melatonina, en paralelo al incremento de la actividad AANAT pineal. Este hecho refleja claramente que la activación de la AANAT por mecanismos adrenérgico-dependientes es clave para lograr el incremento nocturno de melatonina. Asimismo, el bloqueo con benserazida de la LAAD en animales tratados con ISO provocó un fuerte aumento dosis-dependiente del contenido de 5-HTP, a la vez que redujo los niveles de 5-HT y 5-HIAA. Estos efectos fueron comparables a los que produjo la benserazida durante el día en animales no estimulados con ISO. En paralelo, la administración conjunta de benserazida e ISO dio lugar a una fuerte caída en los niveles de NAS y melatonina pineales en relación a los animales que solo recibieron ISO, siendo la caída de la NAS mayor (en porcentaje) en los animales que recibieron la dosis más elevada de ISO, mientras que el efecto sobre la melatonina fue similar con ambas dosis de ISO. Estos datos reflejan el gran efecto que la limitación de la disponibilidad de 5-HT tiene sobre la formación de NAS mediante la enzima AANAT, particularmente cuando hay una gran demanda de 5-HT para cubrir la elevada actividad del enzima. En circunstancias en las que esa disponibilidad de 5-HT está limitada, por ejemplo tras la inhibición farmacológica de la síntesis, tiene lugar una menor formación de melatonina en los pinealocitos.

En mamíferos existen abundantes datos que demuestran que se produce un incremento de la actividad TP-OH a la noche, medida por la estimulación fisiológica nocturna y/o farmacológica de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos pineales, (Ehret et al., 1991; Trabajo 1). Recientes estudios han indicado que dicha estimulación ocurre sobre la isoforma TP-OH 1 (Huang et al., 2008) que es mucho más abundante en la pineal que la TP-OH 2 (Sugden, 2003). La activación nocturna de la enzima requiere del aumento de los niveles de AMPc intracelular promovido por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, lo que conlleva activación de una proteína-quinasa que fosforila la TP-OH 1. Además, la estimulación  $\beta$ -adrenérgica nocturna promueve un aumento de la expresión génica y de los niveles de TP-OH 1 (Privat et al., 2002; Sugden, 2003). Como complemento a este conocimiento, nuestros datos demuestran que, tanto en

condiciones basales como tras estimulación adrenérgica pineal, se requiere una elevada actividad de la TP-OH para mantener los niveles intracelulares de 5-HT en una forma utilizable (probablemente como 5-HT libre citosólica) para formar melatonina. Por tanto, podemos concluir que la disponibilidad de 5-HT pineal resulta del equilibrio entre su síntesis (mediada por la TP-OH) y su uso en las diferentes rutas metabólicas, principalmente oxidación –durante el día- y acetilación –durante la noche-. Es posible también que una parte de dicha 5-HT sea liberada al medio extracelular (Sun et al., 2002; ver también Trabajo 3) y que ello contribuya a reducir el *pool* celular de 5-HT libre, haciendo todavía más importante la necesidad de un aporte inmediato proporcionado por la nueva síntesis de la amina.

Es evidente, por tanto, que si bien la utilización de 5-HT es importante a la hora condicionar los niveles y la disponibilidad intracelular de la amina, no es menos importante el papel que tiene la síntesis de nueva 5-HT a partir del aminoácido L-Trp. Por ello, en la segunda parte de trabajo 2 hemos investigado el efecto de la administración diurna y nocturna de L-trp sobre la síntesis de 5-HT y melatonina pineal. Se ha demostrado que la aplicación de L-Trp durante el día resulta en un aumento dosis-dependiente del contenido de 5-HTP, 5-HT y 5-HIAA pineales. En el caso de la 5-HT, la dosis mayor de L-Trp produjo un aumento de 2.5 veces (con respecto al grupo control) en sus niveles, lo que tuvo un fiel reflejo en un aumento similar del 5-HIAA durante las 3 horas posteriores al tratamiento, pero decayeron a las 6 horas alcanzando el valor de los controles. También se observó un aumento mantenido durante las 6 horas del nivel de NAS y de melatonina con la dosis mayor de L-Trp, sin que ello implicase un cambio en la actividad AANAT pineal. Las dosis de 50 mg/kg de L-Trp indujeron aumentos menores en todos los derivados indólicos que solo puntualmente alcanzaron significación estadística.

Los resultados obtenidos durante la noche tras la administración de L-Trp con respecto a los niveles de 5-HT y 5-HIAA fueron similares a los hallados durante el día, con la salvedad de que los valores de ambos compuestos en los animales control ya tendieron a caer paulatimamente a las tres y seis horas debido al incremento nocturno en la formación de melatonina. En todo caso, 3 horas después del tratamiento con la dosis más elevada de L-Trp se observaron

mayores niveles de 5-HT y 5-HIAA que en el control, hecho que ya no se encontró a las 6 horas (mitad de la noche). No obstante, y a diferencia de lo hallado durante el día, no se observaron cambios significativos en el contenido de NAS y melatonina pineal en los animales tratados con L-Trp, aunque si hubo una tendencia al aumento, particularmente en el contenido de melatonina. El tratamiento con L-Trp tampoco afectó a los valores de actividad AANAT nocturna.

Todos estos datos indican que la síntesis de 5-HT pineal es fácilmente modulable por los niveles intracelulares de L-triptófano, probablemente debido a la elevada tasa de hidroxilación del mismo y la no saturación del enzima TP-OH por el sustrato (Sugden et al., 1985). Además, se pone claramente de manifiesto que, durante el día y con una baja actividad AANAT, un aumento de la disponibilidad de 5-HT inducido por la activación de su síntesis (debido al aumento de los niveles de L-Trp pinealocitario) redundaba de inmediato en un aumento de la síntesis de melatonina. De noche, sin embargo, el aumento de la disponibilidad de 5-HT tras la administración de L-Trp, no tiene un claro efecto de aumento de la producción de melatonina. Esto probablemente indica que de noche existe un control más estricto de la actividad AANAT, o bien que la elevada actividad de este enzima no es suficiente para transformar de forma inmediata toda la 5-HT formada. Por tanto, en esta situación sería esperable que una buena parte de la 5-HT sintetizada *de novo* a la noche fuese almacenada en el citoplasma (libre o ligada) o pudiese ser secretada desde la célula al medio extracelular (se discutirá más adelante).

Trabajos recientes han demostrado la existencia de un transporte de alta afinidad de L-Trp en los pinealocitos de rata, el cual no es afectado por otros aminoácidos neutros, pero si por fenilalanina y tirosina (Gutiérrez et al., 2003). Estos autores sugirieron que el transporte del aminoácido es mayor durante el día que a la noche, y aumenta en situaciones en las que la disponibilidad de 5-HT pineal está reducida (ej, tras pCPA). También en ratas se ha observado un ritmo del contenido de L-Trp en la pineal, con niveles más elevados de día que durante la noche (Young y Anderson, 1982), de forma similar a lo que ocurre con el contenido plasmático del aminoácido (Redfern y Martin, 1985). A pesar de ello, no existen evidencias claras de que la disponibilidad de L-Trp pueda ser una

limitación para la formación de melatonina pineal, aunque Zimmerman et al. (1993) han mostrado que una dieta sin L-Trp reduce la producción de melatonina en humanos.

Diversos trabajos demostraron que la administración de L-Trp por diferentes vías (i.p., i.v.) induce un aumento del contenido de Trp, 5-HT y 5-HIAA pineal (Young y Anderson, 1982; Reiter et al., 1990), en la misma línea que lo mostrado en nuestro trabajo. Con respecto a la melatonina, los datos existentes son mucho menos concordantes. Así, la administración de L-Trp y de 5-HTP resultó en aumentos de la melatonina circulante en la rata (Ferreti et al., 1990; Huether et al., 1993; Yaga et al., 1993), el pollo (Huether et al., 1992) y en el humano (Hajak et al., 1991), pero no está claro si este efecto se debe a una mayor producción de la hormona en la pineal o a una posible participación de fuentes extrapineales. En este sentido, Yaga et al., (1993) demostraron que el aumento plasmático de melatonina tras administración de L-Trp se mantenía en ratas pinalectomizadas, apuntando a un posible origen intestinal para dicha melatonina. Con respecto a la glándula pineal, los datos del efecto de la administración de L-Trp también son contradictorios. Así, se han hallado aumentos de pequeña entidad en los niveles de melatonina tras la administración de L-Trp (Young y Anderson, 1982) o de 5-HTP (Ferreti et al., 1990), mientras que en otros casos no se obtuvieron efectos significativos (Ferreti et al., 1990), e incluso se ha descrito un efecto inhibitorio sobre la síntesis de melatonina mediado por un descenso de la actividad AANAT (Reiter et al., 1990).

Los datos presentes ponen claramente de manifiesto que, al margen de potenciales efectos a nivel extrapineal, la administración de L-Trp redundo en un efecto estimulador de la producción de melatonina pineal durante el día, sugiriendo de nuevo que, en estas circunstancias, la disponibilidad de 5-HT podría ser un factor limitante de la formación de melatonina. Por otra parte, durante la noche no se evidencia dicho efecto estimulador del triptófano, a pesar del fuerte aumento de concentración de 5-HT pineal. Por otro lado, los hallazgos indican que los efectos del L-Trp tienen lugar sin alteración alguna de la transmisión adrenérgica pineal, dado que ni de día ni de noche, se produjeron alteraciones en los niveles de NA/DA, ni en la actividad AANAT que podría

resultar afectada si dichos cambios tuviesen lugar. Todo ello refuerza la idea de que la disponibilidad de sustrato utilizable por la AANAT podría ser un factor que contribuyese a limitar la síntesis de melatonina en la glándula pineal de la rata, particularmente durante el día.

### **3. Monitorización de la liberación de compuestos pineales: aplicación de las técnicas de microdiálisis pineal en la rata en libre movimiento**

Uno de los aspectos que más llama la atención de la glándula pineal es la ritmicidad que presenta la producción de melatonina, así como las relaciones temporales de este compuesto con los diversos indoles relacionados con su ruta de síntesis (Trabajo 1). Sin embargo, la mayoría de los estudios que describen los ritmos pineales, así como los mecanismos reguladores de los mismos, han sido llevados a cabo midiendo el contenido de los compuestos en tejido *post mortem*, en ensayos de cultivos de pinealocitos y en muestras de plasma, sin tener en cuenta que la dinámica metabólica y funcional de los diferentes compuestos puede estar afectada por factores que modifiquen temporal y/o espacialmente sus contenidos. Entre estos factores cabría citar: *i)* las propiedades químicas de cada compuesto que favorecen o impiden en mayor o menor grado su difusión a través de la membrana, *ii)* la existencia de almacenes celulares específicos (vesiculares, uniones a proteínas, etc), *iii)* la acción simultánea de enzimas sobre un mismo sustrato, *iv)* la tasa de metabolización intracelular, *v)* los procesos de secreción a través de las membranas celulares, etc. Dado que la glándula pineal tiene una función eminentemente secretora, particularmente de melatonina, es importante utilizar técnicas que permitan monitorizar en continuo dicho proceso y como este puede ser afectado por la regulación metabólica y neuronal propia de la glándula.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el primer trabajo de esta tesis nos han mostrado que a pesar de que el fuerte aumento nocturno de melatonina parece condicionar fuertemente las fluctuaciones de todos los demás indoles y derivados indólicos pineales, no existe una estricta relación temporal ni estequiométrica entre ellos. Como aspecto más llamativo está el hecho de que el descenso inmediato al inicio de la noche de la concentración de 5-HT en la glándula pineal no se acompaña de un aumento simultáneo del contenido de

melatonina, sino que este tiene lugar con un cierto retraso. Existen datos previos de que la 5-HT, de forma similar a la melatonina, también es un producto de secreción de la glándula pineal y de que dicho proceso acontece de forma rítmica diaria (Sun et al., 2002). Además, diversos estudios usando perfusión de órganos pineales (Aloyo y Walker, 1987, 1988) y cultivos de pinealocitos (Olcese y Munker, 1994; Míguez et al., 1997b) demostraron que la liberación de 5-HT pineal, al igual que la síntesis de melatonina, es un proceso regulado adrenérgicamente. Por lo tanto, es evidente que existe interés en monitorizar en paralelo la secreción de 5-HT y melatonina pineal a fin de establecer una posible relación fisiológica entre los procesos de síntesis/liberación de ambos compuestos.

En nuestro caso, se ha puesto a punto una técnica de microdiálisis adaptada a la glándula pineal y basada en las clásicas técnicas de microdiálisis cerebral utilizadas en la monitorización de neurotransmisores en animales en libre movimiento. La glándula pineal posee una serie de particularidades anatómicas que han obligado a realizar diversas adaptaciones en la sonda de diálisis. Entre esas particularidades destacan el reducido tamaño de la glándula, así como la existencia de gruesos senos venosos (seno sagital superior y seno transversal) que confluyen recubriendo el órgano pineal y cuya sección podría provocar extravasación con la consiguiente hemorragia y alteración del flujo sanguíneo local. Por ello, la sonda ha sido desarrollada específicamente en nuestro laboratorio y su ventaja reside en la forma de L de su cánula central, lo que permite que mediante una inserción lateral y hemicerebral, se pueda alcanzar la glándula pineal con relativa facilidad y seguridad. Con este procedimiento, y las técnicas de HPLC descritas previamente, se ha podido monitorizar de forma continua los niveles extracelulares de 5-HT, 5-HIAA, NAS y melatonina durante dos días consecutivos en la rata en libre movimiento.

Durante los últimos años se han descrito en la bibliografía al menos cuatro procedimientos distintos de microdiálisis aplicados a la glándula pineal de la rata. En el primero de ellos Azekawa et al. (1991) utilizaron una sonda clásica y un procedimiento de inserción vertical que, aparentemente, implica un alto riesgo de dañar los senos venosos con la consiguiente extravasación sanguínea. No obstante, con esta técnica los autores monitorizaron los ritmos de indoles y

melatonina pineal a lo largo de 24 horas. Posteriormente, Drijfhout et al. (1993) promovieron el uso de una sonda transversal que se implanta cruzando los dos hemisferios cerebrales. En su zona media la sonda porta una membrana de diálisis la cual se puede localizar en la glándula pineal. Este procedimiento se mostró particularmente eficaz para tratamientos farmacológicos (Drijfhout et al., 1996b), aunque Barassin et al. (1999) realizaron ligeras modificaciones exitosas a fin de secuenciar en detalle los ritmos de NA y melatonina pineales durante varios días. Más recientemente Sun et al. (2002) desarrollaron una técnica de implantación oblicua (la sonda se implanta ligeramente inclinada desde una zona adyacente a la glándula pineal) altamente eficaz para la monitorización a largo plazo (hasta 7 días) de los niveles de melatonina e indoles pineales. En todos estos casos, los procedimientos descritos implican una amplia variedad de materiales y metodologías en función del laboratorio de origen. En nuestro caso, la técnica utilizada ha permitido obtener resultados muy reproducibles durante los dos primeros días de monitorización, aunque evidenció una fuerte reducción en la recuperación de los compuestos pasado este tiempo, probablemente debido a los procesos de gliosis desarrollados sobre la membrana de diálisis y que suelen provocar su obturación secuencial (Benveniste, 1989). En este sentido nuestra técnica es útil para estudios a corto plazo de la ritmicidad pineal o para aquellos ligados al estudio del efecto a corto plazo de fármacos, pero quizás menos adecuada para investigaciones a largo plazo de la actividad rítmica pineal que las descritas por Barassin et al. (1999) y Sun et al. (2002).

Al margen de las consideraciones técnicas, los resultados obtenidos muestran que los niveles extracelulares de los compuestos pineales medidos (5-HT, 5-HIAA, NAS y melatonina) presentan una elevada variabilidad interindividual (ver Tabla 1 del Trabajo 3), hecho que concuerda plenamente con lo descrito por Barassin et al. (1999) en la rata Wistar. En parte, esta heterogeneidad podría ser atribuida a cuestiones técnicas, fundamentalmente relacionadas con la localización de la sonda en la glándula. De hecho, nuestra experiencia mostró que en aquellos animales en los que la sonda se implantó muy lateralmente (cerca de la superficie de la glándula) los niveles de melatonina y otros indoles pineales eran menores que en aquellos en los que la implantación fue centrada. Por otro lado, conviene tener en cuenta que la glándula pineal es una estructura altamente irrigada por vasos sanguíneos, lo que favorece la obturación de la membrana de diálisis allí implantada, y que la eficacia de esta varíe

aleatoriamente entre animales. Además de estas cuestiones técnicas, Barassin et al. (1999) sugiere que, al menos para la melatonina, la heterogeneidad observada en el patrón de secreción podría sustentarse en razones de variabilidad genética, asumiendo que la síntesis de melatonina en la rata podría estar bajo “control genético”, algo que ya se demostró en la oveja (Zaragoza et al., 1998). Dicho control podría afectar a los componentes del sistema circadiano (oscilador central, vías nerviosas) que median la respuesta fotoperiódica pineal, modulando los intervalos temporales y, con ello, los procesos de regulación nerviosa (liberación de NA de las terminales simpáticas pineales, ritmos de los receptores adrenérgicos, etc.) de la glándula pineal.

La elevada variabilidad interindividual encontrada en nuestro modelo experimental conllevó que los valores obtenidos a lo largo del ciclo día/noche para los compuestos medidos fuesen expresados en porcentaje respecto a los valores respectivos de cada día (niveles basales). De esta manera, se pudo observar una elevada estabilidad de los perfiles rítmicos de los diferentes compuestos en relación a la fase diaria y una buena repetitibilidad dentro del mismo individuo. Así, por ejemplo, en el caso de la melatonina, los principales marcadores temporales (inicio y final del ritmo, amplitud) se mantuvieron relativamente constantes en el mismo individuo y también entre individuos, de forma que el inicio del pico de melatonina (tomado como el momento en que alcanzó el 50% del aumento nocturno) se estableció a los  $104 \pm 8$  min del inicio de la fase de oscuridad, y el descenso del pico aconteció a los  $89 \pm 22$  min antes del encendido de las luces (tomado como el momento en que alcanzó el 50% del descenso nocturno). Estos datos están de acuerdo con los existentes en la bibliografía (Azekawa et al., 1991; Drijfhout et al., 1993; Kanematsu et al., 1994) y demuestran la estabilidad del ritmo de melatonina como marcador de la actividad del reloj circadiano. Estos datos también justifican el uso del registro obtenido durante el primer día como un control del/os tratamiento/s que puedan llevarse a cabo durante el segundo día de monitorización (ver Trabajo 5).

El estudio de las fluctuaciones diarias de los compuestos pineales a nivel extracelular muestra un patrón similar para NAS y melatonina, y otro patrón similar para 5-HT y 5-HIAA. Entre la NAS y la melatonina se observa un fuerte paralelismo que refleja claramente que la transformación de NAS en melatonina

por la HIOMT es inmediata. Esa buena correlación indica también que los niveles de NAS pueden ser considerados como un índice apropiado de la actividad circadiana, tal y como han señalado previamente otros autores (Liu y Borjigin, 2005). A pesar de ello, llama poderosamente la atención la elevada cantidad de NAS presente en el medio extracelular durante la noche, con niveles similares a los de melatonina. Ello sugiere que existe una saturación de la capacidad enzimática de la HIOMT por las elevadas cantidades de NAS formadas a la noche en la glándula pineal, lo que provoca que una parte de esa NAS sea secretada al medio extracelular.

Clásicamente la actividad AANAT ha sido considerada como el paso limitante de la formación de melatonina pineal en mamíferos (Klein y Moore, 1979) lo que explica la elevada coincidencia temporal entre el pico nocturno de AANAT y el de melatonina (Trabajo 1). Asimismo, la actividad AANAT es considerada como el punto metabólico en el que convergen los diferentes estímulos que regulan la producción de melatonina (Klein et al., 1997). Sin embargo, recientes trabajos de Liu y Borjigin et al. (2005) utilizando microdiálisis pineal han expresado dudas acerca de que la AANAT sea un verdadero enzima limitante de dicha ruta metabólica. De manera similar a lo encontrado en el presente trabajo, esos autores muestran que los niveles de NAS formados por acción de la AANAT a la noche sobrepasan ampliamente a la capacidad enzimática de la HIOMT. Por tanto, las fluctuaciones de la actividad AANAT y del contenido de NAS influenciarán muy poco, o nada, la cantidad de producto final (melatonina) formado. De hecho, esos autores postulan que la influencia viene dada en mayor medida por la actividad de la enzima HIOMT, la cual también muestra ligeras variaciones diarias, aunque menores que las de la AANAT (Ribelayga et al., 1999). Nuestros datos apoyan el planteamiento de esos autores y sugieren que el incremento nocturno de la actividad AANAT debe ser considerado como un proceso necesario para la producción nocturna de melatonina, mientras que la HIOMT debe tomarse como el enzima limitante de la amplitud del pico de melatonina. En todo caso, los datos actuales, conjuntamente con los obtenidos en el Trabajo 1, resaltan la importancia que tiene la AANAT en la duración del pico nocturno de melatonina, permitiendo la formación de elevadas cantidades de NAS al inicio de la noche y limitando su producción al final de la noche.

Nuestros estudios también revelan un claro ritmo de 5-HT extracelular con un patrón que podríamos definir como trifásico dado que: *i*) los niveles diurnos son relativamente elevados, pero aumentan todavía más (50-60% sobre los valores de día) durante las 2-3 primeras horas de oscuridad, *ii*) disminuyen a media noche y permanecen bajos durante varias horas, *iii*) inician un aumento aproximadamente una hora antes del comienzo de la fase de luz. Este patrón de 5-HT extracelular concuerda totalmente con el descrito en la rata por Azekawa et al. (1991) y por Sun et al. (2002, 2003). La fluctuación diaria de la 5-HT presentó una elevada correlación positiva con la de 5-HIAA, excepto que los niveles de este metabolito no mostraron claramente un aumento al inicio de la noche. Por otro lado, se observó una correlación inversa de la 5-HT extracelular con melatonina y NAS, también con la nota discordante del aumento puntual de la 5-HT al inicio de la noche, que no tuvo su reflejo en aumentos simultáneos de los niveles de NAS y melatonina. Al contrario, los datos ponen claramente de manifiesto que el incremento brusco y de corta duración de la 5-HT extracelular antecede temporalmente al pico de melatonina (ver grafica 4 del Trabajo 3), de forma que se superpone con la fase de ascenso de sus niveles nocturnos.

Como ya se ha mencionado previamente, la liberación de 5-HT pineal es un proceso activo que *in vitro* es estimulado por NA (Walker y Aloyo, 1985; Aloyo y Walker, 1987; Benson et al., 1989), probablemente a través de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Walker y Aloyo, 1985; Racké et al., 1991). Además, Yamada et al. (2002) indican que la estimulación noradrenérgica de la liberación de 5-HT pinealocitaria es un proceso excitotóxico y  $Ca^{++}$  dependiente, aunque presenta características diferentes de la excitotoxicidad de neurotransmisores desde microvesículas sinápticas. En base a ello, se ha sugerido que la liberación de 5-HT pineal *in vivo* podría ocurrir en respuesta a la estimulación noradrenérgica nocturna de la glándula (Sun et al., 2002; Trabajo 1). Nuestros datos reafirman totalmente la existencia de una importante liberación *in vivo* de 5-HT, la cual se mantiene con niveles elevados durante toda la fase de luz, cuando el contenido de 5-HT intrapineal es también elevado, y niveles bajos en mitad y final de la noche, cuando el contenido de 5-HT intrapineal es muy bajo debido a su utilización masiva para la formación de melatonina. Por tanto, el aumento de la liberación de 5-HT al inicio de la noche, coincidiendo con el comienzo del pico de melatonina, parece ser una clara respuesta al estímulo adrenérgico nocturno que

promueve un rápido aumento de síntesis de 5-HT. Dado que al inicio de la noche la síntesis de melatonina sufre un cierto retardo en relación al aumento de la síntesis de 5-HT, los niveles de 5-HT formados se acumulan momentáneamente en el citoplasma y, al menos una parte, acaba saliendo al espacio extracelular. Así pues, la secreción de 5-HT pineal podría ser concebida como un proceso pasivo de escape de 5-HT, en el que quizás participen transportadores de membrana o secreción vesicular.

La conclusión extraída en este trabajo concuerda totalmente con la formulada por Míguez et al. (1997b) usando pinealocitos en cultivo, quienes observaron que la liberación de 5-HT era estimulada por ISO y anulada por inhibidores de la TP-OH, al igual que lo era la acumulación intracelular de la amina. Además, nuestros datos de microdiálisis también muestran que la estimulación local de la glándula pineal con ISO da lugar a incrementos concentración-dependientes en los niveles de NAS y melatonina, los cuales fueron acompañados por incrementos menores de la liberación de 5-HT y 5-HIAA. Analizando en detalle estas respuestas se observa que la liberación de 5-HT (al igual que la de 5-HIAA) es limitada en el tiempo y antecede al aumento de liberación de melatonina (ver Fig. 13, Trabajo 3). Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos al monitorizar los ritmos diarios de estos compuestos. En ambos casos, el pico de liberación de 5-HT surge como una respuesta pasiva al incremento intracelular del indol debido al incremento de su síntesis inducida por la estimulación adrenérgica. Posteriormente, cuando la producción de melatonina es máxima (un tiempo tras el inicio de la noche o tras la aplicación local de ISO), el exceso de 5-HT acumulado intracelularmente se metaboliza rápidamente por la AANAT, lo que redundará en una disminución de su liberación al espacio extracelular.

Se han formulado diversas hipótesis de un posible papel fisiológico que podría tener la 5-HT extracelular pineal. Por un lado, el hecho de que una parte de la 5-HT contenida en los pinealocitos sea liberada al inicio de la noche y, por tanto, no sea útil para la formación de melatonina, podría indicar que dicha liberación contribuye a limitar el pico nocturno de melatonina. Por otro lado, Sun et al. (2002) demostraron que el ritmo de liberación de 5-HT es endógeno dado que permanece en ratas mantenidas en condiciones de oscuridad constante, en base

a la actividad del oscilador localizado en el NSQ del hipotálamo. Por tanto, como tal señal endógena, la 5-HT extracelular pineal podría jugar un papel en la sincronización del metabolismo de la glándula (Ebadi et al., 1989). Por último, y en relación con lo anterior, se ha demostrado la existencia de receptores de serotonina en la glándula pineal de mamíferos, lo que sustenta que esta amina pueda ejercer una acción de tipo paracrino y/o autocrino. Este aspecto es discutido en detalle a continuación.

#### **4. La serotonina extracelular como potencial mecanismo de regulación de la síntesis de melatonina. Implicación de receptores 5-HT<sub>2</sub> pineales**

Como ya hemos mencionado anteriormente, en la glándula pineal de bovinos se han identificado receptores de serotonina del subtipo 5-HT<sub>2</sub>, los cuales también podrían estar presentes en otros subordenes de mamíferos (Govitrapong, 1984). Sin embargo, no se conoce la existencia de fibras nerviosas serotoninérgicas que alcancen la pineal, por lo que es probable que la activación de dichos receptores pueda tener lugar por medio de la 5-HT liberada localmente desde las propias células pineales (pinealocitos y/o terminaciones noradrenérgicas). En este sentido, diversos estudios con pinealocitos aislados han demostrado un potencial papel de la 5-HT extracelular como modulador de la vía de síntesis de melatonina. Así, se ha observado que la aplicación de 5-HT en el medio de cultivo amplifica el aumento de la actividad AANAT promovida por estimulación  $\beta$ -adrenérgica, resultando en un aumento de la producción de melatonina. Dicho efecto probablemente implique un incremento de la concentración intracelular de AMPc (Olcese y Münker, 1994), y podría estar modulado por activación de receptores 5-HT<sub>2</sub> dado que fue bloqueado por el antagonista ketanserina (Olcese y Münker, 1994; Míguez et al., 1997b).

Recientes trabajos de Steardo et al. (2000) encuentran que la administración i.p de antagonistas de receptores serotonina 5-HT<sub>2</sub> es altamente eficaz para bloquear el incremento nocturno de la actividad AANAT y de los niveles de melatonina en la pineal de ratas inyectadas con ISO. Concretamente estos autores hipotetizan que la posible modulación serotoninérgica de la actividad pineal tiene lugar a través de receptores del subtipo 5-HT<sub>2C</sub>, dada la eficacia de los antagonistas selectivos de dichos receptores (tales como el RS 102221) en

comparación con otros fármacos con mayor afinidad por el subtipo 5-HT<sub>2A</sub>. Sin embargo, el hecho de que los agentes farmacológicos se hayan administrado por vía sistémica (y no localmente en la glándula) no aclara que si la estimulación de dichos receptores pineales pueda tener lugar fisiológicamente por la 5-HT extracelular presente a nivel pineal. Tampoco ofrece una clara visión de las circunstancias en la que dicha modulación ocurre a lo largo del ciclo día/noche.

Con el fin de estudiar en detalle el posible efecto modulador de la 5-HT pineal sobre la producción de melatonina e intentar descifrar el mecanismo receptor que media dicha acción, nuestra investigación se basó en dos procedimientos experimentales distintos: *i)* evaluar el efecto de la administración i.p. de fármacos agonistas y antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> sobre la actividad AANAT y los niveles de melatonina pineales a la noche (Trabajo 4), *ii)* mediante técnicas de microdiálisis pineal, evaluar el efecto de la administración local de antagonistas selectivos de los receptores 5-HT sobre la liberación *in situ* de melatonina en ratas en libre movimiento (Trabajo 5).

Tal y como se muestra en los resultados del Trabajo 4, la administración i.p. al inicio de la noche de ketanserina, un antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> con el casi el doble de afinidad por los receptores 5-HT<sub>2A</sub> que por los 5-HT<sub>2C</sub> (Barnes y Sharp, 1999), provocó un descenso de los niveles de melatonina pineales. Este efecto, aunque no fue significativo, mostró una clara tendencia a ser dosis-dependiente, siendo la dosis de ketanserina 3 mg/kg seguida de un descenso en los niveles de melatonina de alrededor de un 30%. Resultados similares a los obtenidos con la ketanserina fueron observados tras la administración de SDZ-SER 082, un antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub> con baja afinidad por los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Nozulak et al., 1995). Además del efecto sobre la melatonina, los resultados mostraron que ambos antagonistas, ketanserina y SDZ SER 082, inhibieron en un porcentaje próximo al 30% (no significativo frente al grupo control) la actividad AANAT, lo que sugiere que el efecto negativo de ambos fármacos sobre la formación de melatonina se debió a una atenuación del aumento de la actividad AANAT que normalmente tiene lugar en respuesta a la activación noradrenérgica nocturna de la glándula pineal.

En un segundo experimento asociado al trabajo 4, se investigó el efecto de la ketanserina y de SDZ SER 082 en animales tratados simultáneamente con L-Triptófano. En este caso, ambos fármacos inhibieron la producción nocturna de melatonina en comparación con el grupo que recibió solo el L-Trp, hecho que fue más notorio con el SDZ SER 082, el cual también inhibió la actividad AANAT. En base a ello, cabe postular que la acción de bloqueo de los receptores 5-HT<sub>2</sub> pineales tiene mayores consecuencias sobre la síntesis de melatonina cuando los niveles intracelulares (y presumiblemente los extracelulares) de 5-HT están incrementados por la acción estimuladora del L-Trp. Así pues, estos datos refuerzan todavía más la posibilidad de que la 5-HT extracelular participe en la potenciación de la síntesis nocturna de melatonina actuando sobre receptores localizados a nivel pineal.

También hemos comprobado el efecto de dos agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> sobre la producción pineal nocturna de melatonina. Ni la administración de  $\alpha$ -metil-5HT (agonista 5-HT<sub>2</sub> no selectivo), ni de DOI (potente agonista de receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>) produjeron efectos significativos sobre la actividad del enzima AANAT y el contenido de melatonina. Estos datos contrastan con los obtenidos por Steardo et al. (2000) quienes mostraron que tanto la administración de mCPP (agonista 5-HT<sub>2B/C</sub>), como de DOI (a dosis del rango utilizado en nuestro estudio), promovían fuertes aumentos (hasta un 500% vs control) de la síntesis de melatonina mediados por incrementos similares de la actividad AANAT. Además, el efecto de ambos agonistas fue bloqueado por la administración de RS 102221, un potente antagonista de receptores 5-HT<sub>2C</sub>, pero no por ketanserina, postulando estos autores la participación de los receptores 5-HT<sub>2C</sub>, pero no de los 5-HT<sub>2A</sub>, en el efecto modulador de la 5-HT sobre la actividad pineal.

Es evidente, por tanto, que existen fuertes discrepancias entre los datos reflejados en nuestro trabajo y los aportados por Steardo et al. (2000). En el caso del efecto logrado por los antagonistas, nuestros datos no permiten decantarnos claramente por la posibilidad de que los receptores implicados sean de tipo 5-HT<sub>2A</sub> o 5-HT<sub>2C</sub>, dado que, tanto la ketanserina como el SDZ SER 082, produjeron inhibiciones similares en el contenido de melatonina. En el caso de los agonistas 5-HT<sub>2</sub>, en nuestro estudio no hemos observado efecto alguno sobre la síntesis

de melatonina, lo que contrasta profundamente con los observados por esos autores. No obstante, conviene tener en cuenta que la innervación principal de la glándula pineal (y reguladora de la producción de melatonina) es la vía simpática noradrenérgica, mientras que a otros neurotransmisores/ neuromoduladores, como es el caso de la 5-HT, se le pueden asignar papeles secundarios a dicha innervación simpática. En función de ello, no es del todo evidente la explicación de cómo los agonistas serotoninérgicos pueden incrementar la síntesis de melatonina de una manera tan fuerte como la descrita por Steardo et al. (2000). Una posible razón para ello es que dichos fármacos, administrados por vía i.p., ejerzan efectos más allá de la propia pineal, y que ello condicione o enmascare los efectos directos sobre la actividad de la glándula.

Una de las ventajas de las técnicas de microdiálisis pineal es la posibilidad de aplicar tratamientos disueltos en el propio medio de perfusión de la sonda de microdiálisis, de forma que el compuesto en cuestión difunde a través de la membrana y actúa localmente en la región de la que se pretende monitorizar su actividad secretora. Por ello, y en un intento de definir mejor la acción de fármacos serotoninérgicos sobre la actividad pineal, en el Trabajo 5 hemos explorado el efecto de la administración local de ketanserina y SDZ SER sobre los niveles extracelulares de melatonina monitorizados de forma continua mediante microdiálisis pineal. Los resultados obtenidos nos muestran que la ketanserina administrada durante tres horas al principio de la noche provoca una fuerte caída de la producción de melatonina, que se concreta en un descenso en los niveles extracelulares de NAS y de la propia melatonina. Además, la aplicación de ketanserina durante seis horas desde el inicio de la noche produjo efectos similares, con descensos de la liberación de NAS y melatonina, aunque más prolongados en el tiempo, ya que abarcaron la totalidad de la noche.

Los resultados obtenidos con la administración de ketanserina demuestran claramente que el bloqueo farmacológico de los receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> de la glándula pineal resulta en una inhibición de la síntesis de melatonina inducida adrenérgicamente a la noche. La ketanserina no afectó a los niveles de 5-HT extracelulares, indicando que no alteró la producción de 5-HT ni su contenido intrapineal. Por otro lado, los efectos paralelos alcanzados sobre los niveles de NAS y melatonina sugieren que la acción de la ketanserina fue mediada por una

reducción de la actividad AANAT, entendiendo este efecto como una atenuación del incremento nocturno de AANAT que normalmente tiene lugar en la pineal durante la noche. Ello concuerda plenamente con los mostrados en cultivos de pinealocitos en los que se demostró que la ketanserina inhibía la estimulación de la actividad de síntesis de melatonina inducida por NA (Olcese y Münker, 1994) y por ISO (Míguez et al., 1997b). Estos datos también permiten descartar una acción presináptica de la ketanserina sobre las terminaciones simpáticas noradrenérgicas que inervan la glándula pineal, e indican que la acción de la ketanserina debe ser llevada a cabo sobre los pinealocitos donde tiene lugar la síntesis de melatonina.

En un intento de caracterizar mejor el subtipo de receptor responsable de un posible efecto modulador de la 5-HT sobre la actividad pineal, se evaluó el efecto de SDZ SER 082, antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2C</sub>. En este caso, la aplicación local del fármaco mediante la sonda de microdiálisis también tuvo un efecto reductor de la liberación de NAS y melatonina, aunque mucho menor que el promovido por la aplicación de ketanserina. De hecho tras el tratamiento con SDZ SER 082 se alcanzó una inhibición máxima de la liberación de melatonina del 25% con respecto a los valores controles, mientras que un tratamiento similar con ketanserina (durante tres horas al inicio de la noche) inhibió la liberación de la hormona en un 43%.

Estos datos contrastan de nuevo con los obtenidos por Steardo et al. (2000) que resaltaban la importancia de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> dada la eficacia del antagonista selectivo RS 102221 (con gran afinidad por receptores 5-HT<sub>2C</sub>) en comparación con ketanserina (con mayor afinidad por receptores 5-HT<sub>2A</sub>). La mayor especificidad de nuestro estudio utilizando técnicas de microdiálisis y aplicación local de los fármacos, en comparación al llevado a cabo por esos autores utilizando administración i.p. de los fármacos y análisis del contenido pineal, nos permite plantear una vez más la posibilidad de que los agonistas/antagonistas serotoninérgicos administrados sistémicamente puedan ejercer acciones a nivel extrapineal que enmascaren su efecto sobre la propia glándula. En nuestro caso, es evidente además que la administración i.p. de agonistas/antagonistas serotoninérgicos tuvo efecto inhibitorio sobre la síntesis de melatonina (datos ya comentados), pero menor que el hallado por Steardo et

al., (2000). En el caso de los agonistas, su falta de efecto podría deberse a que la estimulación que provocan a nivel pineal no sea suficiente para potenciar la actividad AANAT y la producción de melatonina, procesos estos que ya están incrementados por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica nocturna. En el caso de los antagonistas, su débil efecto tras administración i.p., junto con su fuerte acción inhibitoria observada tras la aplicación local con microdiálisis, parece indicar que poseen un efecto directo y específico a nivel pineal, pero que dicha especificidad es reducida al aplicarlos por vía sistémica. Recientemente se ha descrito que la administración i.p. de agonistas de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> y de agonistas 5-HT<sub>2C</sub>, alteran, la expresión de genes reloj en el NSQ del hipotálamo (Varcoe et al., 2003; Varcoe y Kennaway, 2008) y afectan a los ritmos de excreción de melatonina (Kennaway et al., 1996). Por tanto, es evidente que los resultados obtenidos mediante las técnicas de microdiálisis son más concluyentes que aquellos derivados de la aplicación sistémica, al menos a la hora de describir la implicación de receptores serotoninérgicos en la regulación local de la glándula pineal.

Los resultados basados en evidencias farmacológicas indican claramente una posible función de los receptores 5-HT<sub>2</sub> pineales. Según los datos obtenidos tras la aplicación de ketanserina y SDZ SER 082, parece posible que dichos receptores sean del subtipo 5-HT<sub>2A</sub>, aunque no es descartable una cohabitación con el subtipo 5-HT<sub>2C</sub>. Resulta llamativo el hecho de que cuando la aplicación de ketanserina tuvo lugar a media noche y se prolongó durante toda la segunda mitad de la noche (6 horas) no se obtuvo efecto significativo alguno sobre la liberación de NAS y melatonina, lo que contrasta con el fuerte efecto inhibitor que produce al aplicarse durante las 3-6 primeras horas de la noche. Ello nos permite especular con que la 5-HT liberada en la pineal en respuesta a la estimulación simpática nocturna pueda actuar sobre receptores de membrana de los pinealocitos (e incluso de las terminaciones simpáticas) y estimular el incremento nocturno de la actividad AANAT, resultando en una potenciación de la producción de melatonina. Teniendo en cuenta los resultados del Trabajo 3 en los que se evidencia un aumento de la concentración extracelular de 5-HT en las primeras horas de noche, coincidiendo con el inicio del pico de melatonina, podríamos establecer un papel de la 5-HT extracelular pineal como promotor de la producción de melatonina y una acción autocrina de indudable interés. El

hecho de que el bloqueo de receptores serotoninérgicos con ketanserina solo tenga efectos al inicio de la noche, implicaría la existencia de un periodo de máxima sensibilidad en dicha acción autocrina, que podría sustentarse en factores tiempo-dependientes ligados a los propios receptores o de los mecanismos intracelulares que median dicha respuesta.

Por tanto, los resultados apoyan la posibilidad de que la 5-HT liberada al medio extracelular pineal al inicio de la noche sirva como una señal potenciadora de la producción de melatonina. Dicho efecto sería mediado por receptores 5-HT<sub>2</sub> (presumiblemente del subtipo 5-HT<sub>2A</sub>) y ocurriría principalmente en las primeras horas de la noche promoviendo una mayor activación de la enzima AANAT. El vínculo mecanístico entre la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> y la estimulación de la AANAT no es del todo evidente, aunque es bien sabido que en otros sistemas neuronales los mecanismos de transducción de los receptores 5-HT<sub>2</sub> implican la hidrólisis de fosfoinosítidos y la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares. En mamíferos, se sabe que el Ca<sup>++</sup> intracelular es un segundo mensajero (receptores  $\alpha$ -adrenérgicos) que juega un papel importante potenciando la inducción  $\beta$ -adrenérgica de la síntesis de melatonina en la glándula pineal (Klein et al., 1997). En base a ello, es posible que la información mediada por receptores serotoninérgicos pineales sirva para potenciar las mismas vías intracelulares que median la respuesta adrenérgica que controla la síntesis nocturna de melatonina.

## CONCLUSIONES



1. El contenido de indoles y melatonina en la glándula pineal de la rata presenta fuertes variaciones cíclicas diarias motivadas por el aumento brusco y mantenido de la actividad AANAT durante la noche, la cual responde a la liberación de NA desde las terminales simpáticas que inervan la glándula. El pico nocturno de AANAT es responsable del aumento de síntesis de melatonina, pero también del fuerte descenso de los niveles de 5-HT. Esta amina es utilizada prioritariamente en la vía de N-acetilación durante la noche, en detrimento de su uso oxidativo que predomina durante el día.
2. Se ha demostrado la importancia de una síntesis elevada y continua de 5-HT en el metabolismo y función de la glándula pineal. La inhibición de la síntesis de 5-HT anula la síntesis basal de melatonina durante el día y supone un serio *handicap* para producir unos niveles óptimos de melatonina durante la noche. Dado que la TP-OH pineal duplica su actividad nocturna, podemos considerar a este enzima como un factor clave para mantener unos niveles óptimos de 5-HT, que serán utilizados para formar una cantidad adecuada de melatonina en respuesta a la estimulación adrenérgica de la glándula.
3. La dinámica de uso de la 5-HT pineal es notoriamente diferente durante el día y la noche, como también lo es su disponibilidad citoplasmática para formar melatonina. Durante el día, la disponibilidad de 5-HT está asegurada por su síntesis *de novo*, de forma que si esta se inhibe se reduce la producción de melatonina, y si se estimula, se aumenta la producción de melatonina. Durante la noche, sin embargo, parece existir una movilización de 5-HT desde un *pool* citoplasmático que no estaría tan afectado por la síntesis *de novo*, pero que resultaría fundamental para la disponibilidad rápida de grandes cantidades de melatonina.
4. Mediante una técnica de microdiálisis pineal se ha demostrado la existencia de una liberación continua diaria de serotonina, NAS y melatonina, la cual fue monitorizada durante dos días consecutivos. El contenido extracelular pineal de estos compuestos muestra una elevada

variación interindividual que podría estar en relación con aspectos técnicos o bien con características propias de cada individuo.

5. La cantidad de NAS liberada desde los pinealocitos durante la noche es comparable con la de melatonina, lo que indica que el incremento nocturno de la actividad del enzima AANAT es imprescindible, pero no estrictamente limitante, de la cantidad de melatonina formada. En este sentido, los resultados apoyan que la enzima HIOMT tenga un papel importante limitando la amplitud del pico nocturno de melatonina.
6. Se ha demostrado un aumento de la concentración de 5-HT extracelular pineal al inicio de la noche, coincidiendo con la fase de subida del pico de melatonina. Dicho aumento proviene de una mayor liberación de la 5-HT, la cual está asociada a una elevada síntesis intracelular promovida por la estimulación noradrenérgica de la glándula. El hecho de que al inicio de la noche se asocien aumentos de síntesis, disponibilidad citoplasmática y liberación de 5-HT, junto con un incremento de la síntesis de melatonina, lleva a pensar que existe un vínculo funcional (mas allá del puramente metabólico) entre dichos procesos.
7. La administración de antagonistas serotoninérgicos afecta negativamente a la formación de melatonina pineal. Este efecto es mayor cuando se aplican localmente a través de la sonda de microdiálisis que cuando se administran por vía sistémica, lo que refleja que es mediado por mecanismos locales de la glándula. Se han presentado evidencias de que estos mecanismos involucran receptores del subtipo 5-HT<sub>2A</sub>, aunque no se puede descartar que también participen los receptores del subtipo 5-HT<sub>2C</sub>. El bloqueo farmacológico de estos receptores (particularmente los 5-HT<sub>2A</sub>) reduce fuertemente la secreción nocturna de melatonina.
8. La 5-HT extracelular pineal podría tener un papel modulador de la síntesis de melatonina, el cual parece ser más destacable durante las primeras horas de la noche cuando tiene lugar el aumento de la actividad AANAT. Es probable que los mecanismos intracelulares que median el efecto de la 5-HT extracelular sean comunes a los que participan en la

regulación adrenérgica de la síntesis de melatonina. De esta forma, la activación nocturna de los receptores serotoninérgicos contribuiría a potenciar el aumento de la actividad AANAT y la producción de melatonina pineal durante la noche.



## BIBLIOGRAFÍA



1. Abreu P, Santana C, Hernandez G, Calzadilla CH and Alonso R (1987) Day-night rhythm of rat pineal tyrosine hydroxylase activity as determined by HPLC with amperometric detection. *J Neurochem* **48**:665-668.
2. Adell A and Artigas F (1991) Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo brain microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **343**:237-244.
3. Aloyo VJ and Walker RF (1987) Noradrenergic stimulation of serotonin release from rat pineal glands in vitro. *J Endocrinol* **114**:3-9.
4. Aloyo VJ and Walker RF (1988) Alpha-adrenergic control of serotonin release from rat pineal glands. *Neuroendocrinology* **48**:61-66.
5. Arendt J (1998a) Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* **3**:13-22.
6. Arendt J (1998b) Complex effects of melatonin. *Therapie* **53**:479-488.
7. Arendt J (2006) Does melatonin improve sleep? Efficacy of melatonin. *British Med J* **332**:550.
8. Audinot V, Bonnaud A, Grandcolas L, Rodriguez M, Nagel N, Galizzi JP, Balik A, Messenger S, Hazlerigg DG, Barrett P, Delagrangé P and Boutin JA (2008) Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors. *Biochem Pharmacol* **75**:2007-2019.
9. Axelrod J, Shein HM and Wurtman RJ (1969) Stimulation of C14-melatonin synthesis from C14-tryptophan by noradrenaline in rat pineal in organ culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **62**:544-549.
10. Axelrod J (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* **184**:1341-1348.
11. Azekawa T, Sano A, Sei H and Morita Y (1991) Diurnal changes in pineal extracellular indoles of freely moving rats. *Neurosci Lett* **132**:93-96.
12. Baler R, Covington S and Klein DC (1997) The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem* **272**:6979-6985.
13. Baltaci AK, Mogulkoc R, Bediz CS, Kul A and Ugur A (2003) Pinealectomy and zinc deficiency have opposite effects on thyroid hormones in rats. *Endocr Res* **29**:473-481.
14. Barassin S, Saboureau M, Kalsbeek A, Bothorel B, Vivien-Roels B, Malan A, Buijs RM, Guardiola-Lemaitre B and Pevet P (1999) Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res* **27**:193-201.

## Bibliografía

---

15. Barassin S, Kalsbeek A, Saboureau M, Bothorel B, Vivien-Roels B, Malan A, Buijs RM and Pevet P (2000) Potentiation effect of vasopressin on melatonin secretion as determined by trans-pineal microdialysis in the rat. *J Neuroendocrinol* **12**:61-68.
16. Barnes NM and Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**:1083-1152.
17. Bartol I, Skorupa AL, Scialfa JH and Cipolla-Neto J (1997) Pineal metabolic reaction to retinal photostimulation in ganglionectomized rats. *Brain Res* **744**:77-82.
18. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH and Carlberg C (1994) Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* **269**:28531-28534.
19. Benitez-King G, Rios A, Martinez A and Anton-Tay F (1996) In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* **1290**:191-196.
20. Benson B, Reynolds WD, Burns DM and Leadem CA (1989) Diurnal variation in norepinephrine-stimulated release of pineal serotonin in vitro. *J Neural Transm Gen Sect* **78**:89-101.
21. Benveniste H (1989) Brain microdialysis. *J Neurochem* **52**:1667-1679.
22. Bernard M, Guerlotte J, Cogne M, Greve P, Collin JP and Voisin P (1993) Transcriptional regulation of hydroxyindole O-methyltransferase in the chicken pineal gland: day/night changes and long-term effects of light and darkness. *Biochem J* **290**:661-664.
23. Besancon R, Simonneaux V, Jouvet A, Belin MF and Fevre-Montange M (1996) Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* **40**:136-138.
24. Binkley S, Muller G and Hernandez T (1981) Circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase activity: phase shifting by light pulses (I). *J Neurochem* **37**:798-800.
25. Binkley SA (1983) Circadian rhythms of pineal function in rats. *Endocr Rev* **4**:255-270.
26. Bjorklund A, Owman C and West KA (1972) Peripheral sympathetic innervation and serotonin cells in the habenular region of the rat brain. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **127**:570-579.
27. Block GD and Page TL (1978) Circadian pacemakers in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **1**:19-34.
28. Boden MJ and Kennaway DJ (2006) Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* **132**:379-392.

29. Borjigin J, Wang MM and Snyder SH (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* **378**:783-785.
30. Bradford Thomas K. ZJ, Iuvone PM (1990) Arylalkylamine (serotonin) N-acetyltransferase assay using high-performance liquid chromatography with fluorescence or electrochemical detection of N-acetyltryptamine. *Anal Biochem* **184**:228-234.
31. Brownstein M and Axelrod J (1974) Pineal gland: 24-hour rhythm in norepinephrine turnover. *Science* **184**:163-165.
32. Buda M and Klein DC (1978) A suspension culture of pinealocytes: regulation of N-acetyltransferase activity. *Endocrinology* **103**:1483-1493.
33. Cajal (1904) *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados TII, 2da Parte*. Moya, Madrid.
34. Cardinali DP, Gejman PV and Ritta MN (1983) Further evidence of adrenergic control of translocation and intracellular levels of estrogen receptors in rat pineal gland. *Endocrinology* **112**:492-498.
35. Cardinali DP, Esquifino AI, Arce A, Vara E, Ariznavarreta C and Tresguerres JA (1994) Changes in serum growth hormone and prolactin levels, and in hypothalamic growth hormone-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone and somatostatin content, after superior cervical sympathectomy in rats. *Neuroendocrinology* **59**:42-48.
36. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ and Reiter RJ (2005) A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* **27**:189-200.
37. Carter DS and Goldman BD (1983) Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* **113**:1261-1267.
38. Cassone VM, Roberts MH and Moore RY (1987) Melatonin inhibits metabolic activity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neurosci Lett* **81**:29-34.
39. Ceinos RM, Chansard M, Revel F, Calgari C, Miguez JM and Simonneaux V (2004) Analysis of adrenergic regulation of melatonin synthesis in Siberian hamster pineal emphasizes the role of HIOMT. *Neurosignals* **13**:308-317.
40. Champney TH, Holtorf AP, Steger RW and Reiter RJ (1984) Concurrent determination of enzymatic activities and substrate concentrations in the melatonin synthetic pathway within the same rat pineal gland. *J Neurosci Res* **11**:59-66.
41. Chik CL and Ho AK (1989) Multiple receptor regulation of cyclic nucleotides in rat pinealocytes. *Prog Biophys Mol Biol* **53**:197-203.

42. Chik CL, Liu QY, Li B, Karpinski E and Ho AK (1995) cGMP inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channel currents through protein phosphorylation in rat pinealocytes. *J Neurosci* **15**:3104-3109.
43. Claustrat B, Geoffriau M, Brun J and Chazot G (1995) Melatonin in humans: a biochemical marker of the circadian clock and an endogenous synchronizer. *Neurophysiol Clin* **25**:351-359.
44. Cos S, Gonzalez A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C and Sanchez-Barcelo EJ (2006) Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev* **30**:118-128.
45. Coto-Montes A, Masson-Pevet M, Pevet P and Moller M (1994) The presence of opioidergic pinealocytes in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*): an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* **278**:483-491.
46. Cozzi B, Mikkelsen JD, Ravault JP and Moller M (1992) Neuropeptide Y (NPY) and C-flanking peptide of NPY in the pineal gland of normal and ganglionectomized sheep. *J Comp Neurol* **316**:238-250.
47. Craft CM, Morgan WW and Reiter RJ (1984) 24-Hour changes in catecholamine synthesis in rat and hamster pineal glands. *Neuroendocrinology* **38**:193-198.
48. Danilenko KV, Plisov IL, Wirz-Justice A and Hebert M (2009) Human retinal light sensitivity and melatonin rhythms following four days in near darkness. *Chronobiol Int* **26**:93-107.
49. David GF and Herbert J (1973) Experimental evidence for a synaptic connection between habenula and pineal ganglion in the ferret. *Brain Res* **64**:327-343.
50. David GF and Kumar TC (1978) Histochemical localization of cholinesterases in the neural tissue of the pineal in the rhesus monkey. *Experientia* **34**:1067-1068.
51. Deguchi T and Axelrod J (1972) Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**:2547-2550.
52. Deguchi T and Barchas J (1972) Effect of p-chlorophenylalanine on tryptophan hydroxylase in rat pineal. *Nat New Biol* **235**:92-93.
53. Di Chiara G (1990) In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci* **11**:116-121.
54. Di Chiara G, Tanda G and Carboni E (1996) Estimation of in-vivo neurotransmitter release by brain microdialysis: the issue of validity. *Behav Pharmacol* **7**:640-657.

55. Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR and Gillette MU (1997) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci* **17**:667-675.
56. Drijfhout WJ, Grol CJ and Westerink BH (1993) Microdialysis of melatonin in the rat pineal gland: methodology and pharmacological applications. *J Neurochem* **61**:936-942.
57. Drijfhout WJ, Homan EJ, Brons HF, Oakley NR, Skingle M, Grol CJ and Westerink BH (1996a) Exogenous melatonin entrains rhythm and reduces amplitude of endogenous melatonin: an in vivo microdialysis study. *J Pineal Res* **20**:24-32.
58. Drijfhout WJ, Grol CJ and Westerink BH (1996b) Parasympathetic inhibition of pineal indole metabolism by prejunctional modulation of noradrenaline release. *Eur J Pharmacol* **308**:117-124.
59. Drijfhout WJ, van der Linde AG, de Vries JB, Grol CJ and Westerink BH (1996c) Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett* **202**:185-188.
60. Drijfhout WJ, van der Linde AG, Kooi SE, Grol CJ and Westerink BH (1996d) Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem* **66**:748-755.
61. Dubocovich ML (1983) Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* **306**:782-784.
62. Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S and Masana MI (1998) Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* **12**:1211-1220.
63. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ and Masana MI (2003) Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* **8**:d1093-1108.
64. Dubocovich ML and Markowska M (2005) Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* **27**:101-110.
65. Dubocovich ML, Hudson RL, Sumaya IC, Masana MI and Manna E (2005) Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res* **39**:113-120.
66. Ducis I and DiStefano V (1980) Characterization of serotonin uptake in isolated bovine pinealocyte suspensions. *Mol Pharmacol* **18**:447-454.
67. Ebadi M (1984) Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology, in *The Pineal Gland* RJReited. (Ed) pp 1-37, Raven Press, New York.

## Bibliografía

---

68. Ebadi M and Govitrapong P (1986) Neural pathways and neurotransmitters affecting melatonin synthesis. *J Neural Transm Suppl* **21**:125-155.
69. Ebadi M, Hexum TD, Pfeiffer RF and Govitrapong P (1989) Pineal and retinal peptides and their receptors, in *In Pineal Research Reviews* (Reiter RJ ed) pp 1-156, Alan R. Liss Inc, New York.
70. Ebels I and Balemans MG (1986) Physiological aspects of pineal functions in mammals. *Physiol Rev* **66**:581-605.
71. Ebling FJ and Barrett P (2008) The regulation of seasonal changes in food intake and body weight. *J Neuroendocrinol* **20**:827-833.
72. Ehret M, Pevet P and Maitre M (1991) Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J Neurochem* **57**:1516-1521.
73. Eranko O, Rechartd L, Eranko L and Cunningham A (1970) Light and electron microscopic histochemical observations on cholinesterase-containing sympathetic nerve fibres in the pineal body of the rat. *Histochem J* **2**:479-489.
74. Faillace MP, Keller Sarmiento MI and Rosenstein RE (1996a) Melatonin effect on the cyclic GMP system in the golden hamster retina. *Brain Res* **711**:112-117.
75. Faillace MP, Sarmiento MI and Rosenstein RE (1996b) Melatonin effect on [3H] glutamate uptake and release in the golden hamster retina. *J Neurochem* **67**:623-628.
76. Falck-Hillarp NA, Thieme G and Torp A (1962) Fluorescence of catecholamines and related compounds with formaldehyde. *J Hystochem Cytochem* **10**:348-354.
77. Falcon J (1999) Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol* **58**:121-162.
78. Ferretti C, Blengio M, Ghi P and Genazzani E (1990) Differential effects of indolepyruvic acid and 5-hydroxytryptophan on indole metabolism in the pineal gland of the rat during the light-dark cycle. *Eur J Pharmacol* **187**:345-356.
79. Finocchiaro LM, Scheucher A, Finkielman S, Nahmod VE and Pirola CJ (1989) Muscarinic effects on the hydroxy- and methoxyindole pathway in the rat pineal gland. *J Endocrinol* **123**:205-211.
80. Foster RG, Timmers AM, Schalken JJ and De Grip WJ (1989) A comparison of some photoreceptor characteristics in the pineal and retina. II. The Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol A* **165**:565-572.

81. Foulkes NS, Borjigin J, Snyder SH and Sassone-Corsi P (1996) Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:14140-14145.
82. Fujieda H, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF and Brown GM (1999) Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience* **93**:793-799.
83. Fujiwara M, Inagaki C, Miwa S, Takaori S, Saeki Y and Nozaki M (1980) Diurnal variation of dopamine content in the rat pineal gland. *Life Sci* **26**:71-78.
84. Gaildrat P and Falcon J (1999) Expression of melatonin receptors and 2-[125I]-iodomelatonin binding sites in the pituitary of a teleost fish. *Adv Exp Med Biol* **460**:61-72.
85. Galzin AM, Eon MT, Esnaud H, Lee CR, Pevet P and Langer SZ (1988) Day-night rhythm of 5-methoxytryptamine biosynthesis in the pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Endocrinol* **118**:389-397.
86. Ganguly S, Coon SL and Klein DC (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* **309**:127-137.
87. Ganguly S, Weller JL, Ho A, Chemineau P, Malpoux B and Klein DC (2005) Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1222-1227.
88. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL and Klein DC (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* **279**:1358-1360.
89. Gibbs FP and Vriend J (1981) The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* **109**:1796-1798.
90. Goldman BD and Darrow JM (1983) The pineal gland and mammalian photoperiodism. *Neuroendocrinology* **37**:386-396.
91. Govitrapong P, Murrin LC and Ebadi M (1984) Characterization of dopaminergic receptor sites in bovine pineal gland. *J Pineal Res* **1**:215-226.
92. Govitrapong P, Hama Y, Pfeiffer R and Ebadi M (1989a) Status of dopamine in bovine pineal glands and the stimulation of N-acetyltransferase activity by D2-dopaminergic receptor agonists in the rat pineal glands in culture. *J Pineal Res* **6**:17-31.
93. Govitrapong P, Phansuwan-Pujito P and Ebadi M (1989b) Studies on the properties of muscarinic cholinergic receptor sites in bovine pineal gland. *Comp Biochem Physiol C* **94**:159-164.

## Bibliografía

---

94. Govitrapong P, Prapapanich V and Ebadi M (1991) Identification of serotonin 5HT<sub>2</sub> receptors in bovine pineal gland. *J Pineal Res* **11**:182-187.
95. Govitrapong P, Pariyanonth M and Ebadi M (1992) The presence and actions of opioid receptors in bovine pineal gland. *J Pineal Res* **13**:124-132.
96. Gray HE and Luttge WG (1983) A putative glucocorticoid receptor in the rat pineal organ. *IRCS Med Sci* **11**:437-439.
97. Guerin MV, Deed JR, Kennaway DJ and Matthews CD (1995) Plasma melatonin in the horse: measurements in natural photoperiod and in acutely extended darkness throughout the year. *J Pineal Res* **19**:7-15.
98. Gupta D, Haldar C, Coeleveld M and Roth J (1993) Ontogeny, circadian rhythm pattern, and hormonal modulation of 5 alpha-dihydrotestosterone receptors in the rat pineal. *Neuroendocrinology* **57**:45-53.
99. Gutierrez CI, Urbina M, Obregion F, Glykys J and Lima L (2003) Characterization of tryptophan high affinity transport system in pinealocytes of the rat. Day-night modulation. *Amino Acids* **25**:95-105.
100. Hajak G, Huether G, Blanke J, Blomer M, Freyer C, Poeggeler B, Reimer A, Rodenbeck A, Schulz-Varaszegi M and Ruther E (1991) The influence of intravenous L-tryptophan on plasma melatonin and sleep in men. *Pharmacopsychiatry* **24**:17-20.
101. Halberg F (1960) Temporal coordination of physiologic function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **25**:289-310.
102. Halberg F and Reinberg A (1967) [Circadian rhythm and low frequency rhythms in human physiology]. *J Physiol (Paris)* **59**:117-200.
103. Hall JC (1990) Genetics of circadian rhythms. *Annu Rev Genet* **24**:659-697.
104. Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU and Mikkelsen JD (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* **17**:2637-2644.
105. Harderland R and Poeggeler B (2003) Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* **34**:233-241.
106. Harumi T and Matsushima S (1998) Indoleamine metabolism in the pineal gland of the Chinese hamster, *Cricetulus griseus*. *Gen Comp Endocrinol* **109**:133-139.
107. Hastings MH (1997) Circadian clocks. *Curr Biol* **7**:R670-672.
108. Hayashi M, Haga M, Yatsushiro S, Yamamoto A and Moriyama Y (1999) Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5-hydroxytryptamine in rat pinealocytes. *J Neurochem* **73**:2538-2545.

109. Hermes B, Hiemke C and Reuss S (1994) Day- and nighttime content of monoamines and their metabolites in the pineal gland of rat and hamster. *Neurosci Lett* **179**:119-122.
110. Hernandez G, Bello AR, Lopez-Coviella I, Abreu P, Fajardo N, Reiter RJ, Hernandez A and Alonso R (1994) Tyrosine hydroxylase activity in peripherally denervated rat pineal gland. *Neurosci Lett* **177**:131-134.
111. Hickey TL and Spear PD (1976) Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Exp Brain Res* **24**:523-529.
112. Ho AK and Smith JA (1982) Effect of benserazide on the levels of pineal 5-hydroxytryptamine, melatonin synthesising enzymes and serum melatonin. *Biochem Pharmacol* **31**:2251-2255.
113. Hofman MA, Skene DJ and Swaab DF (1995) Effect of photoperiod on the diurnal melatonin and 5-methoxytryptophol rhythms in the human pineal gland. *Brain Res* **671**:254-260.
114. Huang Z, Liu T, Chatteraj A, Ahmed S, Wang MM, Deng J, Sun X and Borjigin J (2008) Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *J Pineal Res* **45**:506-514.
115. Huether G, Poeggeler B, Reimer A and George A (1992) 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* **51**:945-953.
116. Huether G, Poeggeler B, Adler L and Ruther E (1993) Effects of indirectly acting 5-HT receptor agonists on circulating melatonin levels in rats. *Eur J Pharmacol* **238**:249-254.
117. Humlova M and Illnerova H (1990) Melatonin entrains the circadian rhythm in the rat pineal N-acetyltransferase activity. *Neuroendocrinology* **52**:196-199.
118. Illnerova H, Vanecek J, Krecek J, Wetterberg L and Saaf J (1979) Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin. *J Neurochem* **32**:673-675.
119. Illnerova H, Vanecek J and Hoffmann K (1983) Regulation of the pineal melatonin concentration in the rat (*Rattus norvegicus*) and in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **74**:155-159.
120. Illnerova H, Hoffmann K and Vanecek J (1984) Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* **38**:226-231.
121. Jin BK, Shin DY, Jeong MY, Gwag MR, Baik HW, Yoon KS, Cho YH, Joo WS, Kim YS and Baik HH (1998) Melatonin protects nigral dopaminergic neurons

- from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) neurotoxicity in rats. *Neurosci Lett* **245**:61-64.
122. Kalsbeek A, Drijfhout WJ, Westerink BH, van Heerikhuizen JJ, van der Woude TP, van der Vliet J and Buijs RM (1996) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin and corticosterone release. *Neuroendocrinology* **63**:69-78.
123. Kalsbeek A, Cutrera RA, Van Heerikhuizen JJ, Van Der Vliet J and Buijs RM (1999) GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* **91**:453-461.
124. Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pevet P and Buijs RM (2000) Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* **12**:3146-3154.
125. Kalsbeek A and Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* **309**:109-118.
126. Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C and Buijs RM (2004) Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci* **24**:7604-7613.
127. Kanematsu N, Mori Y, Hayashi S and Hoshino K (1989) Presence of a distinct 24-hour melatonin rhythm in the ventricular cerebrospinal fluid of the goat. *J Pineal Res* **7**:143-152.
128. Kanematsu N, Honma S, Katsuno Y and Honma K (1994) Immediate response to light of rat pineal melatonin rhythm: analysis by in vivo microdialysis. *Am J Physiol* **266**:R1849-1855.
129. Kappers JA (1960) The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **52**:163-215.
130. Karasek M, Marek K and Kunert-Radek J (1978) Ultrastructure of rat pinealocytes in vitro: influence of gonadotropic hormones and LH-RH. *Cell Tissue Res* **195**:547-556.
131. Kennaway DJ, Rowe SA and Ferguson SA (1996) Serotonin agonists mimic the phase shifting effects of light on the melatonin rhythm in rats. *Brain Res* **737**:301-307.
132. Kim YS, Joo WS, Jin BK, Cho YH, Baik HH and Park CW (1998) Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroreport* **9**:2387-2390.

133. King TS, Steger RW, Steinlechner S and Reiter RJ (1984a) Day-night differences in estimated rates of 5-hydroxytryptamine turnover in the rat pineal gland. *Exp Brain Res* **54**:432-436.
134. King TS, Steinlechner S and Reiter RJ (1984b) Does maximal serotonin N-acetyltransferase activity necessarily reflect maximal melatonin production in the rat pineal gland? *Neurosci Lett* **48**:343-347.
135. King TS and Steinlechner S (1985) Pineal indolalkylamine synthesis and metabolism: kinetic considerations. *Pineal Res Rev* **3**:69-113.
136. Klein DC and Berg GR (1970) Pineal gland: stimulation of melatonin production by norepinephrine involves cyclic AMP-mediated stimulation of N-acetyltransferase. *Adv Biochem Psychopharmacol* **3**:241-263.
137. Klein DC and Weller JL (1970) Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* **169**:1093-1095.
138. Klein DC and Weller JL (1972) Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science* **177**:532-533.
139. Klein DC and Moore RY (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* **174**:245-262.
140. Klein DC, Auerbach DA and Weller JL (1981) Seesaw signal processing in pineal cells: homologous sensitization of adrenergic stimulation of cyclic GMP accompanies homologous desensitization of beta-adrenergic stimulation of cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:4625-4629.
141. Klein DC, Sugden D and Weller JL (1983) Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:599-603.
142. Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* **117**:38-56.
143. Klein DC, Roseboom PH and Coon SL (1996) New light is shining on the melatonin rhythm enzyme The first postcloning view. *Trends Endocrinol Metab* **7**:106-112.
144. Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM and Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* **52**:307-357; discussion 357-308.
145. Korf HW, Sato T and Oksche A (1990) Complex relationships between the pineal organ and the medial habenular nucleus-pretectal region of the mouse as revealed by S-antigen immunocytochemistry. *Cell Tissue Res* **261**:493-500.

## Bibliografía

---

146. Korf HW, Schomerus C, Maronde E and Stehle JH (1996) Signal transduction molecules in the rat pineal organ: Ca<sup>2+</sup>, pCREB, and ICER. *Naturwissenschaften* **83**:535-543.
147. Korf HW, Schomerus C and Stehle JH (1998) The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **146**:1-100.
148. Korf HW and von Gall C (2006) Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol* **252**:57-68.
149. Kramm CM, de Grip WJ and Korf HW (1993) Rod-opsin immunoreaction in the pineal organ of the pigmented mouse does not indicate the presence of a functional photopigment. *Cell Tissue Res* **274**:71-78.
150. Laitinen JT, Vakkuri O and Saavedra JM (1992) Pineal muscarinic phosphoinositide responses: age-associated sensitization, agonist-induced desensitization and increase in melatonin release from cultured pineal glands. *Neuroendocrinology* **55**:492-499.
151. Laitinen JT, Laitinen KS and Kokkola T (1995) Cholinergic signaling in the rat pineal gland. *Cell Mol Neurobiol* **15**:177-192.
152. Lang U, Aubert ML, Conne BS, Bradtke JC and Sizonenko PC (1983) Influence of exogenous melatonin on melatonin secretion and the neuroendocrine reproductive axis of intact male rats during sexual maturation. *Endocrinology* **112**:1578-1584.
153. Launay JM, Lamaitre BJ, Husson HP, Dreux C, Hartmann L and Da Prada M (1982) Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sci* **31**:1487-1494.
154. Lepetit P, Fevre-Montange M, Gay N, Belin MF and Bobillier P (1993) Vasopressin mRNA in the cerebellum and circumventricular organs: a quantitative in situ hybridization study. *Neurosci Lett* **159**:171-174.
155. Lerchl A and Schlatt S (1992) Serotonin content and melatonin production in the pineal gland of the male Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Pineal Res* **12**:128-134.
156. Lin AM, Schaad NC, Schulz PE, Coon SL and Klein DC (1994) Pineal nitric oxide synthase: characteristics, adrenergic regulation and function. *Brain Res* **651**:160-168.
157. Liu B, Poulter L, Neacsu C and Burbach JP (1988) Isolation and identification of vasopressin- and oxytocin-immunoreactive substances from bovine pineal gland. Presence of N alpha-acetyloxytocin. *J Biol Chem* **263**:72-75.
158. Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK and Reppert SM (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* **19**:91-102.

159. Liu T and Borjigin J (2005) N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res* **39**:91-96.
160. Lopez-Figueroa MO and Moller M (1996) Nitric oxide synthase in the pineal gland. *Histol Histopathol* **11**:1089-1100.
161. Lovenberg W, Jequier E and Sjoerdsma A (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* **155**:217-219.
162. Maestroni GJ (1995) T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* **18**:84-89.
163. Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G and Chemineau P (1998) Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* **139**:1508-1516.
164. Masana MI, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul WM, Duckles SP, Dubocovich ML and Krause DN (2002) MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* **302**:1295-1302.
165. Masson-Pevet M and Pevet P (1989) Cytochemical localization of type-A and -B monoamine oxidase in the rat pineal gland. *Cell Tissue Res* **255**:299-305.
166. Masson-Pevet M and Gauer F (1994) Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol Signals* **3**:63-70.
167. Mathes AM, Wolf B and Rensing H (2008) Melatonin receptor antagonist luzindole is a powerful radical scavenger in vitro. *J Pineal Res* **45**:337-338.
168. Matsuura T and Sano Y (1983) distribution of monoamine-containing nerve fibers in the pineal organ of untreated and sympathectomized dogs. Fluorescence- and immunohistochemical studies. *Cell Tissue Res* **234**:519-531.
169. Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM and Rodriguez C (1998a) Inhibition of cell proliferation: a mechanism likely to mediate the prevention of neuronal cell death by melatonin. *J Pineal Res* **25**:12-18.
170. Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM and Rodriguez C (1998b) Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res* **24**:179-192.
171. Maywood ES and Hastings MH (1995) Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* **136**:144-153.

## Bibliografía

---

172. Mazurais D, Brierley I, Anglade I, Drew J, Randall C, Bromage N, Michel D, Kah O and Williams LM (1999) Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J Comp Neurol* **409**:313-324.
173. McArthur AJ, Gillette MU and Prosser RA (1991) Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res* **565**:158-161.
174. McConnell SJ and Ellendorff F (1987) Absence of nocturnal plasma melatonin surge under long and short artificial photoperiods in the domestic sow. *J Pineal Res* **4**:201-210.
175. McNulty JA, Prechel MM and Simmons WH (1986) Correlations of serotonin and its metabolites in individual rat pineal glands over light:dark cycles and after acute light exposure. *Life Sci* **39**:1-6.
176. Mefford IN, Chang P, Klein DC, Namboodiri MA, Sugden D and Barchas J (1983) Reciprocal day/night relationship between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland. *Endocrinology* **113**:1582-1586.
177. Miguez J, Martin F, Miguez I and Aldegunde M (1991) Long-term pinealectomy alters hypothalamic serotonin metabolism in the rat. *J Pineal Res* **11**:75-79.
178. Miguez JM, Martin FJ and Aldegunde M (1994) Effects of single doses and daily melatonin treatments on serotonin metabolism in rat brain regions. *J Pineal Res* **17**:170-176.
179. Miguez JM, Recio J, Vivien-Roels B and Pevet P (1995a) Daily variation in the content of indoleamines, catecholamines and related compounds in the pineal gland of Syrian hamsters kept under long and short photoperiods. *J Pineal Res* **19**:139-148.
180. Miguez JM, Martin FJ and Aldegunde M (1995b) Effects of pinealectomy and melatonin treatments on serotonin uptake and release from synaptosomes of rat hypothalamic regions. *Neurochem Res* **20**:1127-1132.
181. Miguez JM, Simonneaux V and Pevet P (1995c) Evidence for a regulatory role of melatonin on serotonin release and uptake in the pineal gland. *J Neuroendocrinol* **7**:949-956.
182. Miguez JM, Recio J, Vivien-Roels B and Pevet P (1996a) Diurnal changes in the content of indoleamines, catecholamines, and methoxyindoles in the pineal gland of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): effect of photoperiod. *J Pineal Res* **21**:7-14.
183. Miguez JM, Simonneaux V and Pevet P (1996b) Changes in pineal indoleamines in rats after single melatonin injections: evidence for a diurnal sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol* **8**:611-616.

184. Miguez JM, Martin FJ, Lema M and Aldegunde M (1996c) Changes in serotonin level and turnover in discrete hypothalamic nuclei after pinealectomy and melatonin administration to rats. *Neurochem Int* **29**:651-658.
185. Miguez JM, Martin FJ and Aldegunde M (1997a) Melatonin effects on serotonin synthesis and metabolism in the striatum, nucleus accumbens, and dorsal and median raphe nuclei of rats. *Neurochem Res* **22**:87-92.
186. Miguez JM, Simonneaux V and Pevet P (1997b) The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. *J Pineal Res* **23**:63-71.
187. Miguez JM, Martin FJ and Aldegunde M (1998a) Effects of a single melatonin treatment on brain regional serotonin metabolism in the Syrian hamster. *J Physiol Biochem* **54**:51-52.
188. Miguez JM, Recio J, Sanchez-Barcelo E and Aldegunde M (1998b) Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines, and catecholamines in the pineal gland: a comparative study in rat and Syrian hamster. *J Pineal Res* **25**:106-115.
189. Miguez JM, Aldegunde M, Paz-Valinas L, Recio J and Sanchez-Barcelo E (1999) Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J Neural Transm* **106**:1089-1098.
190. Mikkelsen JD and Moller M (1990) A direct neural projection from the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate nucleus to the deep pineal gland of the rat, demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Res* **520**:342-346.
191. Mikkelsen JD, Cozzi B and Moller M (1991) Efferent projections from the lateral geniculate nucleus to the pineal complex of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Cell Tissue Res* **264**:95-102.
192. Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Dekeyne A, Newman-Tancredi A, Pasteau V, Rivet JM and Cussac D (2003) The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **306**:954-964.
193. Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH and Takahashi JS (2004) Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol* **14**:1367-1373.
194. Moller M, Mikkelsen JD, Fahrenkrug J and Korf HW (1985) The presence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like-immunoreactive nerve fibres and VIP-receptors in the pineal gland of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). An immunohistochemical and receptor-autoradiographic study. *Cell Tissue Res* **241**:333-340.

## Bibliografía

---

195. Moller M, Phansuwan-Pujito P, Pramulkijja S, Kotchabhakdi N and Govitrapong P (1994) Innervation of the cat pineal gland by neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers: an experimental immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* **276**:545-550.
196. Moller M and Baeres FM (2002) The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* **309**:139-150.
197. Monnet FP (2002) Melatonin modulates [3h]serotonin release in the rat hippocampus: effects of circadian rhythm. *J Neuroendocrinol* **14**:194-199.
198. Moore RY and Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* **146**:1-14.
199. Moore RY and Klein DC (1974) Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* **71**:17-33.
200. Moore RY and Card JP (1994) Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol* **344**:403-430.
201. Moore RY, Speh JC and Leak RK (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* **309**:89-98.
202. Morin LP (1999) Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med* **31**:12-33.
203. Morton DJ (1987) Hydroxyindole-O-methyltransferase catalyses production of methoxyindoles in rat pineal gland dependent on the concentration of hydroxy precursors and their affinity for the enzyme. *J Endocrinol* **115**:455-458.
204. Niles LP, Brown GM, Chambers JW and Pang SF (1984) Effects of P-chlorophenylalanine on pineal and endocrine function in the rat. *Pharmacol Res Commun* **16**:851-864.
205. Nonaka KO and Reiter RJ (1990) Conversion of tryptophan to serotonin in the mammalian pineal gland: controlling factors, in *Advances in Pineal Research* ((Ed) RR ed), John Libbey, Londres.
206. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangé P, Canet E and Boutin JA (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* **275**:31311-31317.
207. Nozulak J, Kalkman HO, Floersheim P, Hoyer D, Schoeffter P and Buerki HR (1995) (+)-cis-4,5,7a,8,9,10,11,11a-octahydro-7H-10-methylindolo[1,7-bc][2,6]-naphthyridine: a 5-HT<sub>2C/2B</sub> receptor antagonist with low 5-HT<sub>2A</sub> receptor affinity. *J Med Chem* **38**:28-33.

208. Olcese J (1991) Neuropeptide Y: an endogenous inhibitor of norepinephrine-stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. *J Neurochem* **57**:943-947.
209. Olcese J and Munker M (1994) Extracellular serotonin promotes melatonin release from cultured rat pinealocytes: evidence for an S<sub>2</sub>-type receptor-mediated autocrine feedback. *Brain Res* **643**:150-154.
210. Owman C (1965) Localization of neuronal and parenchymal monoamines under normal and experimental conditions in the mammalian pineal gland. *Prog Brain Res* **10**:423-453.
211. Oxenkrug GF, McCauley R, McIntyre IM and Filipowicz C (1985) Selective inhibition of MAO-A but not MAO-B activity increases rat pineal melatonin. *J Neural Transm* **61**:265-270.
212. Palkovits M and Brownstein MJ (1988) Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain, Elsevier, New York, Amsterdam, London, pp223.
213. Pang SF and Brown GM (1983) Regional concentrations of melatonin in the rat brain in the light and dark period. *Life Sci* **33**:1199-1204.
214. Pangerl B, Pangerl A and Reiter RJ (1990) Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect* **81**:17-29.
215. Parent M, Bush D, Rauw G, Master S, Vaccarino F and Baker G (2001) Analysis of amino acids and catecholamines, 5-hydroxytryptamine and their metabolites in brain areas in the rat using in vivo microdialysis. *Methods* **23**:11-20.
216. Park YJ, Park JG, Jeong HB, Takeuchi Y, Kim SJ, Lee YD and Takemura A (2007) Expression of the melatonin receptor Mel(1c) in neural tissues of the reef fish *Siganus guttatus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **147**:103-111.
217. Paz-Valiñas L (2000) In vivo microdialysis of indoleamines and melatonin in the pineal gland: functional relationships, in *Cronobiología 2000*, Strasbourg (France).
218. Paz-Valiñas L, Aldegunde M, Ceinos RM and Míguez JM (2000) Estudio in vivo mediante microdiálisis de la liberación de melatonina e indolaminas en la glándula pineal de la rata, in *III Congreso de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental*, Alicante (España).
219. Paz-Valiñas L, Aldegunde M, Ruibal C and Míguez JM (2001) In vivo microdialysis of indolamines and melatonin in the pineal gland of the rat. Evidence for a role of extracellular serotonin in modulating nocturnal melatonin, in *3<sup>rd</sup> European Conference on Comparative Neurobiology: Modern Views on Brain Homologies*, Murcia (Spain).

## Bibliografía

---

220. Pellegrino LJ, Pellegrino AS and Cushman AJ (1979) A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain, Plenum Press, New York, pp123.
221. Petterborg LJ and Rudeen PK (1989) Effects of daily afternoon melatonin administration on body weight and thyroid hormones in female hamsters. *J Pineal Res* **6**:367-373.
222. Pevet P, Haldar-Misra C and Ocal T (1981) Effect of 5-methoxytryptophan and 5-methoxytryptamine on the reproductive system of the male golden hamster. *J Neural Transm* **51**:303-311.
223. Pevet P (1983) Is 5-methoxytryptamine a pineal hormone? *Psychoneuroendocrinology* **8**:61-73.
224. Pevet P, Masson-Pevet M, Chantegrel J, Marsura A, Luu-Duc C and Claustrat B (1989) Failure of N-(2,4-dinitrophenyl)-5-methoxytryptamine (a putative melatonin antagonist) and of N-(3,5-dinitrophenyl)-5-methoxytryptamine to prevent the effects of injections of melatonin in the late afternoon on testicular activity of the golden hamster. *J Endocrinol* **123**:243-247.
225. Pevet P, Pitrosky B, Vuillez P, Jacob N, Teclemariam-Mesbah R, Kirsch R, Vivien-Roels B, Lakhdar-Ghazal N, Canguilhem B and Masson-Pevet M (1996) The suprachiasmatic nucleus: the biological clock of all seasons. *Prog Brain Res* **111**:369-384.
226. Pevet P, Bothorel B, Slotten H and Saboureau M (2002) The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res* **309**:183-191.
227. Pevet P (2003) Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol* **15**:422-426.
228. Phansuwan-Pujito P, Mikkelsen JD, Govitrapong P and Moller M (1991) A cholinergic innervation of the bovine pineal gland visualized by immunohistochemical detection of choline acetyltransferase-immunoreactive nerve fibers. *Brain Res* **545**:49-58.
229. Pickard GE (1985) Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci Lett* **55**:211-217.
230. Pitrosky B, Kirsch R, Vivien-Roels B, Georg-Bentz I, Canguilhem B and Pevet P (1995) The photoperiodic response in Syrian hamster depends upon a melatonin-driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol* **7**:889-895.
231. Pittendrigh CS (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **25**:159-184.
232. Pittendrigh CS (1972) Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**:2734-2737.

233. Privat K, Brisson C, Jouvet A, Chesneau D, Ravault JP and Fevre-Montange M (2002) Evidence for implication of tryptophan hydroxylase in the regulation of melatonin synthesis in ovine pinealocytes in culture. *Cell Mol Neurobiol* **22**:417-429.
234. Pujito PP, Govitrapong P and Ebadi M (1991) Inhibitory actions of muscarinic cholinergic receptor agonists on serotonin N-acetyltransferase in bovine pineal explants in culture. *Neurochem Res* **16**:885-889.
235. Quay WB (1964) Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* **115**:710-713.
236. Racke K, Sommer M, Burns F and Hering B (1991) Differential effects of electrical stimulation, blockade of neuronal amine uptake and activation of alpha 2-adrenoceptors on the release of endogenous noradrenaline and 5-hydroxytryptamine from the isolated rat pineal gland. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **343**:337-343.
237. Raikhlin NT, Kvetnoy IM and Tolkachev VN (1975) Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* **255**:344-345.
238. Rajaratnam SM, Polymeropoulos MH, Fisher DM, Roth T, Scott C, Birznieks G and Klerman EB (2009) Melatonin agonist tasimelteon (VEC-162) for transient insomnia after sleep-time shift: two randomised controlled multicentre trials. *Lancet* **373**:482-491.
239. Ralph CLO (1980) Melatonin production by extra-pineal tissues, in *Melatonin: current status and perspectives* (Birau N and Schloot W eds) pp 35-46, Pergamos Press, Oxford and New York.
240. Raynaud F and Pevet P (1991) Determination of 5-methoxyindoles in pineal gland and plasma samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* **564**:103-113.
241. Recio J, Pevet P, Miguez JM and Masson-Pevet M (1996a) Melatonin receptors in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of testosterone induced photoreponsive rats. *Neurosci Lett* **214**:53-56.
242. Recio J, Pevet P, Vivien-Roels B, Miguez JM and Masson-Pevet M (1996b) Daily and photoperiodic melatonin binding changes in the suprachiasmatic nuclei, paraventricular thalamic nuclei, and pars tuberalis of the female Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Biol Rhythms* **11**:325-332.
243. Redecker P (1993) Close microtopographical relationships between sympathetic nerve terminals and bulbous process endings of pinealocytes in the pineal gland of the Mongolian gerbil. *J Pineal Res* **15**:199-207.
244. Redfern PH and Martin KF (1985) The effect of antidepressant drugs on 24-hour rhythms of tryptophan metabolism in the rat. *Chronobiol Int* **2**:109-113.

## Bibliografía

---

245. Redman J, Armstrong S and Ng KT (1983) Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* **219**:1089-1091.
246. Reiter RJ (1973) Comparative physiology: pineal gland. *Annu Rev Physiol* **35**:305-328.
247. Reiter RJ (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* **1**:109-131.
248. Reiter RJ, King TS, Steinlechner S, Steger RW and Richardson BA (1990) Tryptophan administration inhibits nocturnal N-acetyltransferase activity and melatonin content in the rat pineal gland. Evidence that serotonin modulates melatonin production via a receptor-mediated mechanism. *Neuroendocrinology* **52**:291-296.
249. Reiter RJ (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* **12**:151-180.
250. Reiter RJ (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* **49**:654-664.
251. Reiter RJ (1996a) Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104**:10-16.
252. Reiter RJ (1996b) Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol* **134**:412-420.
253. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC and Tamura H (2007) Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neurobehavioral damage. *J Physiol Pharmacol* **58 Suppl 6**:5-22.
254. Rensing L and Hardeland R (1990) The cellular mechanism of circadian rhythms--a view on evidence, hypotheses and problems. *Chronobiol Int* **7**:353-370.
255. Reppert SM, Weaver DR and Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* **13**:1177-1185.
256. Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C and Kolakowski LF, Jr. (1995) Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* **15**:1003-1015.
257. Reppert SM (1997) Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* **12**:528-531.
258. Reuss S, Olcese J and Vollrath L (1985) Electrical stimulation of the hypothalamic paraventricular nuclei inhibits pineal melatonin synthesis in male rats. *Neuroendocrinology* **41**:192-196.

259. Reuss S, Schroder B, Schroder H and Maelicke A (1992) Nicotinic cholinceptors in the rat pineal gland as analyzed by western blot, light- and electron microscopy. *Brain Res* **573**:114-118.
260. Reuss S (1996) Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res* **285**:353-378.
261. Rey E, Hernandez-Diaz FJ, Abreu P, Alonso R and Tabares L (2001) Dopamine induces intracellular Ca<sup>2+</sup> signals mediated by alpha1B-adrenoceptors in rat pineal cells. *Eur J Pharmacol* **430**:9-17.
262. Ribelayga C, Pevet P and Simonneaux V (1997) Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res* **777**:247-250.
263. Ribelayga C, Garidou ML, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pevet P and Simonneaux V (1999) Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms* **14**:105-115.
264. Richter HG, Torres-Farfan C, Garcia-Sesnich J, Abarzua-Catalan L, Henriquez MG, Alvarez-Felmer M, Gaete F, Rehren GE and Seron-Ferre M (2008) Rhythmic expression of functional MT1 melatonin receptors in the rat adrenal gland. *Endocrinology* **149**:995-1003.
265. Romijn HJ (1975) Structure and innervation of the pineal gland of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). III. An electron microscopic investigation of the innervation. *Cell Tissue Res* **157**:25-51.
266. Roseboom PH and Klein DC (1995) Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* **47**:439-449.
267. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL and Klein DC (1996) Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* **137**:3033-3045.
268. Rosenstein RE, Chuluyan HE and Cardinali DP (1990) Presynaptic effects of gamma-aminobutyric acid on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. *J Neural Transm Gen Sect* **82**:131-140.
269. Rudeen PK and Reiter RJ (1980) Depression of nocturnal pineal serotonin N-acetyltransferase activity in castrate male rats. *J Neural Transm* **48**:1-8.
270. Saavedra JM, Brownstein M and Axelrod J (1973) A specific and sensitive enzymatic-isotopic microassay for serotonin in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* **186**:508-515.

271. Sack RL, Brandes RW, Kendall AR and Lewy AJ (2000) Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med* **343**:1070-1077.
272. Saez JC, Moreno AP and Spray DC (1994) Norepinephrine induces Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in rat pinealocytes. *J Pineal Res* **16**:57-64.
273. Saper CB, Lu J, Chou TC and Gooley J (2005) The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* **28**:152-157.
274. Schaad NC and Klein DC (1992) Characterization of alpha 2-adrenergic receptors on rat pinealocytes. *Endocrinology* **130**:2804-2810.
275. Schaad NC, Vanecsek J, Rodriguez IR, Klein DC, Holtzclaw L and Russell JT (1995) Vasoactive intestinal peptide elevates pinealocyte intracellular calcium concentrations by enhancing influx: evidence for involvement of a cyclic GMP-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* **47**:923-933.
276. Schenda J and Vollrath L (1997) Nitric oxide inhibits electrically active units in the rat pineal gland. *J Neural Transm* **104**:53-58.
277. Schenda J and Vollrath L (1998a) Modulatory role of acetylcholine in the rat pineal gland. *Neurosci Lett* **254**:13-16.
278. Schenda J and Vollrath L (1998b) Demonstration of action-potential-producing cells in the rat pineal gland in vitro and their regulation by norepinephrine and nitric oxide. *J Comp Physiol [A]* **183**:573-581.
279. Schomerus C and Korf HW (2005) Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci* **1057**:372-383.
280. Schwarzschild MA and Zigmond RE (1991) Effects of peptides of the secretin-glucagon family and cyclic nucleotides on tyrosine hydroxylase activity in sympathetic nerve endings. *J Neurochem* **56**:400-406.
281. Seidel A, Kantarjian A and Vollrath L (1990) A possible role for cyclic guanosine monophosphate in the rat pineal gland. *Neurosci Lett* **110**:227-231.
282. Semm P and Demaine C (1983) Electrical responses to direct and indirect photic stimulation of the pineal gland in the pigeon. *J Neural Transm* **58**:281-289.
283. Sharp T, Zetterstrom T, Series HG, Carlsson A, Grahame-Smith DG and Ungerstedt U (1987) HPLC-EC analysis of catechols and indoles in rat brain dialysates. *Life Sci* **41**:869-872.
284. Shibuya H, Toru M and Watanabe S (1977) A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res* **138**:364-368.
285. Shiotani Y, Yamano M, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S and MacIntyre I (1986) Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and

- neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett* **70**:187-192.
286. Simonneaux V, Murrin LC and Ebadi M (1990a) Characterization of D1 dopamine receptors in the bovine pineal gland with [<sup>3</sup>H]SCH 23390. *J Pharmacol Exp Ther* **253**:214-220.
287. Simonneaux V, Ouichou A, Burbach JP and Pevet P (1990b) Vasopressin and oxytocin modulation of melatonin secretion from rat pineal glands. *Peptides* **11**:1075-1079.
288. Simonneaux V, Ebadi M and Bylund DB (1991) Identification and characterization of alpha 2D-adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol Pharmacol* **40**:235-241.
289. Simonneaux V, Ouichou A and Pevet P (1993) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates melatonin synthesis from rat pineal gland. *Brain Res* **603**:148-152.
290. Simonneaux V, Ouichou A, Craft C and Pevet P (1994) Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. *J Neurochem* **62**:2464-2471.
291. Simonneaux V, Kozak R, Arsenijevic Y and Pevet P (1996) Vasopressin potentiation of the melatonin synthetic pathway via specific V1a receptors in the rat pineal gland. *Regul Pept* **61**:63-69.
292. Simonneaux V, Miguez JM and Pevet P (1997a) Peptidergic modulation of serotonin release from cultured rat pinealocytes. *J Neuroendocrinol* **9**:537-543.
293. Simonneaux V, Vuillez P, Eder U, Miguez JM, Pevet P and Fischer-Colbrie R (1997b) Secretoneurin: a new neuropeptide in the rodent pineal gland. *Cell Tissue Res* **288**:427-434.
294. Simonneaux V and Ribelayga C (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* **55**:325-395.
295. Sitaram BR and Lees GJ (1978) Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem* **31**:1021-1026.
296. Skene DJ, Smith I and Arendt J (1986) Radioimmunoassay of pineal 5-methoxytryptophol in different species: comparison with pineal melatonin content. *J Endocrinol* **110**:177-184.
297. Slotten HA, Pitrosky B, Krekling S and Pevet P (2002) Entrainment of circadian activity rhythms in rats to melatonin administered at T cycles different from 24 hours. *Neurosignals* **11**:73-80.

## Bibliografía

---

298. Snyder SH, Axelrod J and Zweig M (1967) Circadian rhythm in the serotonin content of the rat pineal gland: regulating factors. *J Pharmacol Exp Ther* **158**:206-213.
299. Sparks DL and Little KY (1990) Altered pineal serotonin binding in some suicides. *Psychiatry Res* **32**:19-28.
300. Spessert R, Layes E and Vollrath L (1993) Adrenergic stimulation of cyclic GMP formation requires NO-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase in rat pinealocytes. *J Neurochem* **61**:138-143.
301. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I and Cardinali DP (2008) Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther* **7**:189-203.
302. Stankov B and Reiter RJ (1990) Melatonin receptors: current status, facts, and hypotheses. *Life Sci* **46**:971-982.
303. Stankov B, Cimino M, Marini P, Lucini V, Fraschini F and Clementi F (1993) Identification and functional significance of nicotinic cholinergic receptors in the rat pineal gland. *Neurosci Lett* **156**:131-134.
304. Steardo L, Monteleone P, Trabace L, Cannizzaro C, Maj M and Cuomo V (2000) Serotonergic modulation of rat pineal gland activity: in vivo evidence for a 5-Hydroxytryptamine(2C) receptor involvement. *J Pharmacol Exp Ther* **295**:266-273.
305. Stehle J, Reuss S, Riemann R, Seidel A and Vollrath L (1991) The role of arginine-vasopressin for pineal melatonin synthesis in the rat: involvement of vasopressinergic receptors. *Neurosci Lett* **123**:131-134.
306. Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pevet P and Sassone-Corsi P (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* **365**:314-320.
307. Stehle JH (1995) Pineal gene expression: dawn in a dark matter. *J Pineal Res* **18**:179-190.
308. Steinlechner S, Steger RW, King TS and Reiter RJ (1983) Diurnal variation in the serotonin content and turnover in the pineal gland of the Syrian hamster. *Neurosci Lett* **35**:167-172.
309. Stone BM, Turner C, Mills SL and Nicholson AN (2000) Hypnotic activity of melatonin. *Sleep* **23**:663-669.
310. Sugden D, Namboodiri MA, Klein DC, Pierce JE, Grady R, Jr. and Mefford IN (1985) Ovine pineal alpha 1-adrenoceptors: characterization and evidence for a functional role in the regulation of serum melatonin. *Endocrinology* **116**:1960-1967.

311. Sugden D (1990) 5-Hydroxytryptamine amplifies beta-adrenergic stimulation of N-acetyltransferase activity in rat pinealocytes. *J Neurochem* **55**:1655-1658.
312. Sugden D, Pickering H, Teh MT and Garratt PJ (1997) Melatonin receptor pharmacology: toward subtype specificity. *Biol Cell* **89**:531-537.
313. Sugden D (2003) Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem* **86**:1308-1311.
314. Sun X, Deng J, Liu T and Borjigin J (2002) Circadian 5-HT production regulated by adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:4686-4691.
315. Sun X, Liu T, Deng J and Borjigin J (2003) Long-term in vivo pineal microdialysis. *J Pineal Res* **35**:118-124.
316. Takahashi JS, Kornhauser JM, Koumenis C and Eskin A (1993) Molecular approaches to understanding circadian oscillations. *Ann Rev Physiol* **55**:729-753.
317. Tamarkin L, Hutchison JS and Goldman BD (1976) Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the Syrian hamster. *Endocrinology* **99**:1528-1533.
318. Ting KN, Blaylock NA, Sugden D, Delagrange P, Scalbert E and Wilson VG (1999) Molecular and pharmacological evidence for MT1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br J Pharmacol* **127**:987-995.
319. Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-Garcia P, Vergara M, Forcelledo ML, Valladares LE, Torrealba F, Valenzuela GJ and Seron-Ferre M (2003) mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:450-458.
320. Turek FW (1994) Circadian rhythms. *Recent Prog Horm Res* **49**:43-90.
321. Underwood H and Goldman BD (1987) Vertebrate circadian and photoperiodic systems: role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* **2**:279-315.
322. Ungerstedt U (1997) Microdialysis--a new technique for monitoring local tissue events in the clinic. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* **110**:123.
323. Vacas MI, Lowenstein PR and Cardinali DP (1979) Characterization of a cytosol progesterone receptor in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology* **29**:84-89.
324. Vanecek J, Sugden D, Weller J and Klein DC (1985) Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* **116**:2167-2173.

## Bibliografía

---

325. Vanecek J (1998) Melatonin inhibits release of luteinizing hormone (LH) via decrease of  $[Ca^{2+}]_i$  and cyclic AMP. *Physiol Res* **47**:329-335.
326. Vanecek J and Watanabe K (1998) Melatonin inhibits the increase of cyclic AMP in rat suprachiasmatic neurons induced by vasoactive intestinal peptide. *Neurosci Lett* **252**:21-24.
327. Vansteensel MJ, Michel S and Meijer JH (2008) Organization of cell and tissue circadian pacemakers: a comparison among species. *Brain Res Rev* **58**:18-47.
328. Varcoe TJ, Kennaway DJ and Voultsios A (2003) Activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors acutely induces Per gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus at night. *Brain Res Mol Brain Res* **119**:192-200.
329. Varcoe TJ and Kennaway DJ (2008) Activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors acutely induces Per1 gene expression in the rat SCN in vitro. *Brain Res* **1209**:19-28.
330. Vieira R, Miguez J, Lema M and Aldegunde M (1992) Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem* **205**:300-305.
331. Vivien-Roels B, Pevet P, Masson-Pevet M and Canguilhem B (1992) Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* **86**:239-247.
332. Vivien-Roels B, Pevet P, Zarazaga L, Malpoux B and Chemineau P (1999) Daily and light-at-night induced variations of circulating 5-methoxytryptophol (5-ML) in ewes with respectively high and low nocturnal melatonin secretion. *J Pineal Res* **27**:230-236.
333. Wagner G, Brandstatter R and Hermann A (2000) Adrenergic and cholinergic regulation of in vitro melatonin release during ontogeny in the pineal gland of Long Evans rats. *Neuroendocrinology* **72**:154-161.
334. Walker RF and Aloyo VJ (1985) Norepinephrine stimulates serotonin secretion from rat pineal glands, in vitro. *Brain Res* **343**:188-189.
335. Wang XT, Pappas GD, Sagen J and Unnerstall JR (1996) Cells expressing preproenkephalin mRNA in the rat pineal gland are not serotonin-producing pinealocytes: evidence using in situ hybridization combined with immunocytochemistry for serotonin. *Cell Mol Neurobiol* **16**:73-84.
336. Watanabe K, Yamaoka S and Vanecek J (1998) Melatonin inhibits spontaneous and VIP-induced vasopressin release from suprachiasmatic neurons. *Brain Res* **801**:216-219.

337. Weaver DR, Liu C and Reppert SM (1996) Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* **10**:1478-1487.
338. Westerink BH, Damsma G, Rollema H, De Vries JB and Horn AS (1987) Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci* **41**:1763-1776.
339. Westerink BHC and Cremers T (2007) *Handbook of microdialysis: methods, applications, and perspectives*, Elsevier, Boston. pp687.
340. Wetterberg L (1978) Melatonin in humans physiological and clinical studies. *J Neural Transm Suppl.*289-310.
341. White BH and Klein DC (1993) Developmental appearance of pineal adrenergic->guanosine 3',5'-monophosphate response is determined by a process down-stream from elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup>: possible involvement of a diffusible factor. *Endocrinology* **132**:1026-1034.
342. Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M and Carlberg C (1995) Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res* **23**:327-333.
343. Wurtman RJ, Axelrod J and Phillips LS (1963) Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Control by Light. *Science* **142**:1071-1073.
344. Wurtman RJ, Axelrod J, Snyder SH and Chu EW (1965) Changes in the enzymatic synthesis of metabolism in the pineal during the estrous cycle. *Endocrinology* **76**:798-800.
345. Yaga K, Reiter RJ and Richardson BA (1993) Tryptophan loading increases daytime serum melatonin levels in intact and pinealectomized rats. *Life Sci* **52**:1231-1238.
346. Yamada H, Yamamoto A, Takahashi M, Michibata H, Kumon H and Moriyama Y (1996a) The L-type Ca<sup>2+</sup> channel is involved in microvesicle-mediated glutamate exocytosis from rat pinealocytes. *J Pineal Res* **21**:165-174.
347. Yamada H, Yamamoto A, Yodozawa S, Kozaki S, Takahashi M, Morita M, Michibata H, Furuichi T, Mikoshiba K and Moriyama Y (1996b) Microvesicle-mediated exocytosis of glutamate is a novel paracrine-like chemical transduction mechanism and inhibits melatonin secretion in rat pinealocytes. *J Pineal Res* **21**:175-191.
348. Yamada H, Yatsushiro S, Ishio S, Hayashi M, Nishi T, Yamamoto A, Futai M, Yamaguchi A and Moriyama Y (1998) Metabotropic glutamate receptors negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci* **18**:2056-2062.

## Bibliografía

---

349. Yamada H, Hayashi M, Uehara S, Kinoshita M, Muroyama A, Watanabe M, Takei K and Moriyama Y (2002) Norepinephrine triggers Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of 5-hydroxytryptamine from rat pinealocytes in culture. *J Neurochem* **81**:533-540.
350. Yamasaki T, Tamai I and Matsumura Y (2001) Activation of histamine H3 receptors inhibits renal noradrenergic neurotransmission in anesthetized dogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**:R1450-1456.
351. Yatsushiro S, Hayashi M, Morita M, Yamamoto A and Moriyama Y (2000) Glutamate receptor subunit delta2 is highly expressed in a novel population of glial-like cells in rat pineal glands in culture. *J Neurochem* **75**:1115-1122.
352. Yeung Lam P, Chen K and Shih JC (2004) The circadian rhythm of 5-HT biosynthetic and degradative enzymes in immortalized mouse neuroendocrine pineal cell line--a model for studying circadian rhythm. *Life Sci* **75**:3017-3026.
353. Yoshioka K., Gitzen JF, Kissinger CB and Kissinger PT (2000) Preliminary study of the effects of melatonin administration on the release of endogenous 5-HT and its metabolite in rat SCN. *J Endocrinol Current* **18**:117-122.
354. Young SN and Anderson GM (1982) Factors influencing melatonin, 5-hydroxytryptophol, 5-hydroxyindoleacetic acid, 5-hydroxytryptamine and tryptophan in rat pineal glands. *Neuroendocrinology* **35**:464-468.
355. Yuwiler A (1983) Light and agonists alter pineal N-acetyltransferase induction by vasoactive intestinal polypeptide. *Science* **220**:1082-1083.
356. Zaidan R, Geoffriau M, Brun J, Taillard J, Bureau C, Chazot G and Claustrat B (1994) Melatonin is able to influence its secretion in humans: description of a phase-response curve. *Neuroendocrinology* **60**:105-112.
357. Zarazaga LA, Malpaux B, Guillaume D, Bodin L and Chemineau P (1998) Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. *Am J Physiol* **274**:E1086-1090.
358. Zatz M, Gastel JA, Heath JR, 3rd and Klein DC (2000) Chick pineal melatonin synthesis: light and cyclic AMP control abundance of serotonin N-acetyltransferase protein. *J Neurochem* **74**:2315-2321.
359. Zhang ET, Mikkelsen JD and Moller M (1991) Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res* **265**:63-71.
360. Zhao ZY and Touitou Y (1993) Kinetic changes of melatonin release in rat pineal perfusions at different circadian stages. Effects of corticosteroids. *Acta Endocrinol (Copenh)* **129**:81-88.

- 
361. Zimmermann RC, McDougle CJ, Schumacher M, Olcese J, Mason JW, Heninger GR and Price LH (1993) Effects of acute tryptophan depletion on nocturnal melatonin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **76**:1160-1164.
  362. Zisapel N, Egozi Y and Laudon M (1982) Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res* **246**:161-163.
  363. Zisapel N and Laudon M (1983) Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res* **272**:378-381.
  364. Zlotos DP (2005) Recent advances in melatonin receptor ligands. *Arch Pharm (Weinheim)* **338**:229-247.

