

TD 489

**Departamento de Bioquímica Medica y Biología Molecular**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad de Sevilla**

36

15

01 ABR. 1998



**Regulación adrenergica diferencial de la actividad N-  
acetiltransferasa en glándula pineal durante el desarrollo:  
Estudios "in vitro"**

Tesis presentada por AHMED HARMOUCH para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas.

TD

R.18.028



"REGULACION ADRENERGICA DIFERENCIAL DE LA ACTIVIDAD N-ACETILTRANSFERASA EN GLANDULA PINEAL DE RATA DURANTE EL DESARROLLO: ESTUDI *EN VITRO*"

Por

Ahmed Harmouch

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Ahmed Harmouch".

Los directores del trabajo:

Carmen Osuna Fernández

J.M. Guerrero Montavez

A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. Osuna". To the right of the signature is a circular stamp from the University of Sevilla, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Medical and Biological Molecular.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J.M. Guerrero Montavez".

Profesora titular del Dpto

Profesor titular del Dpto.

Bioquímica Médica y Biología  
Molecular de la Facultad de  
Medicina de la Universidad de  
Sevilla

de Bioquímica Médica y Biología  
Molecular de la Facultad de  
Medicina de la Universidad de  
Sevilla



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4  
41009 SEVILLA

Dña. Carmen Osuna Fernández, Directora del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

**CERTIFICA**

que el trabajo titulado: "Regulación adrenérgica diferencial de la actividad N-acetiltransferasa en glándula pineal de rata durante el desarrollo: Estudio *en vitro*" presentado por Ahmed Harmouch para optar al grado de doctor en ciencias biológicas, ha sido realizado en este Departamento bajo la dirección de los profesores Carmen Osuna Fernández y J.M. Guerrero Montavez.

Sevilla, Marzo de 1998

Fdo.: Prof. Carmen Osuna

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación que se citan a continuación:

1.- Interacción entre señales neuroendocrinas y sistemas inmune: Estudio de los mecanismos de acción y los efectos biológicos de la melatonina y el péptido intestinal vasoactivo en células de estirpe linfocítica humanas, de rata y ratón.

Entidad financiadora: Fondo de Investigaciones Sanitarias.

Duración: 1993-1995.

Referencia: 93/0210.

Investigador principal: Juan Miguel Guerrero Montávez.

2.- Estudio del enzima 5'-desyodasa tipo II en glándula pineal, glándula Harderiana y timo. Regulación de su actividad y de su expresión en oocitos de *Xenopus laevis*.

Entidad financiadora: DGICYT.

Duración: 1995-1997.

Referencia: PB94-1425.

Investigador principal: Carmen Osuna Fernandez.

3.- Interacción glándula pineal-sistema nervioso central: Estudio de la regulación por melatonina de la actividad óxido nítrico sintasa y la producción de GMPcíclico en cerebro y cerebelo.

Entidad financiadora: DGICYT.

Duración: 1996-1998.

Referencia: PM95-0159.

Investigador principal: Juan Miguel Guerrero Montávez.

## **Agradecimientos:**

Deseo expresar mi agradecimiento:

A mis directores de Tesis, los Drs. JM Guerrero y Carmen Osuna por su constante interes en mi Formación, por su ayuda, orientación y confianza prestada, sin las cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo

A los profesores del departamento de Bioquímica que me han ayudado en muchas ocasiones.

A los doctorandos del Departamento por su apoyo y amistad.

A todas las personas que con su ayuda han contribuido a llevar adelante este proyecto

Y, a mi familia.

## I. INTRODUCCION.

### 1. La glándula pineal.

- 1.1. Localización.
- 1.2. Estructura.
- 1.3. Inervación de la glándula pineal.
- 1.4. Suministro vascular de la glándula pineal.
- 1.5. Calcificación de la glándula pineal.
- 1.6. Bioquímica de la glándula pineal.
- 1.7. Síntesis de la melatonina.

### 2. La glándula Harderiana.

- 2.1. Organización histológica.
- 2.2. Secreción del epitelio.
- 2.3. Inervación de la glándula Harderiana.
- 2.4. Vasculirización de la glándula Harderiana.
- 2.5. Productos de secreción de la glándula Harderiana.
- 2.6. Efecto de las hormonas gonadales sobre la estructura y la actividad de la glándula Harderiana.
- 2.7. Efecto de las hormonas tiroideas y pituitarias en la estructura y la actividad de la glándula Harderiana.
- 2.8. Funciones de la glándula Harderiana.
- 2.9. La glándula Harderiana durante el desarrollo.

### 3. Objetivos.

## II. MATERIALES Y METODOS.

### 1. Materiales.

- 1.1. Reactivos.
- 1.2. Animales.
- 1.3. Descripción del método de cultivo.

### 2. Metodos.

- 2.1. Medida de la actividad N-acetiltransferasa.
- 2.2. Actividad de NAT.
- 2.3. Determinación cuantitativa de AMPc.

- 2.4. Efecto del dibutiril-AMPC sobre la actividad NAT.
  - 2.5. Estudios de especificidad.
  - 2.6. ADP-ribosilación.
  - 2.7. Inmunodetección de las subunidades de la proteína G.
3. Caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenergicos en glándula Harderiana.
    - 3.1. Estudio de fijación.
    - 3.2. Determinación de tiempo y temperatura de incubación.
    - 3.3. Determinación de concentración de proteínas.
    - 3.4. Estudios de asociación-disociación.
    - 3.5. Estudio de saturación.
    - 3.6. Estudio estequiométrico.
    - 3.7. Estudio de especificidad.
    - 3.8. Estudio de variación día-noche de la unión del [ $^{125}$ I]CYP a los receptores.
  4. Tratamiento estadístico y programas de ordenadores.

### III. RESULTADOS.

1. Regulación adrenergica de la actividad N-acetiltransferasa en pineal de rata durante el desarrollo: estudios *en vitro*.
  - 1.1. Efecto del Isoproterenol y la Metoxamina sobre la actividad NAT en pineales de ratas de 2 y 6 semanas de edad en cultivo.
  - 1.2. Efecto del Isoproterenol y la Metoxamina sobre la producción de AMPc.
  - 1.3. Especificidad de los receptores  $\alpha$ - $\beta$ -adrenergicos en pineal.
  - 1.4. ADP-ribosilación catalizada por Toxina colerica y pertucica.
  - 1.5. Inmunodetección de la subunidades de la proteína G.
2. Caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenergicos en glándula Harderiana.
  - 2.1. Estudios cinéticos.
  - 2.2. Efecto de la concentración de proteínas.
  - 2.3. Asociación-disociación.
  - 2.4. Estudio de saturación.
  - 2.5. Estudio estequiométrico.
  - 2.6. Estudio de especificidad.
  - 2.7. Estudio de ritmo circadiano en la fijación del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas crudas de la glándula Harderiana de rata.

IV. DISCUCION.

V. COCLUSIONES.

VI. BIBLIOGRAFIA.

VII. ARTICULOS PUBLICADOS.



*Abreviaturas.*



AcCoA:	Acetil Coenzima A
AMPc :	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AT :	Actividad total
BSA :	Albúmina sérica bovina.
[ <sup>14</sup> C]AcCoA:	Acetil Coenzima A marcado en el carbono 1 con <sup>14</sup> C
Ci:	Curios
cpm:	cuentas por minuto
5'-D:	5'-desyodasa tipo II
GABA:	Acidi gamma-aminobutírico
HIOMT:	Hidroxiindol-O-metiltransferasa
ISO:	Isoproterenol
mARN:	Acido ribonucleico mensajero
NAT:	N-acetil transferasa
Ne:	Norepinifrina
PBS:	Buffer fosfato sódico
PP:	Propranolol
Pz:	Prazosin
VIP:	Péptido Intestinal Vasoactivo
AJ:	Antes Jesus
APUD:	Amine precursor uptake and decarboxylation system
GCS:	Ganglio cervical superior
MSH:	Hormona estimulante del melanocito
AVT:	Arginina Vasotocina
ACTH:	Hormona adrenocorticotropica
TRH:	Hormona liberadora de tirotopina
GnRH:	Hormona liberadora de gonadotrofina
NSQ:	Nucleo supraquiasmatico
SNC:	Sistema nervioso central
IP <sub>3</sub> :	1,4,5. Inositol trifosfato
DAG:	Diacilglicerol
GMPC:	Monofosfato de guanosina cíclico
CREB:	Proteina de unión al elemento de respuesta al AMPc

CREM:	Gen elemento modulador inducido por AMPc
ICER:	Proteina de la respuesta temprana inducida por AMPc.
GEDE:	Glicerol este diester
HGDGF:	Factor de crecimiento derivado en glándula Harderiana
IBMX:	3-Isobutil-1-metilxantina
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético
HEPES:	N-[2-hidroxietyl]piperazina-N-[2-acido hidroxipropano sulfonico]
d-AMPc:	dibutiril AMPc
Ptx:	Toxina pertusica
Ctx:	Toxina colerica
Gs:	Proteina G estimuladora
Gi:	Proteina G inhibidora
<sup>125</sup> ICYP:	Iodocyanopindolol marcado con iodo 125
<sup>125</sup> IHEAT:	2-[β-(4-hidroxi-fenil)-etilaminometil]tetralone marcado con iodo 125
PMSF:	Fenilmetilsulfonifluorido
TLCK:	N-α-tosil-lisina clorometil ketone
ESM:	Error estandar de la media

## ***1. INTRODUCCION***

La glándula pineal, es un misterioso órgano impar en el cerebro, o epífnis cerebri era conocida desde hace más de 2000 años. Herophilus (325-280 AJ) aparentemente consideró que la glándula pineal es una válvula reguladora del flujo de "pneuma" o "spiritus" en latino desde el tercero al cuarto ventrículo. La primera buena descripción de la glándula pineal se hizo en el siglo 15 y particularmente por parte de Vesalius en el siglo 16 quien sigo considerando que el spiritus animales se encuentra en las ventriculas (3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup>).

Descartes, filosofo francés (1596-1650) concibió un modelo mecánica del cerebro humano y del sistema nervioso (Kappers, 1980 y 1981) en el cual el órgano pineal tiene una función llave, y nunca marcó el órgano pineal como asiento del alma, sino solamente expresó la opinion de que el alma "ejerce su función en un grado mayor en el órgano pineal que en otro lugar".

En los años 1880, tres científico (H. Rabl-Rückhard, F. Ahlborn y H. W. de Graff) independientemente concibieron la teoría de que los vertebrados ancestrales el órgano pineal actuaría como un "tercer ojo" impar. Más estudios demostraron que el órgano parietal de Hatteria semejava un ojo en un grado mayor (Spencer, 1886 a y b). Como resultado, la teoría de la función del ojo parietal ganó credibilidad.

Ludwig Edinger (1855-1918), neurólogo, distinguió dos proyecciones del órgano pineal, la versícula frontal y el tubo pineal caudal. "El último esta siempre presente es llamado epífnis, y se desarrolla diferentemente en diferentes clases de animales. la proyección frontal es mucho más rara. Su vesicular terminal gradualmente se convierte en una estructura similar al ojo. Uno puede reconocer una córnea y lentes, una retina y una capa pigmentada en este órgano parietal. la conducción nerviosa llega a este ojo por haz del ganglio habenular". (Edinger, 1900).

A partir de la segunda mitad del siglo XX se va produciendo un rápido desarrollo de la bioquímica pineal, farmacología y endocrinología, con un rápido

incremento en el número de científicos de diferentes disciplinas convergiendo en la pineal. La citología pineal fue esclarecida por Kelly (1968 y 1971) y Oksche (1971a y b). Los pinealocitos pertenecen al sistema APUD (Pearse, 1969) y su bioquímica y función están conectadas con las llamadas para-neuronas. La inervación de la pineal esta compuesta por dos tipos: pinealofugal o sensorial y pinealopetal o simpática. Ya Santiago Ramón y Cajal (1904) encontró muchas fibras nerviosas en la glándula pineal de ratón, sugiriendo que eran de origen simpático. La importancia de esta observación no fue tomada en cuenta durante mucho tiempo, debido probablemente en parte al descubrimiento del tacto hipotálamo-neurohipofisario. Más tarde se descubrió también inervación parasimpático en la glándula pineal de algunos mamíferos.

La investigación citoquímica e histológica fue seguida por la bioquímica. Lerner y cols (1958, 1959 y 1960) aislaron la N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina, a partir de una enorme cantidad de pineales bovinas. La investigación endocrinológica pineal fue fuertemente estimulada por los descubrimientos citológicos y bioquímicos, relacionado pineal y el eje hipotálamo-pituitario-gonadal (Ebels, 1978).

Una importante y fascinante parte de la reciente historia de la investigación pineal es el descubrimiento del ritmo circadiano luz-oscuridad (Fiske, 1941 y 1960; Wurtman y cols, 1961). Durante 1960 se descubrió la fotoperiodicidad en el contenido pineal de indoles y enzimas (Quay, 1963). Algunos autores han tratado de caracterizar la esencia natural y función del órgano pineal. La más neutral y por tanto la más comprensiva definición, hasta ahora, fue dada por Reiter y Hester (1965), los cuales llaman a la pineal "regulador de reguladores": "El órgano pineal es, indudablemente, un órgano endocrino de origen neural siendo de una significación multifuncional al modular la función de sistemas endocrinos y probablemente no endocrinos, sincrozando esta función con condiciones externas e internas".



## **I.1. ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA PINEAL.**

### **I.1.1. Localización.**

La pineal es una evaginación dorsal del diencéfalo, que junto a las comisuras habinular y posterior constituye el epitálamo.

En humano la glándula pineal o epífisis se halla situada en el techo del tercer ventrículo, bajo del cuerpo caloso, y encima de los tubérculos cuadrigéminos anteriores sobre los que se apoya (Fig. 1). Es un cuerpo cónico algo aplanado, de color gris-rojizo, de una longitud de 5 a 8 mm y de un ancho de 3 a 5 mm, con un peso de unos 20 cg (Bloom y Fawcett, 1973).

En algunos mamíferos, las células pineales emigran dorsocaudalmente durante el desarrollo para formar la pineal distal o superficial que se localiza inmediatamente debajo del cráneo. En la rata, la pineal presenta tres partes:

- pineal profunda o lamina intercalis.
- Tallo pineal.
- El órgano pineal propiamente dicho o pineal superficial cuya longitud oscila entre 1,6 y 1,95 mm y su diámetro es aproximadamente de 0,82 mm (Gregorek et al, 1977).

### **I.1.2. Estructura.**

#### **I.1.2.1. Tipos de células pineales.**

Las células predominante en la glándula pineal son pinealocitos alrededor de 90 % de todas las células. También encontramos células gliales, fibroblastos, mastocitos, células plasmáticas y células que contienen pigmentos (Vollrath, 1981).

En la mayoría de las especies de mamíferos, esta presente una única población

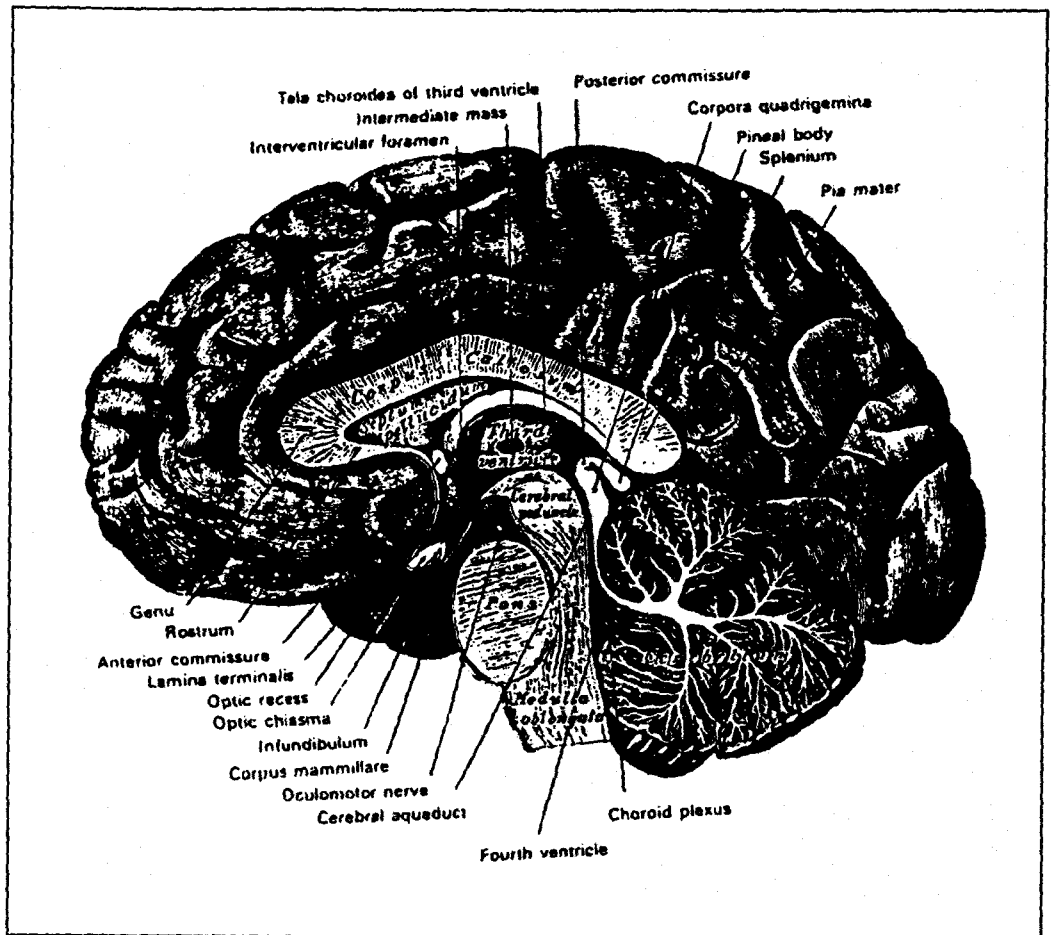
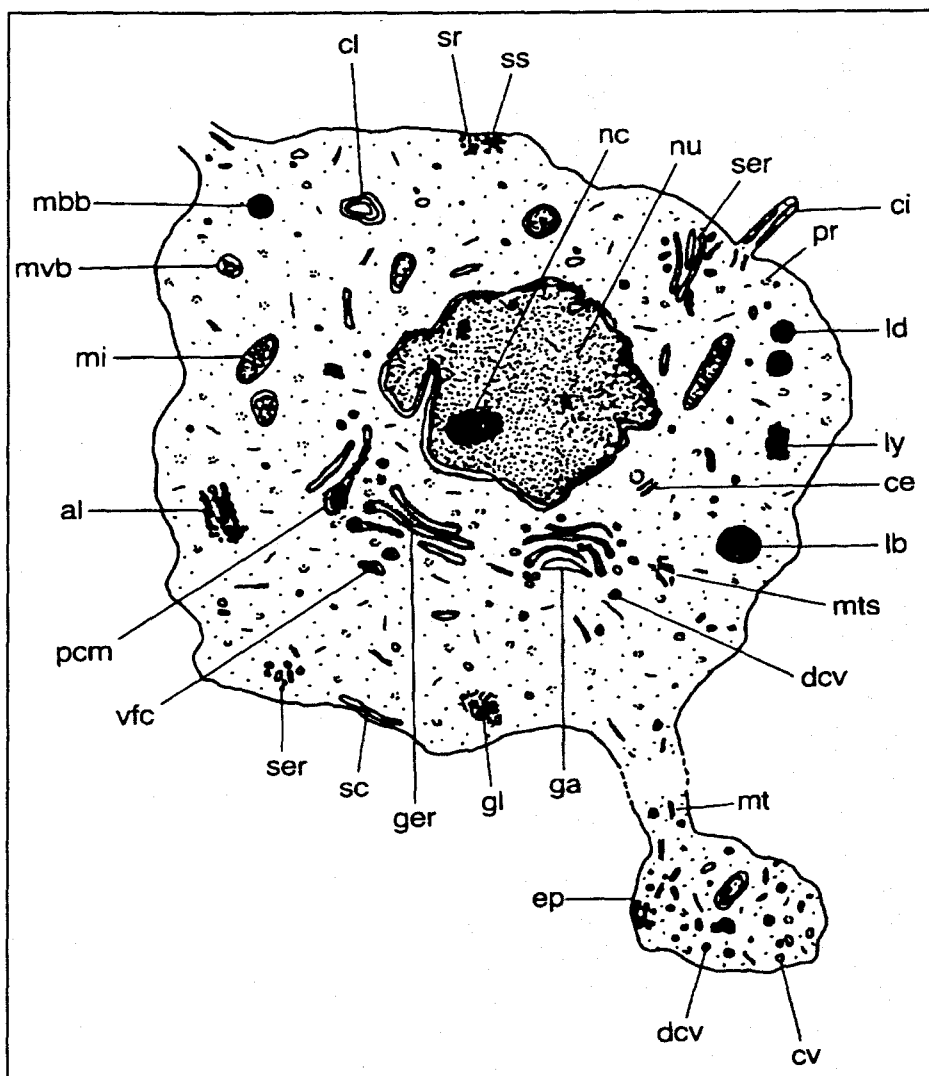


Figura. 1: Sección medio sagital del cerebro. (Clemente, 1985).





**Figura.2:** pinealocito de mamífero. Al, Lamela anulada; Ce, centriolo; Ci, cilio; Cl, lamela concéntrica; CV, vesícula clara; dcv, vesícula de centro denso; ep, final de la prolongación del pinealocito; ga, aparato de golgi; ger, reticulo endoplasmatico rugoso; gl, partículas de glicógeno; ib, cuerpo de inclusión; ld, gota de lípidos; LY, lisosoma; mbb, cuerpo unido a membrana; mi, mitocondria; mt, microtúbulo; mts, hojas microtubulares; mvb, cuerpo multi vesicular; nc, nucléolo; nu, núcleo; pcm, material para cristalino; pr, polirosomas; sc, cisterna de subsuperficie; ser, reticulo endoplasmatico liso; sr, barras sinápticas; ss, esferulas sinápticas; rcf, vacuola conteniendo material floculante. (M.Karasek, 1983a).

de pinealocitos, sin embargo en otras especies se han encontrado dos diferentes poblaciones de pinealocitos: la población de pinealocitos I formarían la propia glándula y los pinealocitos II estarían junto a los capilares (Pévet, 1977 y 1981a).

#### **I.1.2.2. Pinealocitos.**

El cuerpo celular de los pinealocitos, (fig.2), posee retículo endoplásmico, liso y rugoso, junto con un aparato de Golgi bien desarrollado, gotitas de lípidos, y numerosas mitocondrias, como corresponde a células con función secretora. Los pinealocitos muestran a veces cilios que son raros en el pinealocito de los mamíferos, sin embargo, más frecuentemente se encuentran estructuras de tipo microtubular que se interpretan como restos evolutivos de segmentos externos (Gonzalez y Álvarez-Uría, 1971). La presencia de cilios en el pinealocito tiene interés ya que nos aporta la evidencia de la diferenciación de los pinealocitos de mamíferos de células fotorreceptoras del órgano pineal en vertebrados inferiores (Collin y Oksche, 1981).

El pinealocito tiene un núcleo esférico, oval o lobulado, salen una o más prolongaciones en cuyo interior hay microtúbulos ordenados paralelamente. Estas prolongaciones terminan en pequeñas dilataciones cerca de los capilares sanguíneos, o menos frecuentemente, próximas a células del epéndimo del receso pineal. Estos botones terminales tienen retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y vesículas con un núcleo electrónicamente denso. Las vesículas almacenan, probablemente, hormonas monoaminicas y polipeptídicas.

Otra característica de los pinealocitos de algunos mamíferos es la presencia de estructuras típicas de las sinapsis en barra o cintas sinápticas. Son unas estructuras que constan de una varilla densa electrónicamente (de 25-60 nm de ancho y 0,2-2  $\mu$ m de longitud) rodeado por única capa de vesículas granuladas. El numero de las barras sinápticas cambia bajo condiciones fisiológicas y experimentales. Se han descritos

también unas esférulas sinápticas, que constan de esferas o discos redondos o en corazón en forma de gota rodeado por una capa de vesículas luminiscentes electrónicamente. Ambas estructuras exhiben el mismo ritmo circadiano de aparición, aumentando su concentración por la noche (Kurumado y Mori, 1977). La función de las barras sinápticas no está establecida parece que, debido a su localización, pueden estar implicados en la sinapsis nerviosa.

Los pinealocitos muestran también un aparato de Golgi bien desarrollado y generalmente consta de un sistema de cisternas aplanadas o dilatadas, asociadas con numerosas vesículas de diferente diámetro. Típicamente las vesículas de centro denso exhiben una alta densidad electrónica en el centro, rodeadas por un halo estrecho (Karasek 1983a). Sus contenido es proteináceo (Juillard, 1979); siendo demostrado por digestión mediante enzimas proteolíticas (pronasa y pepsina). El número de las vesículas de centro denso cambia bajo diferentes condiciones experimentales y naturales por ejemplo, es mayor su número y/o área durante el día que la noche.

### **I.1.2.3. Retículo Endoplasmático Rugoso y Vacuolas.**

El retículo endoplasmático rugoso es una característica constante de los pinealocitos de mamíferos, pero muestran grandes variaciones en cantidad entre diferentes especies. La presencia de vacuolas conteniendo un material floculante de moderada densidad electrónica ha sido descrito en numerosas especies de mamíferos (Karasek, 1982 y 1983b) presentando a veces una estructura proteínica en cisternas dilatadas del retículo endoplasmático rugoso, el cual ha sido demostrado por digestión proteolítica con pronasa (Pévet, 1977).

#### **I.1.2.4. Retículo endoplasmático liso.**

El retículo endoplasmático liso tiene una presencia constante en el pinealocito del mamífero, aunque en diferentes cantidades. En la mayoría de las especies el tipo liso de retículo endoplasmático excede el tipo rugoso en cantidad y en componentes vasculares elongados que están distribuidos aleatoriamente en el pericarion y en las prolongaciones (Sheridan, 1968).

Los túbulos del retículo endoplasmático liso parecen participar en la formación de las vesículas claras. Estas vesículas se encuentran en la región de Golgi dispersadas por el citoplasma y se ha visto el ritmo circadiano en estas vesículas claras y se ha sugerido que contienen productos secretorios del pinealocito (Welsh, 1979).

#### **I.1.2.5. Mitocondria.**

La característica común del pinealocito de mamífero es el gran número de mitocondrias, aunque con diferentes formas: redondas, ovaladas, elongadas, etc... (Vollrath, 1981). En el pinealocito de rata la mitocondria ocupa aproximadamente el 6 % del volumen celular (Krstic, 1977). Las mitocondrias tienen ritmo circadiano con un pico nocturno de aumento de volumen y, como en otras células eucariotas, juegan un papel en el metabolismo celular. También se le adscribe la síntesis de serotonina (Romijn et al 1977).

#### **I.1.2.6. Lisosomas.**

Los lisosomas o cuerpos granosos son esféricos u ovals y se pueden encontrar formas elongadas, los lisosomas contienen un fino material granular, se encuentran en los terminales de las prolongaciones de los pinealocitos en abundancia, pensándose que juegan un papel en el mecanismo secretorio del mismo (Karasek et al, 1976).

### **I.1.2.7. Otros componentes celulares.**

Existen otras estructuras cómo:

- Centriolos que son raros en los pinealocitos de los mamíferos adultos estos centriolos pueden transformarse en haces microtubulares (Wolf, 1965).
- Lamelas concéntricas o membrana espiral que han sido descritas en otros tipos celulares, particularmente en glándulas endocrinas su función se relacionaría con el proceso de secreción y el de sitios focales de generación (Vaughan et al, 1980).
- Cisternas de subsuperficie son una característica de las células excitables han sido encontradas en el pinealocito. Están localizadas en posiciones opuestas, unas de otras, en pinealocitos adyacentes. (Rosebluth, 1962), su función no ha sido dilucidada aún.

### **I.1.3. Inervación de la glándula pineal:**

En vertebrados inferiores la inervación de la pineal es fundamentalmente eferente o pinealofugal y la formación procedente de los fotorreceptores pineales se transmite a diversas regiones del cerebro. A medida que se avanza en la escala filogenética, disminuye la importancia de esta inervación. Así, en aves, el número de fibras eferentes se reduce, mientras que en mamíferos adultos no se han encontrado fibras pinealófugas, con excepción del hurón, en el que hay fibras eferente que inervan la habénula.

No evidencia de fibras aferentes a la pineal en peces, pero en reptiles se ha encontrado inervación noradrenérgica. En aves, La inervación simpática aferente se incrementa, y en mamíferos, la información lumínica llega a la pineal exclusivamente desde la retina, fundamentalmente a través del sistema nervioso simpático.

Hasta ahora, la inervación simpática de la glándula pineal ha sido la más estudiada y conocida, en mamíferos. No obstante, la glándula pineal tiene también una inervación central comisural, una periférica parasimpática y otras conexiones

nerviosas, pero se desconoce el papel que desempeñan éstas en el control de su actividad.

#### **I.1.3.1. Inervación periférica simpática.**

En ratas, hay fibras nerviosas que desde la retina alcanzan el núcleo supraquiasmático (Moore, 1978). Este núcleo proyecta hacia el núcleo para ventricular. Desde aquí, los axones forman el haz procefálico medial y probablemente hacen sinapsis con el complejo dorsal vagal u otros núcleos del tronco del encéfalo. Posteriormente, Los axones alcanzan la médula espinal torácica donde conectan con la columna celular intermedio lateral. Las fibras preganglionares de este núcleo espinal proyectan hacia el ganglio cervical superior (GCS). Aunque existen rutas alternativas, la mayoría de las fibras aferentes a los pinealocitos que proceden de GCS, lo hacen vía nervio carotideo interno y nervio coronario (fig. 3).

Parte de las fibras simpáticas penetran en la glándula pineal acompañando a los vasos sanguíneos cuyo flujo regulan, a lo largo del tejido conectivo que tabica la glándula. Otro grupo de fibras penetra en el polo dorsal de la glándula en múltiples sitios a través de la membrana externa, en forma de haces o fibras únicas e inervan el parénquima. Estas fibras entran en contacto íntimo con los pinealocitos a través de varicosidades y botones terminales desde donde liberan catecolaminas. Sin embargo, no hacen sinapsis típicas, caracterizadas por engrosamientos especializados de la membrana pre-postsináptica, con las células pineales.

#### **I.1.3.2. Inervación central.**

Además de la inervación simpática periférica, la glándula pineal de rata recibe inervación central a través de las fibras comisurales que penetran por el pedúnculo de la glándula. Las más numerosas son las fibras que proceden de núcleo de la habénula

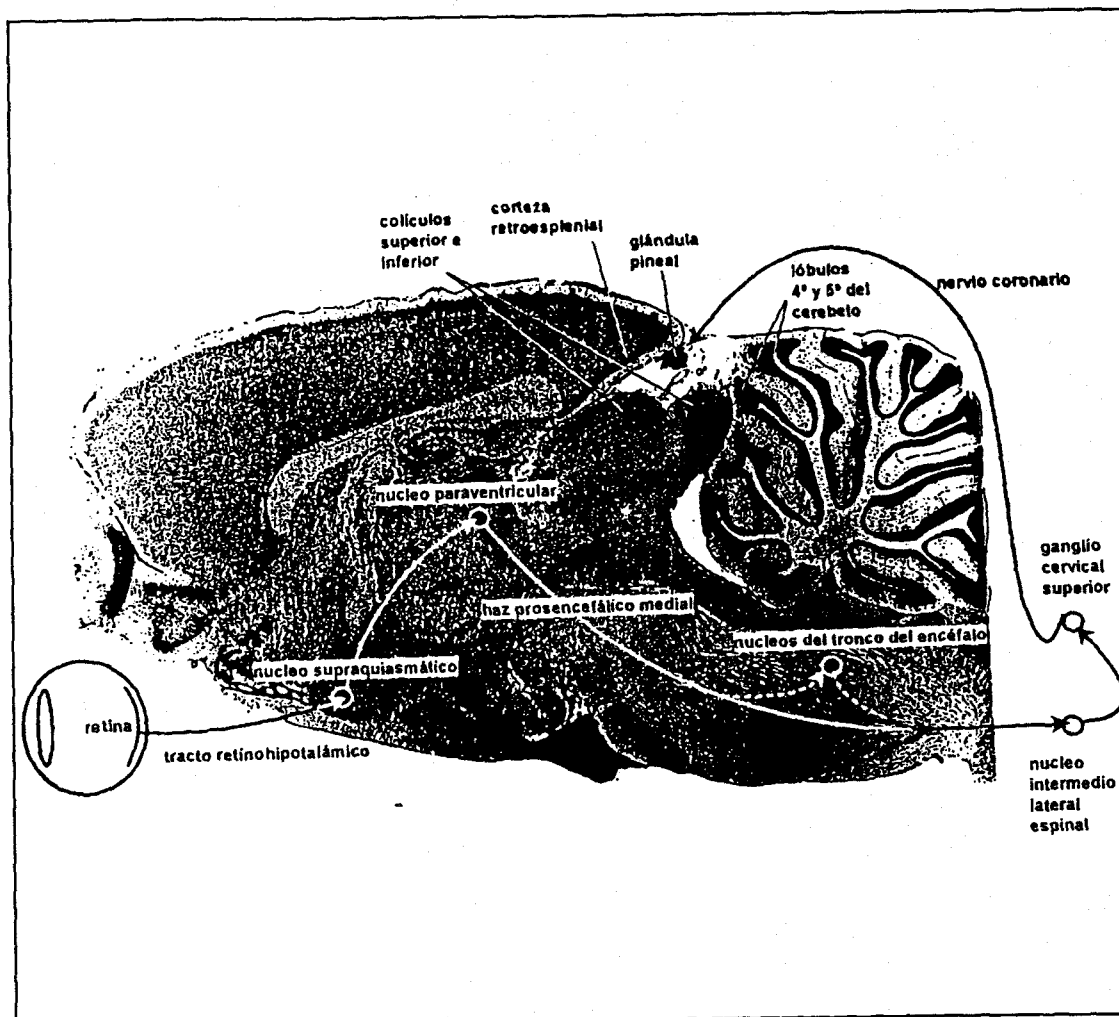


Figura.3 . Representación semiesquemática de las relaciones anatómicas de la glándula pineal de rata y su inervación periférica simpática. Se muestra una sección sagital del cerebro de una ratona adulta en un plano desplazado 0.4 mm de la línea media o plano de simetría del cerebro. La sección fue teñida con acetilcolinesterasa para obtener una mejor delineación de los núcleos y tractos de fibras (sección tomada de "The rat brain in stereotaxic coordinates", G. Paxinos y C. Watson, Ed. Academic Press, 1982)

(comisura habenular), aunque existen otras fibras más dorsales que forman la comisura posterior. Estas fibras parecen llevar información lumínica (Shapiro y Salas, 1971; Dafny, 1980) y, posiblemente, acústica y olfatoria como sugieren las conexiones funcionales con centros acústicos y olfatorios (Dafny, 1977) que se abolen después de la sección del pedúnculo pineal (Pazo, 1981).

En el pedúnculo pineal, además de las fibras comisurales se ha descrito, en diferentes especies animales aunque no en humanos, la presencia de fibras neurosecretoras (Schneider, Semm, Vollrath, 1981). En ratas, algunas fibras contienen vasopresina y oxitocina (Buijs y Pévet, 1980).

#### **I.1.3.3. Otras conexiones nerviosas.**

En el desarrollo de la glándula pineal humana existen fibras eferentes que constituyen el nervio pineal (Moller, 1978), y que se considera ontogénicamente equivalente del nervio pineal sensitivo de los peces y anfibios, capaz de transmitir impulsos generados por la luz. Este nervio es una estructura efímera, que no se ha observado después del nacimiento, y cuyo significado funcional, si lo tiene, no se conoce.

Se duda si la inervación parasimpática de la glándula pineal es una característica regular, común a todos los mamíferos, y no se conoce su papel funcional. No obstante hay dos especies en las que se ha demostrado una clara inervación parasimpática: en monos macacos el nervio coronario es parasimpático (Kenny, 1961) y en conejos existen aferencias parasimpáticas que terminan en los pinealocitos (Romijn, 1975). En humanos, existen dos ganglios extrapineales, el de Marburg y Pastori, que inervan la glándula pineal y que se suponen de naturaleza parasimpática. En ratas, se ha puesto de manifiesto la existencia de receptores muscarínicos funcionales en la membrana de los pinealocitos (Laitinen, Torda y Saavedra, 1989).



#### **I.1.4. Suministro vascular de la glándula pineal.**

El suministro vascular de la glándula pineal es rico en vasos sanguíneos, el flujo sanguíneo calculado es aproximadamente 4 ml/min/g. El suministro arterial esta proporcionado por ramas finas de arterias coroidales posteriores, la extensión de arterioles puede ser en la capsula de la pineal antes de entrar en la glándula.

En muchas especies la glándula pineal aparece ser suministrada más bien con capilares que arterioles. Hay una incertidumbre sobre la dirección del flujo sanguíneo en la región de la gran vena cerebral. El único enlace vascular directo entre la pineal y el cerebro es a través del plexo coroideo (Quay, 1974), Si las secreciones pineales pasaran directamente al cerebro a través del plexo coroideo se requeriría un flujo de sangre inverso en la gran vena cerebral.

En rata y las ovejas la vasoconstricción ocurre cuando se enciende la luz es evidente sugerir que el control vascular de las secreciones pineales esta relacionado con el ciclo luz-oscuridad.

#### **I.1.5. Calcificación de la glándula pineal.**

La glándula pineal de muchas especies presentan concreciones calcarias. Químicamente están compuestas principalmente de hidroxapatita, siendo el índice de hidroxapatita cristalina a fracción submicrocristalina mayor que en material óseo (Ostrowski et al, 1980). En humanos los estudios radiográficos demuestran que las concreciones están presente en pineal de adultos; en realidad la calcificación esta presente probablemente desde la infancia. Estas concreciones parece que están presente en células paranchymal y el tejido intracelular (Tapp, 1979).

Las concreciones calcarias están compuestas de una laminación concéntrica, con un núcleo central muy oscuro y una zona periférica clara, por microscopia electrónica. El número de concreciones incrementa con la edad, aunque no se relaciona con su

inactivación. Se postula su relación con el proceso secretorio, aunque también su depósito intracelular puede indicar un proceso mucho más complejo. También podría indicar el resultado de un drenaje reducido de líquido tisular en la glándula pineal (Diehl, 1978).

#### **I.1.6. Bioquímica de la glándula pineal.**

Uno de los primeros investigadores en dejar la constancia del carácter secretor de las células de la glándula pineal fue del Reo-Hortera (1932), después el que dio el empuje definitivo fue el dermatólogo Alemán Lerner quien en 1958, logró aislar de las células pineales de bovinos el principio activo descrito a principios de siglo por McCord y Allen (1987) y que producía el aclaramiento de la piel de los anfibios. A este principio activo Lerner le denominó "melatonina" por poseer el efecto contrario al de la MSH, hormona hipofisaria que produce la dispersión de los granos de melanina en los melanóforos de la piel. En este apartado podemos agrupar siguiendo a Quay (1981) los constituyentes pineales en general.

##### **I.1.6.1. Componentes inorgánicos.**

El principal contenido calcáreo de la pineal humana es estructuralmente hidroxapatita y también carbonato de apatita. En la glándula pineal están detectados concentraciones relativamente mayores de manganeso, cobre y zinc. El zinc alcanza la concentración más alta del cerebro en interior de la pineal mostrando variaciones estacionales con un pico máximo al final del verano y mínimo durante el invierno. Igualmente la reactividad vascular exhibe respuestas estacionales al zinc (Cunanan y cols, 1980). Otros elementos como potasio, sodio, magnesio y calcio, tienen cambios rítmicos de 24 h (Piechowiak y Schnizer, 1976). El fosfato también está presente y parece tener un papel regulador de la NAT.

### **I.1.6.2. Lípidos y glúcidos.**

Los lípidos pineales varían en cantidad y localización celular en relación con las especies y circunstancias fisiológicas y experimentales y constituyen entre 3 y 10 % del peso seco del órgano pineal. Los lípidos pineales en su mayoría son fosfolípidos (principalmente fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina y esfingomielina) y se encuentran en células intersticiales, mientras que en los pinealocitos encontramos lípidos neutros. Ningún compuesto lipídico es específico del tejido pineal, estando relacionado con el metabolismo general, la estructura y la función de las membranas (Quay, 1974).

Se han podido individualizar tres elementos de glúcidos que son: el ácido ascórbico, el glucógeno y el ácido murámico (Quay, 1974), este último, se encuentra en concentraciones mayores en la pineal que en el cerebro sus derivados de composición glicoproteica podrían ser resultado de alguna función específica del pinealocito (Green y col, 1962).

### **I.1.6.3. Aminoácidos.**

En pineales de los mamíferos estudiados la composición de los aminoácidos libres es similar. En pineales humanas, bovinas y de rata el ácido glutámico, glicina, glutamina y alanina contribuyen a los porcentajes mayores del total de aminoácidos libres. Algunos aminoácidos incrementan con la edad como el ácido glutámico, triptofano, felilánina, lisina y leucina. En pineal de ratas adultas se comprobó diferencia en el porcentaje de composición de algunos aminoácidos en ciclo día-noche (Guroff, 1972).



#### **I.1.6.4. Aminoácidos derivados.**

Entre los aminoácidos derivados tenemos las catecolaminas en diferente cantidad y localización entre especies. La primaria y la más consistente localización de noradrenalina esta en los terminales de los nervios simpáticos y que tiene un ritmo de 24 h (Quay, 1981).

Existen otras biogénicas como dopamina, octopamina y adrenalina en pineal pero sulocalizaciones y acciones o funciones se desconocen (Greenberg y Weiss, 1978).

La histamina localizada en los mastocitos y en los pinealocitos que tienen también una ritmicidad de 24 h (Garbarg y col, 1974).

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) se encuentra también en la pineal y podría jugar un papel regulador en la ruta de la melatonina (Waniewski y Suria, 1978).

#### **I.1.6.5. Nucleótidos y ácidos nucleicos.**

Los nucleótidos, nucleosidos y sus derivados son componentes que poseen una importante participación en el metabolismo de las células pineales actuando como mediadores en los efectos de neurotransmisión y muy posiblemente en gran parte de otras actividades metabólicas que hoy aún no se han puesto de manifiesto.

El nucleótido de la glándula pineal de mayor interés es la adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico (AMPC). Está considerado como un segundo mensajero en la activación de la NAT.

En glándula pineal, la síntesis de AMPC, a partir de ATP a través de la adenilato ciclasa cuya actividad en pineal se ve incrementada por la acción de la noradrenalina (Quay, 1981).

#### **I.1.6.6. Enzimas.**

En la glándula pineal se puede agrupar las enzimas en cinco grupos según su acción catalítica (Quay, 1981).

##### **1. Oxidoreductasas.**

Tres grupos de oxidoreductasas merecen la atención en la glándula pineal:

- a. Oxidoreductasas o deshidrogenasas: con papeles principales en el metabolismo energético y unidas vías biosintéticas.
- b. Monoaminoxidasas: importante en los pasos del metabolismo de aminas biogénicas.
- c. Enzimas hidroxilantes: específicas que convierten a determinados aminoácidos en aminas biogénicas activas o sus precursores.

##### **2. Transferasas.**

En la glándula pineal se ha encontrado muchas transferasas entre ellas las mejores conocidas: metiltransferasas (E.C. 2.1.1.-), acetiltransferasas (E.C. 2.3.1.-) y proteínas kinasas

(E.C. 2.7.1.37.).

- a. Metiltransferasas (E.C. 2.1.1.-), las más importantes en los mecanismos bioquímicos de la pineal:

- Hidroxiindol-O-metiltransferasa (E.C. 2.1.1.4. HIOMT) puede estar localizada en los mastocitos y parece mostrar poco cambio desde la edad adulta a la vejez, y se encuentra en mayor concentración en el tejido pineal, encontrándose también en niveles menores en retina y otros tejidos. La HIOMT representa aproximadamente el 4 % de la proteína pineal soluble.

- Catecol-O-metiltransferasa (E.C. 2.1.1.6. COMT), se encuentra en los eritrocitos en muchos órganos, incluyendo la pineal. Contribuye a los mecanismos adrenérgicos que conducen a los cambios circadianos e inducidos por hormonas en las actividades

sintéticas pineales. La noradrenalina es inactivada por COMT, aunque la captación de la noradrenalina por los terminales nerviosos más que su inactivación por al COMT, parece más importante para controlar la liberación de noradrenalina por los terminales nerviosos.

b. Acetiltransferasas (E.C. 2.3.1.-) dos de las actividades enzimáticas de acetiltransferasas de pineal se han estudiado. La más importante es la serotonina-N-acetiltransferasa (E.C. 2.1.3.1.5., NAT-acetil-COA). La segunda acetiltransferasa pineal es la colina transferasa (E.C. 2.3.1.6, CAT, acetil-COA) es responsable de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina.

c. Proteína kinasa, dependiente del AMPc (E.C. 2.7.1.37., AMPc: proteína fosfotransferasa) que incluye una proteína reguladora y una proteína catalítica. Cuando el sistema es activado por AMPc, fosforila histonas. También puede inducir algunas enzimas pineales, incluyendo a la serotonina-NAT.

### **3. Hidrolasas.**

Una de las más interesante dentro el metabolismo de la melatonina es el adenilato ciclasa (E.C. 3.6.1. ) responsable de la rotura enzimática del ATP a AMPc y pirofosfato inorgánico.

### **4. Liasas.**

Las más importantes en pineal son:

La DOGA decarboxilasa (E.C. 4.1.1.26, 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina carboxilasa) y la 5-hidroxitriptofano decarboxilasa (E.C. 4.1.1.28, 5-hidroxi-L-triptofano carboxilasa), importantes respectivamente, en la biosíntesis de catecolaminas e indolaminas. La anhidrasa carbónica (E.C. 4.2.1.1., carbonato hidroxilasa) esta presente en muy bajo niveles en pineal humana y de rata.

### **5. Isomerasas.**

Pineales de cordero son una fuente rica de glucosa fosfato isomerasa (E.C. 5.3.1.9.,

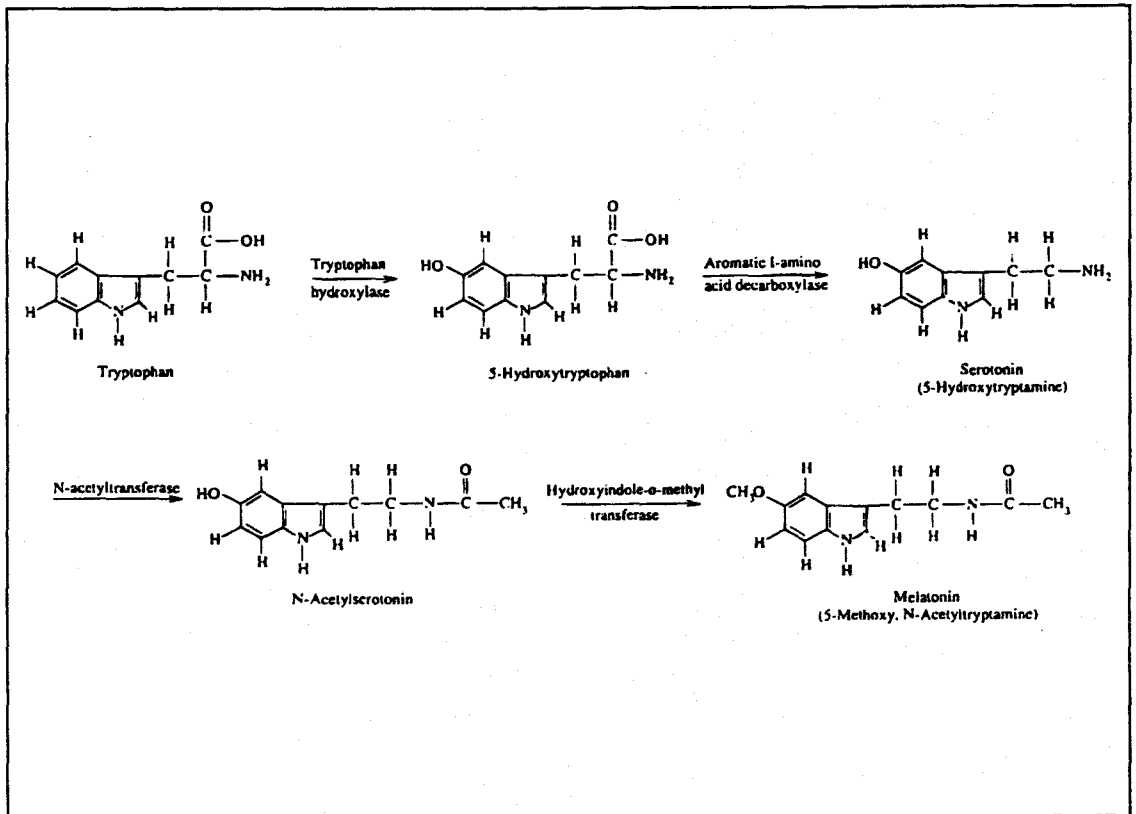


Figura 4: Metabolismo de la melatonina a partir del triptofano en la glándula pineal.

D-glucosa-6-fosfato cetol-isomerasa) con niveles mayores que en otras áreas cerebrales. No se han realizado estudios químicos sobre las características y papel en la pineal.

#### **I.1.6.7. Indolaminas pineales.**

Esta síntesis comienza con la captación del triptofano de la circulación. Una hidroxilasa le añade un hidroxilo en posición 5 del anillo indol, para formar 5-hidroxitriptofano. Una descarboxilasa elimina un grupo carboxilo de la molécula dando lugar a la 5-hidroxitriptamina (serotonina). Al extremo amino del radical de la serotonina, una N-acetiltransferasa (NAT) une un grupo acetilo, originando N-acetil-5-hidroxitriptamina, y una metiltransferasa (Hidroindol-o-metiltransferasa, HIOMT) transfiere un grupo metilo al hidroxilo de anillo indol, dando lugar a la melatonina (fig 4). Aunque la mayor parte de la serotonina sintetizada es convertida a melatonina, existen diferentes rutas metabólicas alternativas (figura.5). La serotonina puede ser convertida por una monoaminoxidasa (MAO) y una aldehído deshidrogenasa en ácido 5-hidroindolacético. También la serotonina puede convertirse en 5-metoxitriptofol por una aldehído reductasa y una hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT). Por último, la serotonina puede ser convertida a 5-metoxitriptamina por acción de la HIOMT.

#### **I.1.6.8. Productos indólicos de secreción.**

Aunque la melatonina es la hormona mejor conocida, las células de la pineal secretan otras indolaminas. El 5-metoxitriptofol, cuya concentración en la glándula pineal es 60-170 veces mayor que la de melatonina (Pévet, Balemans y Reuver, 1981b) es secretado a la circulación con un melaton patrón circadiano paralelo a la ina (Mullen y col, 1981).

Se ha surgido que la serotonina, cuya concentración es mayor en el tejido pineal



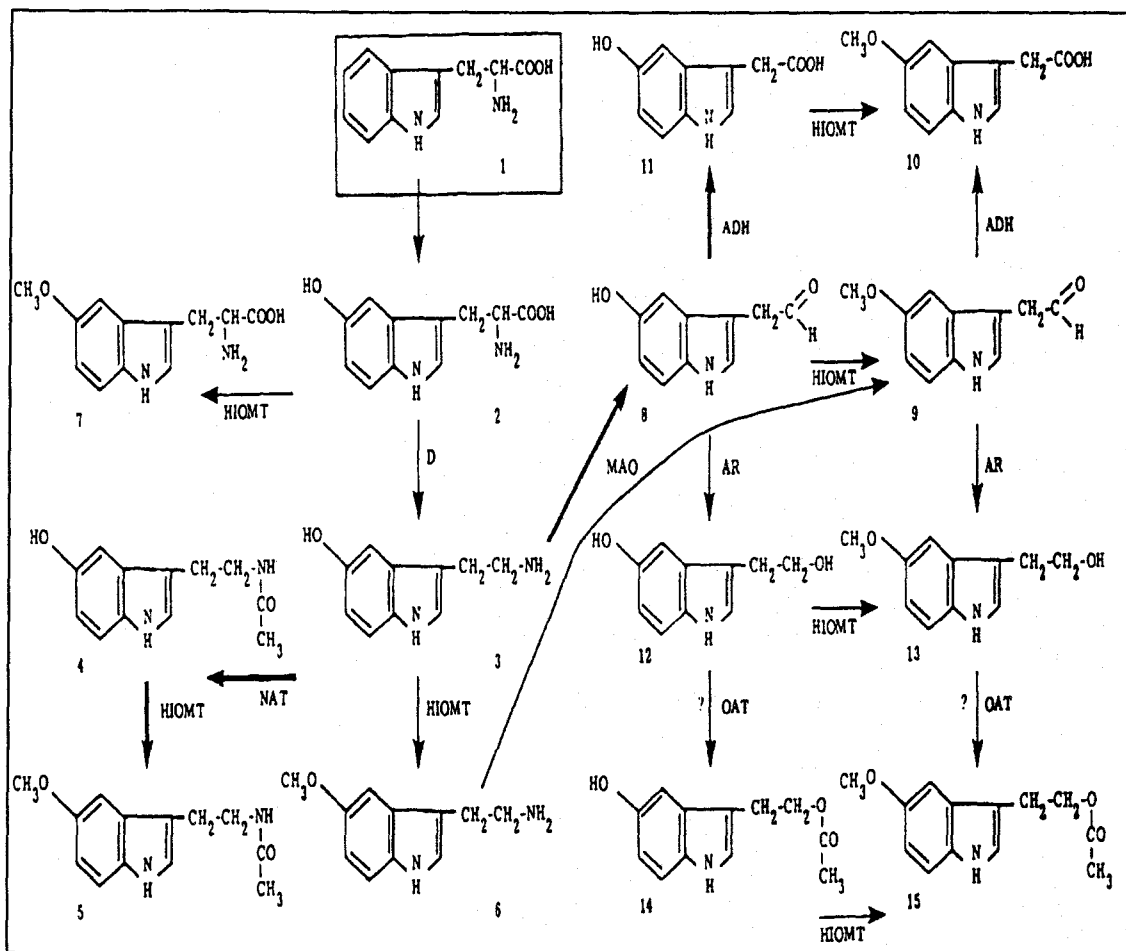


figura. 5: Síntesis de indoles en la glándula pineal. ADH, alcohol deshidrogenasa; AR, alcohol reductasa; D, descarboxilasa; HIOMT, hidroxindol-O-metil transferasa; MAO, monoamino oxidasa; NAT, N-acetiltransferasa; OAT, O-acetiltransferasa. 1, triptofano; 2, 5-hidroxitriptofano; 3, 5-hidroxitriptamina; 4, N-acetil 5-hidroxitriptamina; 5, melatonina; 6, 5-metoxitriptamina; 7, 5-metoxitriptofano; 8, 5-hidroxiindolacetaldehído; 9, 5-metoxiindolacetaldehído; 10, ácido 5-metoxiindolacético; 11, ácido 5-hidroxiindolacético; 12, 5-hidroxitriptofol; 13, 5-metoxitriptofol; 14, O-acetil-5-hidroxitriptofol; 15, O-acetil-5-metoxi-triptofol. (J. Arendt, 1985).

que en cualquier otro parénquima (0,5 mM) y sigue un ritmo circadiano inverso al de la melatonina con concentraciones en la glándula elevadas durante el día y descendidas durante la noche (Quay, 1963), o alguno de sus productos (p.e., 5-metoxitriptamina), puede ejercer una hipotética actividad endocrina. Experimentos *en vitro*, han mostrado que la incubación de tejido pineal en presencia de agonistas muscarínicos, incrementa la actividad de la proteína quinasa C y la liberación de serotonina (Finocchiaro y Téliez-Iñon, 1991).

#### **I.1.6.9. Péptidos pineales.**

Diferentes péptidos han sido también aislados de la pineal, el que más atención ha recibido ha sido la arginina vasotocina (AVT), descubierto en pineal bovina (Milcu, Pavel, Neacsu, 1963). Previamente este péptido había sido encontrado solamente en la neurohipofisis de vertebrados no mamíferos. Después de varios años de controversia, la existencia de AVT en la pineal de mamíferos fue aceptada por la mayoría de los pinealogos. Sin embargo, estudios con cromatografía líquida a alta presión (HPLC) y radioinmunoensayos con anticuerpos muy específicos, han puesto en duda de nuevo la presencia de AVT en pineales de mamíferos. La controversia puede deberse en parte a dificultades técnicas en la identificación de péptidos y , en parte , a variaciones circadianas y estacionales (Prechel, Audhya, Schlesinger, 1983).

Además de AVT, se han identificado en la pineal de mamíferos arginina vasopresina y oxitocina así como sus respectivas neurofisinas. Existen evidencias de que fibras que inervan la pineal procedentes de la comisura habenular, contienen estos péptidos. Además, se han descubierto en la pineal otros péptidos como la treonil-serinil-lisina, tripeptido miembro de la familia de péptidos derivados de la proopiomelanocortina (p.e., ACTH,  $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -endorfina), y componentes del sistema renina angiotensina, como indica la presencia de actividad renina, del enzima

convertidor e inmunoreactividad a la angiotensina II. También se han descrito péptidos similares a la hormona liberadora de tirotopina (TRH) y hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) que comparten con sus homologas hipotalamicas inmunoreactividad pero que tienen propiedades químicas diferentes.

#### **I.1.6.10. Otros compuestos pineales.**

Hay tres diversas clases de compuestos:

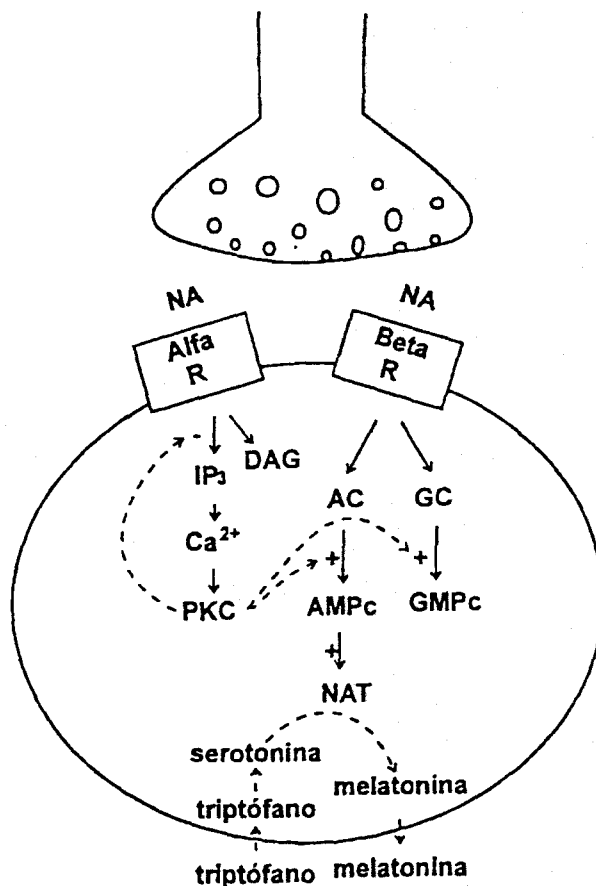
- la ubiquinina o coenzima Q es una quinona terpenoide asociada con la transducción energético en las células (mitocondrias). En pineal se ha encontrado una moderada cantidad (0,2 mg/Kg) de tejido (Fabre y col, 1965).
- Un componente fluorescente en una fracción de bajo peso molecular ha sido identificado como una pteridina con muchas de las características de 6-L-eritrobiopterina (Ebels y col, 1979).
- Pigmentos de tres clases se han encontrado en la glándula pineal humana y otros mamíferos (Quay, 1974) son:
  - \* Melanina
  - \* Hemosiderina
  - \* Lipofnesina.

#### **I.1.7. Síntesis de la melatonina.**

##### **I.1.7.1. Características generales de la NAT.**

La serotonina N-acetiltransferasa o arilalkilamina acetyl CoA N-acetiltransferasa (NAT) es el enzima que cataliza la síntesis de N-acetyl serotonina, precursora de la melatonina.

Es un enzima muy inestable y está considerado ser el paso limitante en la



**Figura. 6:** Regulación de la síntesis de la melatonina a través de receptores adrenérgicos. NA, noradrenalina; Alfa R, receptor  $\alpha$ -adrenérgico, Beta R, receptor  $\beta$ -adrenérgico ; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, 1,4,5 fosfoinositol; Ca<sup>2+</sup>, calcio iónico; PKC, proteína quinasa C; AC, adenilato ciclasa; GC, guanilato ciclasa; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; GMPc, guanosina monofosfato cíclico; NAT, serotonina N-acetiltransferasa.

producción de la melatonina. Su presencia es detectada a los tres o cuatro primeros días de nacimiento y sus variaciones cíclicas alcanzando los valores máximos a media noche coincidiendo con el pico máximo de producción de melatonina.

La NAT es un enzima soluble, localizado en el citoplasma del pinealocito, que actúa transfiriendo un grupo acetilo procedente del acetil CoA a la serotonina (Weissbach y cols, 1961). El acetil CoA es el donador de grupos acetilos, así como importante estabilizador de la actividad enzimática. Este enzima es diferente del que encontramos en hígado, sangre e incluso en la misma pineal (arilamina N-acetiltransferasa) que no es específica para los indoles pineales y no se estimula por los mismos mecanismos que la NAT (Voisin y cols, 1984).

#### **I.1.7.2. Síntesis de la melatonina.**

La melatonina corresponde químicamente a la 5-metoxi-N-acetilriptamina, siendo su precursora la serotonina ó 5-hidroxitriptamina. La biosíntesis de los indoles pineales se realiza a partir del triptofano (figura. 4). El triptofano sufre una hidroxilación mediante la acción de la triptofano hidroxilasa, presente en las mitocondrias de pinealocito. El 5-hidroxitriptofano resultante de estas hidroxilación es descarboxilado por L-aminoácido descarboxilasa aromática, dando lugar a la amina biogénica 5-hidroxitriptamina (serotonina), la serotonina bajo la acción de la N-acetiltransferasa (NAT), se convierte en N-acetilserotonina que pasará definitivamente a melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina) tras la O-metilación a la que es sometida por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT). Parece ser que el intermediario metabólico necesario para estos cambios bioquímicos, la S-adenosil metionina, se encuentra en gran cantidad en pineal de los mamíferos. La melatonina se degrada en el hígado vía 6-hidroxilación del anillo indólico. Su mayor producto catabólico es la

N-acetil-5-metoxi-6-hidroxitriptamina que es conjugada en el hígado y, en menor cantidad, el ácido 5-metoxindol-acético y otros compuestos no índoles reactivos.

La melatonina se encuentra relativamente en pequeñas concentraciones en la glándula pineal (Vaughan, 1981). No se ha descrito ningún mecanismo de transporte activo para la liberación de melatonina de los pinealocitos. Debido a que es liposoluble podría secretarse de los pinealocitos por difusión simple.

La melatonina se sintetiza primariamente en la glándula pineal y quizás, secundariamente, en la retina, glándula harderiana e intestinodelgado (Reiter y col, 1978). Tras su síntesis en pineal, es secretada al sistema vascular (Rollag y cols, 1978). En el hombre, el pico de melatonina alcanza cerca de la mitad de la fase de oscuridad, seguida de una reducción en los niveles de la misma durante la segunda mitad de la noche. La ceguera sin percepción de luz causa un ritmo de melatonina sanguínea de fase libre (Lynch y cols, 1978), con un periodo estimado ligeramente mayor de las 24 h, por lo que los niveles de melatonina en la sangre de estos ciegos pueden estar elevados en cualquier tiempo a lo largo del ciclo luz-oscuridad.

Cuando la glándula pineal humana es eliminada quirúrgicamente en procesos tumorales, el aumento de melatonina nocturno desaparece (Neuwelt y Lewy, 1983), sugiriendo que la melatonina no es liberada de una manera circadiana desde zonas extrapineales.

### **I.1.7.3. Regulación de la secreción de la melatonina por noradrenalina y relación con el fotoperiodo.**

La secreción de la melatonina está regulada por la actividad de las neuronas simpáticas que inervan la pineal. En pinealocitos, la unión de la noradrenalina (NA) liberada por las terminaciones simpáticas a los receptores adrenérgicos del tipo  $\alpha$  y  $\beta$

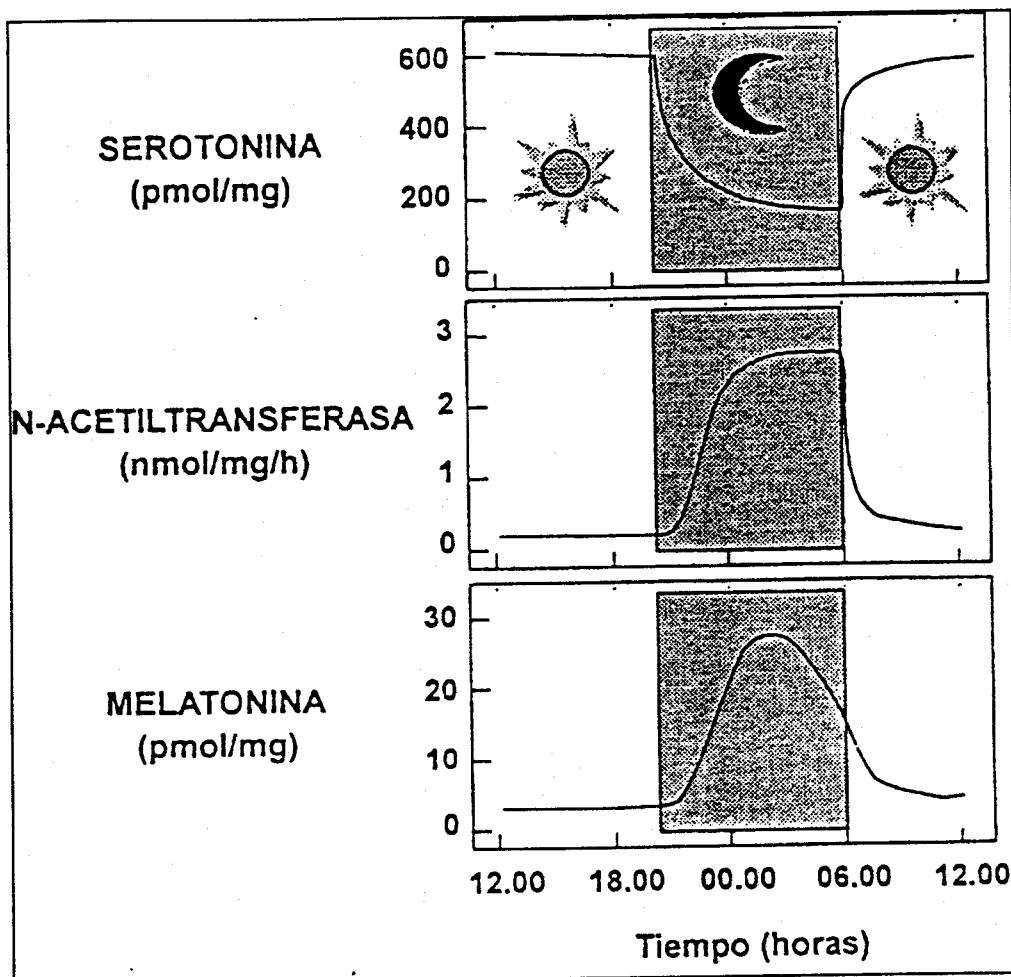


Figura. 7: Ritmos diarios de serotonina, N-acetiltransferasa y melatonina.

produce la estimulación de la N-acetiltransferasa (NAT), enzima limitante de la biosíntesis de la melatonina (fig.6).

La actividad de la NAT y la concentración de su substrato, serotonina y su producto, melatonina, en la pineal fluctúan con un ritmo circadiano, sincronizado con el ciclo luz-oscuridad. En todas la especies estudiadas, sean de actividad diurna o nocturna, el máximo de actividad de la NAT y de secreción de melatonina ocurre durante las horas de oscuridad. La secreción de melatonina es pulsátil (figura.7), en la mayoría de las especies coincide con la máxima actividad de las fibras simpáticas que inervan la pineal, y puede ser inducida mediante estimulación eléctrica del ganglio simpático cervical superior . En mamíferos, elementos cruciales para la sincronización de los ritmos biológicos son la glándula pineal y el núcleo supraquiasmático (NSQ), cuya actividad oscila con un ritmo circadiano en dogeno. Así, la síntesis de melatonina está controlada por el SNC, a través del NSQ y de las fibras periféricas noradrenérgicas que afieren a la pineal.

#### **I.1.7.4. La estimulación $\beta$ -adrenérgica.**

La noradrenalina (llamada también norepinefrina) desencadena la cascada del adinilato ciclasa por unión al receptor  $\beta$ -adrenérgicos, una proteína de 64 Kd, que atraviesa la membrana plasmática de las células dianas, la purificación de este receptor permitió la secuenciación y clonado de su gen. El perfil de hidrofobicidad de la proteína demostró que contiene siete hélices transmembranares (Fig.8). La estructura de un receptor con siete hélices transmembranares constituye una característica común, la región amino-terminal del receptor  $\beta$ -adrenérgico presenta oligosacáridos N-enlazados y se encuentra en la cara extracelular de la membrana. La carboxi-terminal que contiene serinas y treoninas que pueden ser fosforiladas reversiblemente se encuentra en la cara citosólica. El centro de unión para la adrenalina, se encuentra en



un bolsillo formado por las hélices transmembranares.

La mayoría de los receptores acoplados a la proteína G ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ...) Consisten en una larga cadena polipeptídica con siete dominios transmembranares. La variación existe entre los tipos de estas estructuras transmembranares entre familias de receptores, los dominios localizados en la superficie extracélular de las células incluido el amino-terminal (NT) y tres lazos, es decir, estos entre el dominio transmembranares II y III, entre IV y V, y entre VI y VII, como estos lazos son extracelulares se cree que no interaccionan con la Proteína G, o, moléculas reguladoras intracelulares, en cambio están implicados en la unión con el ligando. La secuencia del amino-terminal extracelular varía de una secuencia relativamente corta en receptores adrenérgicos y muscarínicos, a una secuencia bastante larga en receptores de unión a glicoproteínas.

Los dominios intracelulares del receptor incluido carboxiterminal y tres lazos, es decir, estos entre el dominio I y II (lazo 1), entre III y IV (lazo 2), y aquéllo entre V y VI (lazo 3). La secuencia conservada Asp-Arg-Tyr o la similar Glu-Arg-Tyr está presente en la porción del segundo lazo intracelular de la mayoría de los receptores a siete hélices y pueden ser importante en el acoplamiento a la proteína G. El dominio carboxi-terminal es intracitoplasmático, puede ser relativamente largo, y es rico en serinas y treoninas que son sitios de fosforilación de estos receptores.

Los receptores a siete dominios transmembranares están acoplados a una larga familia de proteínas G para desencadenar un flujo de información intracelular a las moléculas efectoras, uno de los ejemplos es el receptor  $\beta$ -adrenérgico, lo cual estimula dos trayectorias de segundos mensajeros (adenilato ciclasa y los canales  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la activación de la proteína  $G_{sa}$  (Birnbaumer y cols., 1990).

Las proteínas G son heterotrimeros, compuestos por tres distintas subunidades: La subunidad  $\alpha$  (masa molecular = 39-46 Kda),  $\beta$  (37 Kda),  $\gamma$  (8 Kda). Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  existen como un complejo asociado funcionando unidos, a pesar de

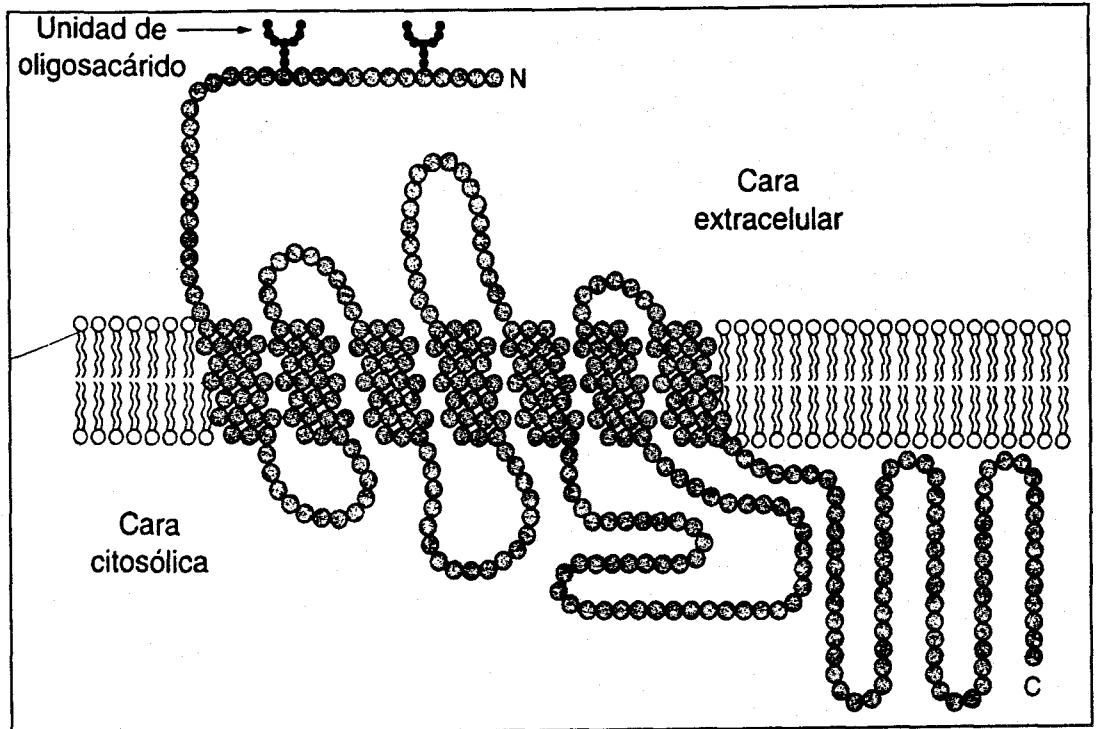


Figura. 8: Estructura de siete hélices del receptor  $\beta$ -adrenergico.

que el complejo  $\beta\gamma$  puede ser aparentemente compartido entre las diferentes subunidades  $\alpha$  de los otros heterotrimeros. La identidad de la subunidad  $\alpha$  actualmente esta utilizada para definir individualmente las proteínas G. Así, la subunidad  $\alpha$  tiene el único sitio de unión de alta afinidad para el nucleotido guanina (GDP, o, GTP). El GDP unido a la subunidad  $\alpha$  que esta asociada al complejo  $\beta\gamma$  esta en forma inactiva, mientras que la unión de GTP a la subunidad  $\alpha$  permite la disociación de este ultimo del complejo  $\beta\gamma$  y puede servir como regulador de las proteínas efectoras.

Cuando el agonista se une al receptor, este ultimo cambia a un estado de alta afinidad por el agonista y induce un cambio conformacional en la protein  $G_s$  y provoca su activación teniendo lugar a un proceso de intercambio de GDP por GTP y también tiene una actividad GTPasa así tiene un sistema de desactivación cambiando GTP por GDP, de esta forma, la proteína  $G_s$  se disocia en un dímero  $G\beta\gamma$  y un complejo activo  $G\alpha$ -GTP que interacciona con al adenilato ciclasa (AC) una proteína situada en la cara interna de la membrana plasmática, la adenilato ciclasa activada convierte el ATP en AMPc, así la biosíntesis de AMPc en el citoplasma constituye el resultado de la transmisión de la señal desde el espacio extracelular hasta el interior de la célula.

En ratas y presumablemente otros mamíferos, el ritmo circadiano de la actividad de NAT esta controlado por el sistema fotoneural que incluye el nucleo suprachiasmático (SCN)(Klein y Moore, 1979). La estimulación esta originada en el SCN y transferida hasta la glándula pineal vía un circuito usando estructuras nerviosas centrales y periféricas. La glándula esta inervada primero por proyecciones postganglionaria a partir del ganglión cervical superior (SCG). Así la luz actúa sobre la actividad de NAT en pineal de ratas indirectamente a través de proyecciones retinohipotalámica que terminan en el SCN (Moore y Klein, 1974), entonces la luz bloquea las estimulaciones del SCN sobre la glándula pineal durante la noche (Klein, 1985) llevando a una disminución rápida de la actividad de la NAT ( $t_{1/2} \approx 3\text{min}$ ) (Klein

y Weller, 1972). El núcleo suprachiasmático envía señales de estimulación que tienen como resultado la liberación de la norepinefrina, la cual actúa a través de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos y induce en glándula pineal de rata un gran incremento nocturno de la síntesis de melatonina, estimulando la serotonina N-acetiltransferasa (NAT) (Klein, 1970), a través de un incremento de los niveles citosólicos de AMP cíclico (Klein, 1978). Como se ilustra en el esquema de la figura.9, el incremento del AMPc en pinealocitos inducido por Ne está mediado por receptores adrenérgicos  $\beta$  que activan la adenilato ciclasa. La estimulación  $\beta$ -adrenérgica también induce un incremento de los niveles de GMP cíclico (Klein, 1981).

Estudios en la rata indican que el AMPc estimula la activación de la NAT a través de un mecanismo que requiere una expresión de un gen y la síntesis de proteínas (Axelrod, ). Hasta recientemente poco se conoce sobre el mecanismo de regulación de estos cambios día-noche de la actividad NAT. Análisis de tejidos de rata revelan que ARNm de NAT (1,7 Kb) está detectable por Northern blot sólo en pineal y retina (Roseboom y cols, 1996). El AMPc incrementa el mensajero de la NAT sugiriendo que la activación de cualquier receptor que aumenta la producción del AMPc también incrementa el mensajero de la NAT. Así, el tratamiento de la glándula pineal con Ne y VIP lo cual aumenta la producción de AMPc (Chik y cols, 1988), demuestra que la Ne induce un aumento en el mensajero de la NAT que VIP (Roseboom y cols, 1996) El ARNm de la NAT en pineal de rata está en cantidades bajas durante el día y incrementa más de 150 veces durante la noche (Roseboom, . Bernard y cols, . 1995) lo cual es similar a la actividad enzimática (Axelrod 1). El ritmo del mensajero de la NAT en pineal de rata es circadiano y está regulado de la misma manera que la actividad enzimática de la NAT.

El gen de la NAT representa una nueva familia génica dentro la superfamilia de las acetiltransferasas, caracterizada por tener dos dominios de aminoácidos

conservados, denominados A y B (Coon y cols., 1995)(fig.10). En la NAT existen lugares de fosforilación con dos dominios RRXS/T, localizados en las regiones amino y carboxilo terminal que pueden ser fosforiladas por kinasa dependientes de nucleótidos cíclicos, además en la secuencia de NAT de rata encontramos unos dominios de unión de acetilCoA (dominios A y B) lo cual caracteriza la superfamilia de acetiltransferasa es decir que todas las proteínas con estos motivos son acetiltransferasas y las mutaciones en estos dominios anulan la actividad catalítica del enzima (Tercero y cols, 1992).

Ultimamente el gen humano de NAT fue clonado (~2,5 kb, excluyendo al promotor) (Coon y cols, 1995) y que se encuentra en el cromosoma 17 (17q25) y no parece estar asociado con ninguna anomalía genética (Coon y cols, 1996). El gen de la NAT se transcribe en un sólo ARNm de diversos tamaños en función de la especie (0,95 kb en el hombre, 1,6 en el pollo, 1,7 en la rata), siendo idénticos en un 80% aproximadamente en la región codificante y en un 30% aproximadamente en las regiones 5' y 3'. En el caso de mamíferos, la identidad es de 70% en las regiones flanqueantes 5' y 3' (Roseboom y cols, 1996, Bernard y cols , 1997).

Por otra parte, hay una región rica en residuos histidina, que incluye al motivo A, algunas de estas histidinas podrían participar en la N-acetilación de la serotonina a través de sus grupos imidazol. La concentración de grupos imidazol en esta región podría verse aumentada si se formara un bucle de histidina en el motivo A, tal como predicen los modelos estructurales realizados por ordenador (Schulz, 1992). Además, es sabido que los residuos histidinas mantiene a su vez las estructuras en bucle (Rees y cols, 1993). Todo ello hace pensar en un papel no sólo funcional, sino también estructural, de las regiones ricas en histidina de la NAT. La NAT se inactiva por compuestos que contienen grupos disulfuro, como algunos péptidos y la cistamina (Namboodiri y cols, 1981). Uno o más de los cinco residuos de cisteína conservados

en las diversas NAT podrían jugar un papel fisiológico mediando esta inactivación química. La especificidad de la NAT se caracteriza por su alta selectividad para algunas arilalquilaminas sin embargo no presenta ninguna afinidad por las arilaminas y su función fisiológica se limita en la acetilación de la serotonina. Sin embargo, el enzima podría tener un papel fisiológico en el metabolismo de las aminas de la dieta, como la tiramina.

#### **I.1.7.6. Regulación circadiana de la expresión génica de NAT.**

Las fluctuaciones circadianas en el control de la secreción también se han puesto de manifiesto a nivel molecular en la glándula pineal. La expresión génica de NAT es rítmica y esta sometida a un doble regulación adrenérgica, positiva y negativa, inducida por AMPc (figura. 9). Los aumentos de AMPc citosólico provocan un aumento de los niveles de ARNm para la NAT, probablemente a través de la PKA dependiente de AMPc que fosforila a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) para formar la proteína activa (fosforilada) de este factor de transcripción (PCREB) (Roseboom y cols, 1996), cuyo producto de expresión es un regulador positivo de la síntesis de NAT, y por otro lado, el AMPc induce, con un retraso de 6-9 h, la síntesis de uno o más factores que inhiben el incremento de ARNm de la NAT (Roseboom, y cols, 1996). La identidad de estos factores puede ser el antígeno 2 relacionado con Fos (Fra-2), junto con la proteína de respuesta temprana inducida por AMPc (ICER) (Stehle y cols, 1993; Baler y Klein, 1995). Los cambios circadianos en los niveles de Fra-2 son consistentes en tiempo y magnitud con un efecto inhibitor sobre la expresión del gen de la NAT y del propio Fra-2 (Klein, 1996).

#### **I.1.7.5. La estimulación $\alpha_1$ -adrenérgica y la potenciación de la síntesis de nucleótidos cíclicos.**

La activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  en células pineales estimula la hidrólisis de un fosfolípido constituyente de membrana, el fosfatidilinositol, a través de la activación de la fosfolipasa C. El fosfatidilinositol da lugar a la liberación de dos segundos mensajeros, el 1,4,5 inositol trifosfato y el diacilglicerol, IP<sub>3</sub> y DAG, respectivamente (figura. 9).

La activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos potencia la activación de AMPc y GMPc inducida por estimulación  $\beta$ -adrenérgica (Klein, 1981). La estimulación  $\beta$ -adrenérgica produce un incremento de 6 y 2 veces el contenido de AMPc y GMPc respectivamente. La estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica no tiene efecto alguno en modificar las concentraciones de estos nucleótidos cíclicos. La activación conjunta de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  incrementa 60 y 400 veces el contenido basal de AMPc y GMPc, respectivamente (Vanecek y col, 1985).

La interacción sinérgica entre la estimulación de receptores  $\alpha$  y la estimulación de los  $\beta$  se produce a través de la activación de una proteína quinasa C (figura. 9). Se ha demostrado que la síntesis de AMPc y GMPc, por estimulación de la adinilato ciclasa y guanilato ciclasa, respectivamente, inducidas por activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, es potenciada por la proteína quinasa C (Sugdan y col, 1985; Ho, Chik, Klein, 1987). Para que ocurra esta potenciación es esencial la entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el medio externo, pues en ausencia de éste se reduce la respuesta de nucleótidos a la Ne. La sola activación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos eleva parcialmente los niveles de ARNm de la NAT (Roseboom y cols, 1996) sin alterar el estado de fosforilación de CREB (Roseboom y Klein 1995). Esto reflejaría la existencia de un elemento de respuesta en el promotor de la NAT, que mediaría los efectos de la estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica, los cuales incluyen aumentos en los niveles de Ca<sup>2+</sup> y

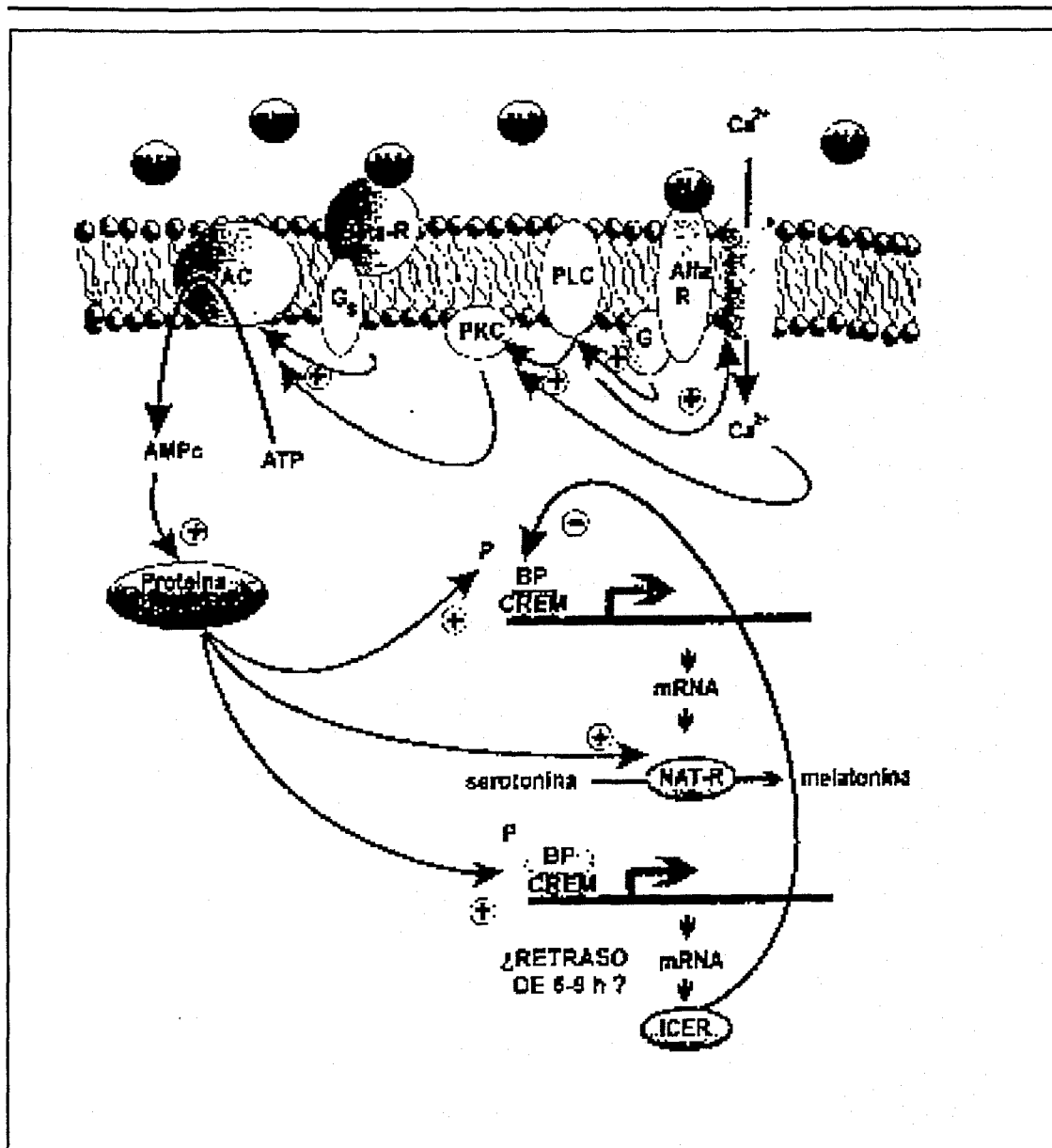


Figura. 9: Esquema de la regulación adrenérgica de biosíntesis de la melatonina a nivel molecular. AC, adenilato ciclasa; G, proteína G; NA, noradrenalina; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C, BP, proteína que se une a elementos reguladores; CREM, gen elemento modulador inducido por AMPc; ICER, represor temprano inducible por AMPc; NAT-R, regulador de la expresión de N-acetiltransferasa. Modificada de Zast, 1982.



	1			*	+		60
Rat	..mSiHpLK	PeaLHLPlGt	seflGcQRRH	TLPAsEFRCL	TPEDatsaFE	IEREAFISVS	
Sheep	mstpSvHcLK	PspLHLPSGi	pgspGrQRRH	TLPAnEFRCL	TPEDAagvFE	IEREAFISVS	
Consensus	----S-H-LK	P--LHLP-G-	----G-QRRH	TLPA-EFRCL	TPEDA---FE	IEREAFISVS	
	61				+		120
Rat	GtCPLhLDEi	rHFLTLCPeL	SLGWFeEGcL	VAFIIGSLWD	KERLTQESLt	LHRPgGrTAH	
Sheep	GnCPLnLDEV	qHFLTLCPeL	SLGWfVEGrL	VAFIIGSLWD	eERLTQESLa	LHRPrGhsAH	
Consensus	G-CPL-LDE-	-HFLTLCPeL	SLGWf-EG-L	VAFIIGSLWD	-ERLTQESL-	LHRP-G--AH	
	121	#					180
Rat	LHvLAVHrTF	RQQGKGSVLL	WRYLHHlGsQ	PAVRRAVLMC	EnALVPPFYek	FGFqamGPCA	
Sheep	LHaLAVHRsF	RQQGKGSVLL	WRYLHHvGaQ	PAVRRAVLMC	EdALVPPFYqr	FGFhpaGPCA	
Consensus	<u>LH-LAVHR-F</u>	<u>RQQGKGSVLL</u>	WRYLHH-G-Q	PAVRRAVLMC	E-ALVPPFY--	<u>FGF---GPCA</u>	
		motif A				motif B	
	181	+	#	*			
Rat	ItmGSLTFTE	lqCSLRCHtf	LRRNSgc				
Sheep	IvvGSLTFTE	mhCSLRgHaa	LRRNSdr				
Consensus	I--GSLTFTE	--CSLR-H--	LRRNS--				

Figura.10: Comparación de la secuencia de amino ácidos de la NAT en rata y oveja

activación de la fosfolipasa A, la fosfolipasa C y la proteína quinasa dependiente de fosfolípidos (Ho y Klein, 1987; Ho y cols, 1988).

Sugdan y col, han demostrado que la entrada de  $Ca^{2+}$  no se bloquea por nifedipina (1  $\mu M$ ), aunque si la inducida por despolarización con alto  $K^+$  (Sudan, Sugdan, Klein, 1987). El aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  es suficiente para inducir activación de la proteína quinasa C (Ho y col, 1988).

Además de la implicación de la proteína quinasa C en la acumulación de nucleótidos inducida por Ne, dado que el tratamiento con activador de la proteína quinasa C inhibe el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por agonistas  $\alpha$  y la acumulación de nucleótidos, parece que la proteína quinasa C esta implicada en el mecanismo de autorregulación negativa (figura. 9), sensibilizando la vía de la estimulación  $\alpha_1$  (Sugdan y col., 1988).

#### **I.1.7.7. Regulación de la síntesis de melatonina por otros receptores de membrana.**

Todos los receptores identificados en la glándula pineal no se localizan en la membrana del pinealocito. En la pineal de aves, p.e, la síntesis de melatonina es inhibida con agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos actuando sobre receptores específicos, que también se localizan en la glándula pineal de mamíferos (Simoneaux, Ebadi y Belund, 1991). No obstante, se cree que los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no estarían ubicados en la membrana del pinealocito sino en el terminal nervioso simpático (Cardinali y col, 1987).

Otros receptores, (fig. 11), como los dopaminérgicos ( $D_1$  y  $D_2$ ) tienen efectos opuestos sobre la actividad de la NAT, dependiendo de la concentración, inhibiéndola a 0,1  $\mu M$ , no teniendo efecto a concentraciones entre 1-10  $\mu M$  y estimulándola a concentraciones mayores de 10  $\mu M$  (Govitropong 1989). La activación de receptores gabaérgicos en la glándula pineal bovina, no altera la actividad basal de la NAT, pero

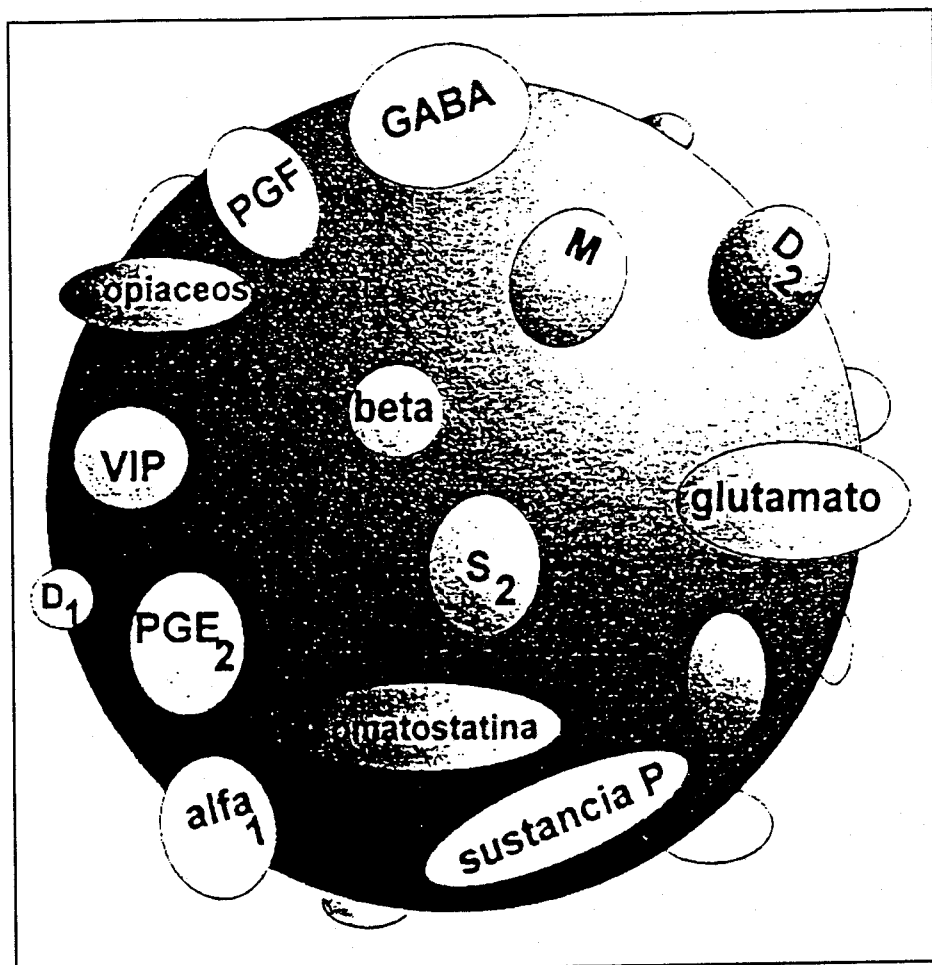


Figura.11:Receptores de membrana identificados en la glándula pineal. Muscarinicos (M),  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Alfa-1),  $\beta$ -adrenérgicos (Beta), serotoninérgicos ( $S_2$ ), dopaminérgicos ( $D_1$  y  $D_2$ ), prostaglandínicos  $PGF_1$  y PGE, opioaceos, glutamatérgicos, gabaérgicos, VIP (peptido intestinalvasoactivo), somatostatina, sustancias P, etc.

inhibe la estimulación de la NAT inducida por NA (Chan y Ebadi, 1980). La activación de los receptores opiáceos existentes en la glándula pineal incrementan la actividad de la NAT (Govitrapong, Pariyanouth y Ebadi, 1992). Además, se ha identificado la existencia de otros receptores, de serotonina ( $S_2$ ), etc, cuyo papel funcional no es aún conocido.

Los receptores muscarínicos de la glándula pineal son funcionantes, carbacol, un agonista muscarínico estimula la hidrólisis y el recambio del fosfoinositol (PI) y esta estimulación puede ser bloqueada con un antagonista muscarínicos selectivo de los receptores  $M_1$  (Laitinen, Torda, Saavedra, 1989). La activación de los receptores colinérgicos muscarínicos de la glándula pineal bovina inhibe la activación de la NAT (Phansuwan-Pujito, Govitrapong y Ebadi, 1991). La aplicación de agonistas muscarínicos colinérgicos, incrementa la producción metabólica de 5-hidroxitriptófano y serotonina (Finocchiaro y col, 1989) y aumenta la actividad de la proteína quinasa C en la glandula pineal de rata (Finocchioro y Tellez-Iñon, 1991).

#### **I.1.7.8. Acciones de la melatonina.**

El papel funcional de la melatonina es su capacidad para hipigmentar la piel de los anfibios al producir concentración de los gránulos de melanina (McCord y Allen, 1987). Sin embargo, esta acción bien documentada en anfibios parece no tener lugar en la piel de los mamíferos.

En mamíferos, el efecto de la melatonina sobre la actividad reproductora ha sido demostrada en muchas especies. La melatonina actuando sobre el eje neuroendocrino reproductor regula la periodicidad en el apareamiento de especies sometidas al fotoperiodo natural (Reiter, 1980). Correctamente la melatonina sincroniza el ciclo anual reproductivo de los reproductores de días largos y días cortos y aunque en algunas especies ,p.e, hámster sirio la melatonina tiene efectos antigonadotróficos,



en otros (p.e, la oveja) son progonadotróficos.

El ritmo de la melatonina es un mensaje endocrino con capacidad de modificar la actividad reproductora dependiendo de la capacidad de respuesta del sistema en el momento que recibe la información.

La melatonina modula la secreción de todas las hormonas clásicas de la adenohipófisis. Así, Además de la prolactina, hormona foliculoestimulante, y hormona luteinizante, la melatonina modifica la secreción de la hormona del crecimiento, hormona adrenocorticotropa, hormona estimulante del tíoide así como hormona estimulante de los melanocitos. Adicionalmente, las hormonas de la hipófisis posterior están bajo la influencia de la melatonina.

Otros ejemplos de sistemas endocrinos modulados por melatonina lo constituyen, la liberación de insulina por la célula  $\beta$ , la síntesis de progesterona en las células del cuerpo lúteo del ovario y las hormonas gastrointestinales (Relkin, 1983).

Durante años se ha sabido que la melatonina impide la replicación celular, y más recientemente se han definido sus propiedades oncostáticas. Especialmente, en relación con los tumores de mama, con receptor estrogenico positivo, el cáncer de próstata, y los carcinomas de colon, la melatonina ha demostrado tener importante acciones inhibitorias (Blask, 1984). En general, la melatonina parece tener un efecto inmunocompetente particularmente aparente en estados inmunodepresivo. La producción de anticuerpos en animales inmunizados con antígenos y tratados con melatonina es significativamente mayor que en animales a los que sólo se les administró el antígeno (Maestroni, Conti, Pierpaoli, 1989). Este efecto inmunocompotente parece estar mediado por péptidos opiodes derivados de los linfocitos T "helper" así como por linfoquinas (Maestroni, 1993).

En estudios recientes, se ha mostrado que la melatonina es un neutralizador muy eficiente del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), radical libre de elevada toxicidad y del radical

piróxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) (Tan y col, 1993, Pieri y col, 1994). La capacidad neutralizadora de radicales libres de la melatonina es significativamente mayor que la del glutatión (Meister, 1992), conocido antioxidante. Además de la melatonina estimula la glutatión peroxidasa (Barlow-Walden, 1995) que transforma el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), precursor del  $\cdot\text{OH}$ , en agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), oxidando el glutatión reducido. La melatonina tiene una eficiencia neutralizadora del radical piróxilo, radical generado durante la peroxidación de lípidos que produce destrucción de membranas biológicas, mayor que la vitamina E (Packer, 1994). Concentraciones fisiológicas de melatonina inhiben la síntesis de óxido nítrico (Pozo y col, 1994) que genera ( $\text{NO}\cdot$ ) que puede dar lugar a  $\cdot\text{OH}$ .

Estudios *in vivo* han demostrado que la melatonina es realmente potente en proteger del daño inducido debido a la administración de carcinógenos (safrol) (Tan y col, 1994), radiaciones ionizantes (Vijayalax, 1995) y tóxicos (endotoxina bacteriana LPS) (Sewerynek y col, 1995, Reiter 1995) cuyo mecanismo de acción es debido, al menos en parte, a la inducción de radicales libres.

## **I.2. LA GLÁNDULA HARDERIANA.**

La glándula Harderiana fue descubierta por Harder en el año 1694, es una glándula localizada en caso de mamíferos en la zona medioposterior de la cavidad ocular. La glándula Harderiana es una glándula largada y tuboalveolar que tiene una membrana nictatina (Davis, 1929) (fig. 12).

La morfología de la glándula Harderiana es una glándula exocrina que secreta lípidos por exocitos (Wooding 1980, Sakai y Yohro 1981, Winterhager y Kühnel 1983), aunque en rata y hámster parece existir mecanismos de secreción endocrino.

Bioquímicamente, las secreciones de la glándula contiene sustancias como 1-alkyl-2,3-diacilglicerol (Otsuro et al, 1983), y porfirinas (Jackson et al 1976, Akagi et al 1987). También se han descrito muchas funciones fisiológica incluido secreciones de foromonas (Payne 1977, 1979, Harriman y Thiessen 1985; Johnston 1986), Termorregulación (Thiessen et al 1977, Thiessen y Kihrell 1980, Thiessen 1980), y la fotorecepción (Wetterberg et al 1970a, Pevet et al 1984), lo cual no tiene nada que ver con el ojo.

### **I.2.1. Organización histológica.**

La glándula Harderiana contiene muchos lóbulos variando de una especie a otra, en rata y ratones los lóbulos forman un conducto secretorio simple. La glándula Harderiana es el tipo de glándula exocrina con alveoles los cuales dan tubulos, la porción terminal de la glándula esta compuesta de alveoles separados por tejido conectivo localizado en la glándula. Estas alveoles esta rodeadas por masas celulares, cada alveolo contiene uno o dos tipos de células secretoras y mioepiteliales.

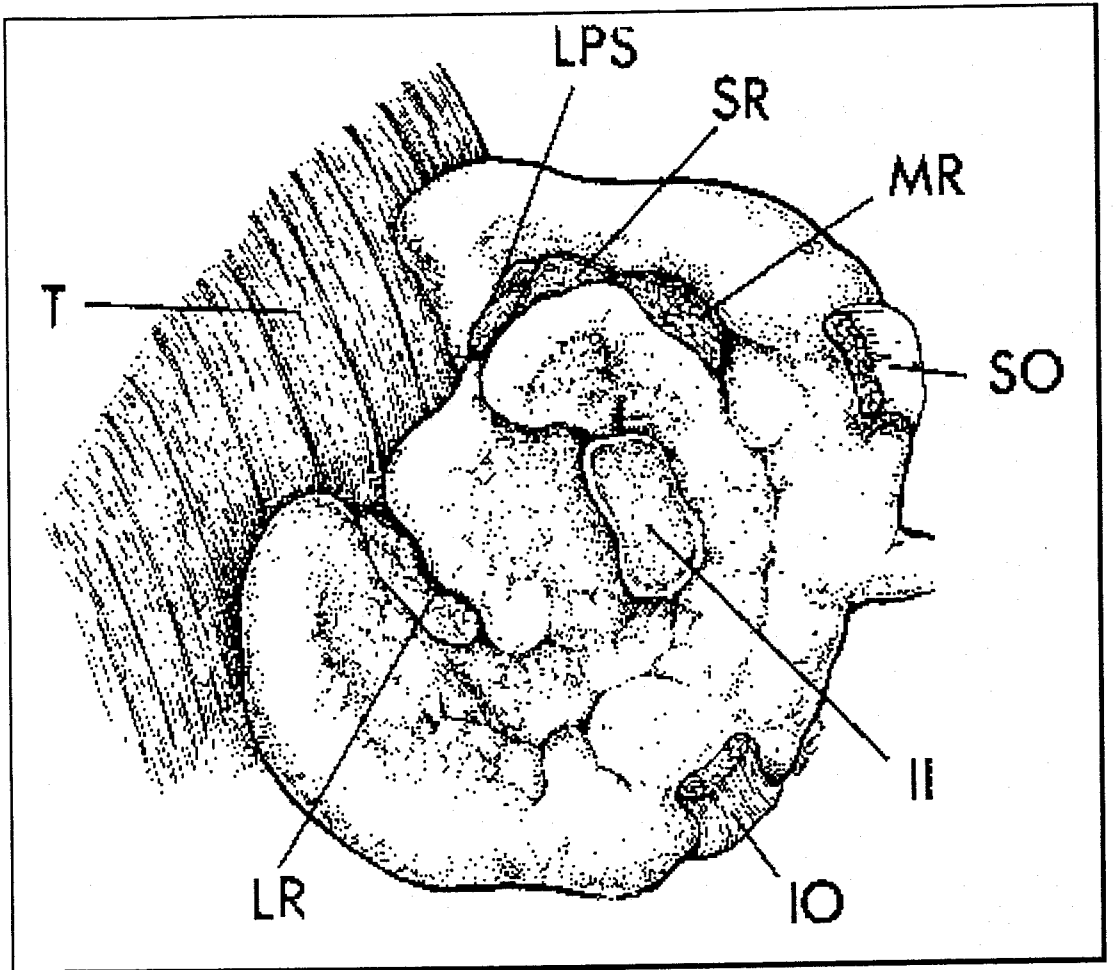


Figura. 12: Glándula Harderiana de rata y estructuras anexas. II, nervio óptico; LPS, LR, MR, SR, IO, SO, diversos músculos de la zona; T, músculo temporal. (Tomado de Payne, 1994 con modificaciones).



### **I.2.2. Secreción del epitelio.**

En ratas dos tipos de células secretoras encontradas (tipo A y B), (fig. 13), en el epitelio glándular (Grafflin 1942, Kanwar 1960, Rapin 1962, Müller 1969a,b, 1970) Estas células tipo A y tipo B coexisten en el mismo alveolo (Brownscheidle y Niewenhuis 1978).

En ratas las células de tipo A son más numerosas y están caracterizadas por un gran numero de vacuolas secretorias encontradas en todas partes del citoplasma.

Las vacuolas tienen un diámetro máximo cerca de 2,5  $\mu\text{m}$ , sus formas son variables y contienen sustancias lipídicas y material granular filamentoso (Brownscheidle y Niewenhuis 1978, Carriere 1985). Las células de tipo B son menos frecuentes que las células de tipo A, las vacuolas secretorias del citoplasma son menos numerosas y pequeñas que aquellas de células de tipo A con un diámetro máximo de 1,7  $\mu\text{m}$ . El citoplasma de células de tipo B contienen numerosas mitocondrias, extenso retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Watanabe, 1980, Brownscheidle y Niewenhuis 1978). En ambos tipos celulares podemos encontrar cortas que se extienden hasta la luz de la glándula (Brownscheidle y Niewenhuis 1978) . En la glándula Harderiana de hámster estas diferencias entre las dos poblaciones celulares han sido muy estudiadas (fig. 14), ya que existe un marcado dimorfismo sexual respecto a la concentración en la glándula de cada tipo de células. Así, los machos presentan ambos tipos celulares A y B, mientras que las hembras presentan uno solo, las células de tipo A (Hoffman, 1971). Este dimorfismo parecía estar regulado por las hormonas sexuales, en correcto por los andrógenos ya que si se castraba a un macho se producía un cambio histológico, convirtiendose esta en una glándula típica de hembra (Lin y Nadakavukaren 1979). Strum y Shear (1982) han demostrado que las gotas lipídicas de las células de tipo A en el raton muestra un rojo fluorescente pero no en células B. A partir de este resultado Strum y Shear han dado la conclusión que las

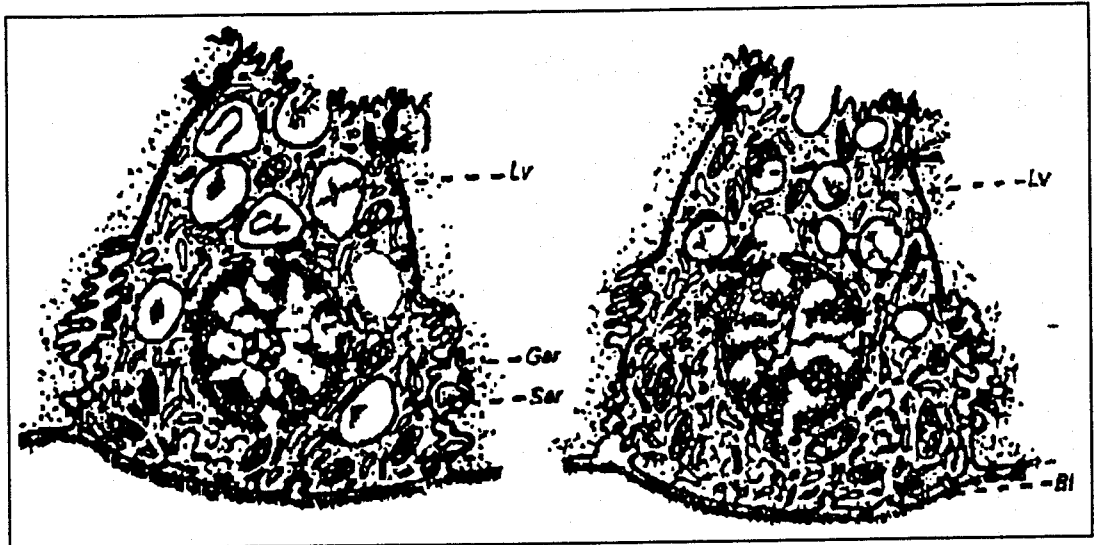


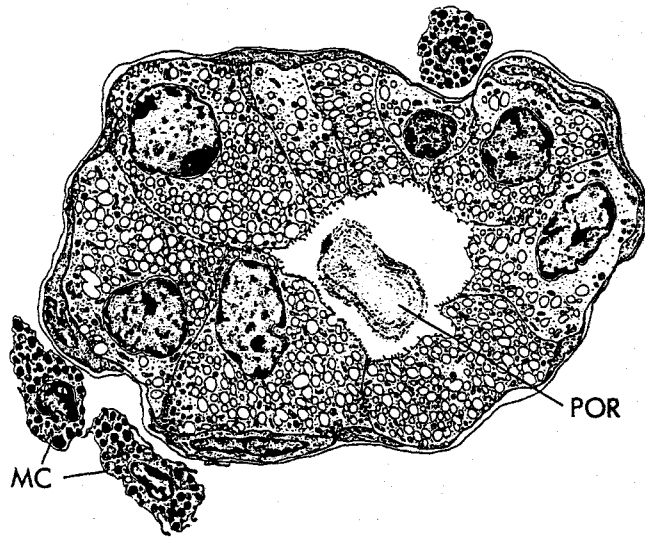
Figura. 13: Células tipo A (izquierda) y tipo B (derecha) de la glándula Harderiana de rata. Lv: vesículas lipídicas; Bl: lámina basal. (Tomado de Payne et al., 1994).

porfirinas están presente en las gotas lipídicas de las células de tipo A, un componente esta identificado en las vacuolas secretorias de las células de tipo B sugiriendo que las células de tipo B pueden producir la porfirina (Watanabe 1980).

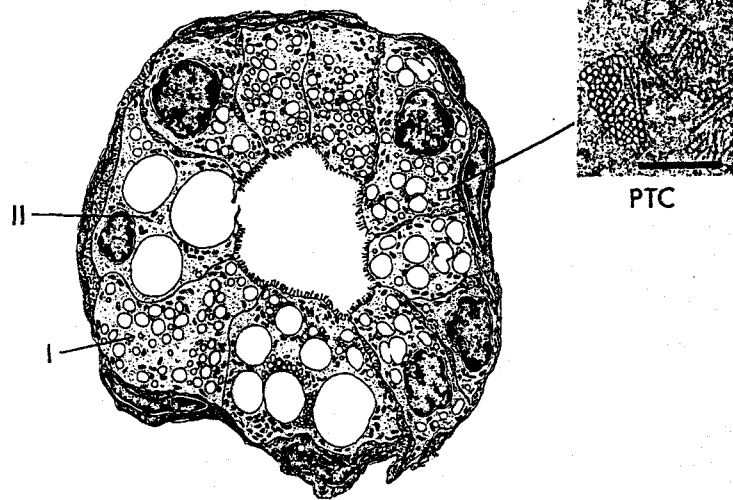
### **I.2.3. Inervación de la glándula Harderiana**

Las fibras nerviosas autonómicas se han encontrado en glándula Harderiana de ratas (Arvy1959; Tervo y col 1968; Huhtala y col 1977; Brownscheidle y Niewenhuis, 1978) y en glándula Harderiana de ratones (Watanabe, 1980; Strum y Shear, 1982). La glándula Harderiana recibe la inervación colinérgica con terminaciones nerviosas alado de las células mioepiteliales, Tashiro y col en 1940, ha informado que la inyección del acetilcolina a las ratas induce a la secreción desde la glándula Harderiana las "lagrimas sangrientas" (pigmento porfirina). Este fenómeno se puede explicar por: la inervación colinérgica de las células mioepiteliales causa una contracción y después la expulsión del producto secretado, así que en 1977 Huhtala y col. Afirma que las fibras colinérgicas que inervan la glándula harderiana están derivados del nervio zigomático. Además la zigomatoctomía disminuye o reduce de un forma significativa la cantidad de porfirina en la glándula Harderiana (Shirama y col, 1979). Las terminales nerviosas adrenérgicas lo cuales contienen vesicular claras localizadas, en el caso de la rata, cerca de la lamina basal de las células secretoras han sido encontrados asociados a los vasos sanguíneos. Por otro lado, Huhtala y col (1977), ha demostrado, usando la técnica de denervación selectiva, que las fibras nerviosas adrenérgicas están originadas en el ganglio cervical superior. Además de la inervación adrenérgica y colinérgica, la inervación péptidérgica ha sido demostrada. Usando las técnicas inmunohistoquímicas, Tsukahara y Jacobowitz (1987), han demostrado que existe una reacción positiva al neuropeptido Y, neurotensina y especialmente al péptido intestinal vasoactivo (VIP) y colesistokinina. Después Gauquelin y col (1988) ha

**Fig. a.**



**Fig. b**



**Figura. 14. a:** Morfología de las células tipo B en glándula Harderiana de hámster hembra. Observense además las células cebadas (MC) y los acúmulos luminales de porfirinas (POR). (Tomado de Payne et al., 1994). **b:** Células tipo A (II) y B (I) en glándula Harderiana de hámster macho. PTC: complejo politubular (la barra equivalente a 25  $\mu\text{m}$ ). (Tomado de Payne et al., 1994).

demostrado la presencia en glándula Harderiana de la oxitocina, arginina vasopresina y la neurofisisina.

#### **I.2.4. Vascularización de la glándula Harderiana.**

En la glándula Harderiana de rata el suministro arterial se hace vía la rama inferior del arterial oftálmico (Greene, 1935). En el interior de la glándula muchos capilares son finestrados (e.g, en el ratón, Strum, Shear 1982), y están yuxtapuestos a las células epiteliales. En hámster (Menéndez-Pelaez 1990) y en rata (Rodríguez-Colunga, resultados no publicados), los capilares en sus mayoría son sinusoidales, largos y variables. Estos vasos se extienden a través del tejido conectivo asociado a células secretoras. Los capilares sinusoidales son típicos de las glándulas endocrinas poniendo siempre en evidencia zonas de alto transporte. Aunque la glándula Harderiana se comporta como una glándula exocrina en lo que se refiere a la secreción de lípidos, hoy día, se ha sugerido una posible función endocrina que podría tener una interacción hormonal con la glándula pineal respecto a la producción de la melatonina (MEL) (Panke y col 1979).

#### **I.2.5. Productos de secreción de la glándula Harderiana.**

Los materiales de secreción más importante en la glándula Harderiana de rata y ratón son los lípidos lo cuales son visibles en secciones congeladas como material sudanofilico y las porfirinas que están presente en laminas glándulares como concreciones pigmentales.

##### **I.2.5.1. Los lípidos.**

Las características citológicas de las células secretoras de la glándula Harderiana han sido estudiadas químicamente y histoquímicamente. Estos estudios han estabilizados que las vacuolas en el interior del citoplasma de las células secretoras

contienen varios tipos de lipidos (Grafflin, 1942; Paule 1957; Kanwar 1960; Rapin 1962; Kasama y col 1970, 1989; Murawski y Jost 1974; Watanabe 1980).

En mamíferos los lipidos es el mayor producto de la glándula Harderiana y constituye un 35% del peso de la glándula (Watanabe 1980). Satoh y col (1992) ha comentado que:

- 1- los lipidos están liberados por exocitosis.
- 2- que la regulación de la secreción de lipidos es a través de un estímulo externo.
- 3- la glándula Harderiana de rata es capaz de la liberación de lipidos por mecanismo holocrino o apocrino.

Los lipidos de la glándula Harderiana están compuestos de grasas insaturadas, fosfolipidos, esterios, colesterol y lipidos neutros o trigliceridos. La mayor clase de lipidos en glándula Harderiana de rata consiste en alcoles insaturados y ácidos grasos monenoicos en el ester de cera (Murawski y Jost 1974). En ratas jóvenes, el lípido glandular 1-alkil 2,3 diacilglicerol (glicerol eter diester =GEDE) se puede cambiar a ester de cera en ratas adultas (Zacker y col 1976). GEDE también es la forma mayoritaria de la fracción lipídica de la glándula Harderiana del ratón (Kasama y col 1970, 1989; Watanabe 1980).

Los lipidos en glándula Harderiana juegan un papel como: lubricante entre la membrana nictitancia y el ojo (Lin y Nadakavukaren 1981), como solvente para feromonas (Sakai 1981), o como factor de crecimiento (Yokoyama y col 1989), y pueden tener un papel termorregulador (Thiessen 1992).

#### **I.2.5.2. LAS PORFIRINAS.**

La porfirina es el mayor producto de secreción en la glándula Harderiana de los roedores(fig. 15), así la presencia de estas moléculas es importante en el transporte del oxígeno y el proceso de oxidación, su presencia esta aportada por Derrien y Turchini

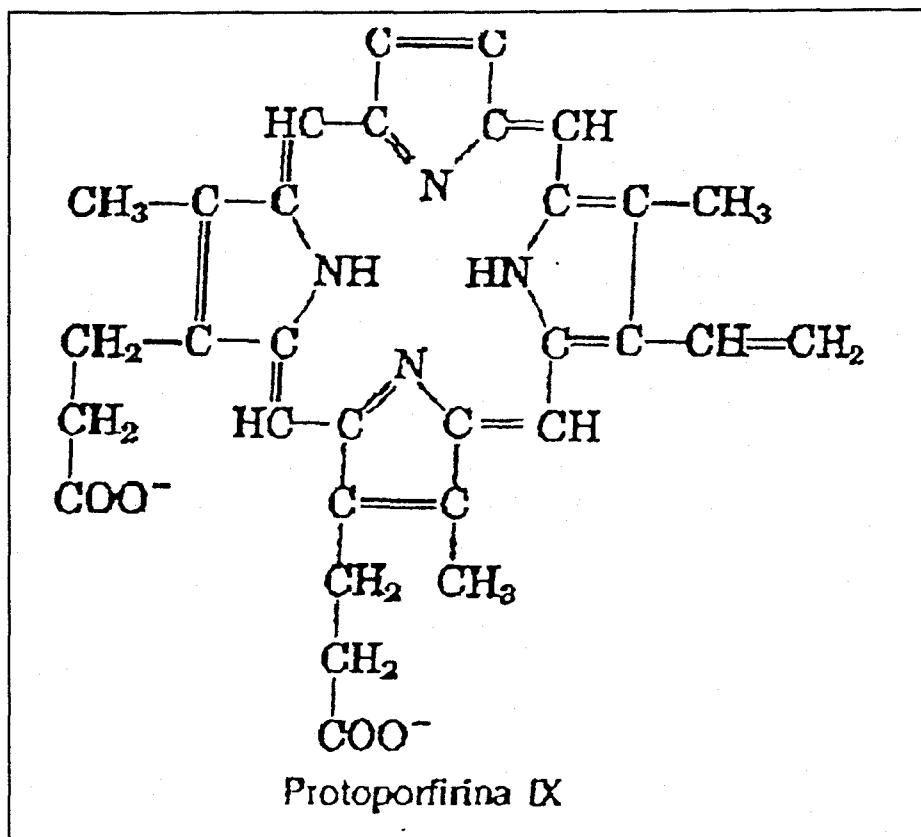


Figura. 15: Molécula de protoporfirina (tomado de Lenhinger, 1993).

(1924) y después por Towbin y col (1945) y Rohoyi y Kelényi (1962).

Las porfirinas están compuestas por un anillo tetrapirolico con distintos sustituyentes que dan las distintas protoporfirinas, aunque la protoporfirina IX precursor del grupo hemo (fig. 16), es la que se encuentra presente en los sistemas biológicos. Estos compuestos porfirinicos sirven como grupo prostético para numerosas proteínas como es el caso de la hemoglobina.

En muchas especies donde los diferentes tipos de porfirina han sido examinados, la protoporfirina presenta la cantidad dominante, después encontramos en pequeñas cantidades la coproporfirina (Spike y col 1990). Así la cantidad total de porfirinas encontradas en glándula Harderiana muestra una variación considerable entre especies y representa un marcado dimorfismo sexual con la glándula de la hembra que produce más porfirinas que la glándula Harderiana del macho ya que esta se produce principalmente en las células tipo B más abundantes en la glándula Harderiana de hembras (Watanabe, 1980, Lin y Nadakavukaren, 1979, Payne y col, 1992 b, Spike y col 1992). Por otro lado encontramos mayor actividad de  $\delta$ -aminolevulina síntasa, enzima limitante porfirinogenica, en las hembras que en los machos (Lin y Nadakavukaren, 1982); También encontramos una actividad enzimática de  $\delta$ -aminolevulina síntasa alta y una cantidad de porfirina grande en el riñón y el hígado que son los dos órganos usados por examen de control de biosíntesis de porfirinas (Spike y col, 1986, 1992, Payne, 1990).

Las diferencias en la producción de la porfirina entre macho y hembra se relacionan con las hormonas sexuales existentes, así, en 1970 Hoffman, observó que si se castraban hámster macho se conseguía producir igual cantidad de porfirinas que en las hembras, cambios que se podían evitar tratando con testosterona. Al contrario, la ovariectomía o el tratamiento con andrógenos en ratas hembras produce una disminución de la concentración de porfirinas (Ulrich y col 1974). Esta relación ha sido



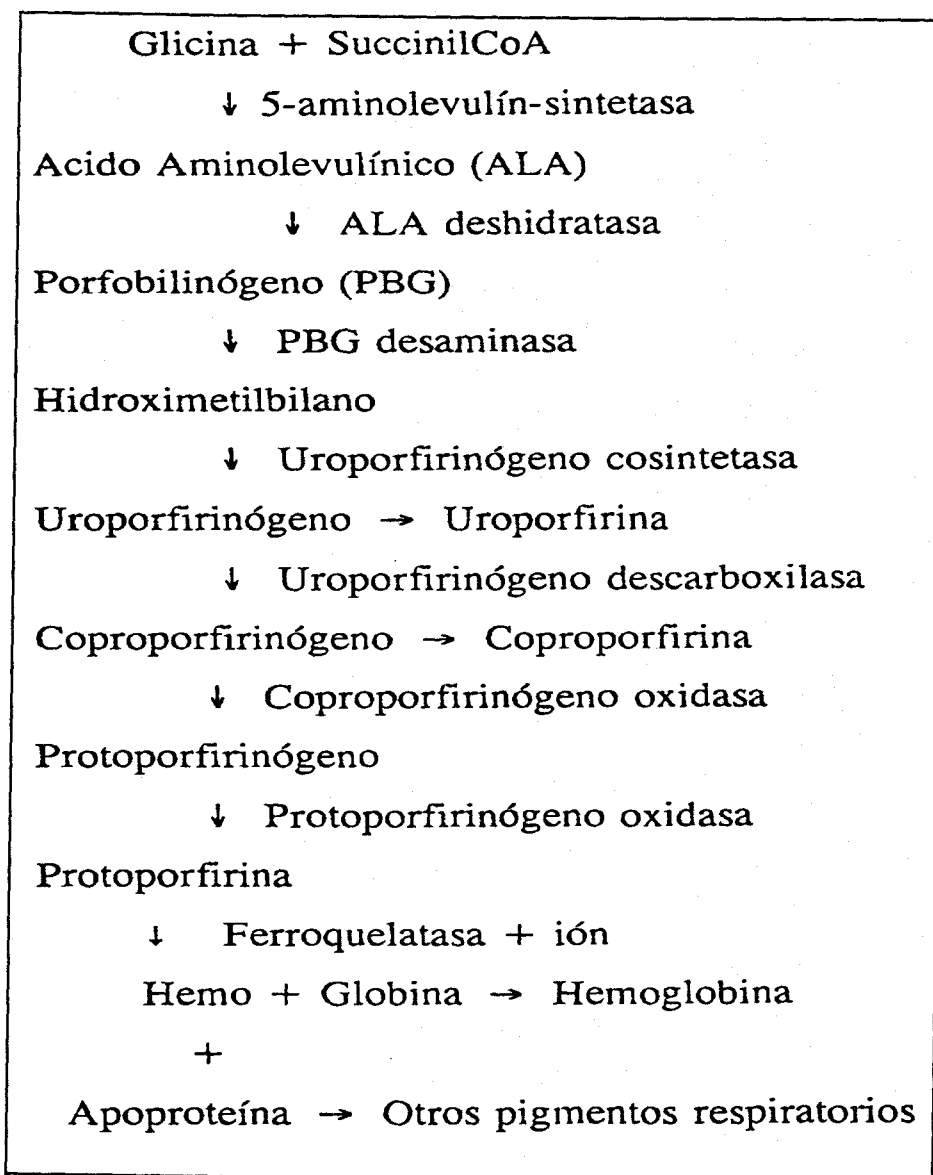


Figura. 16: Esquema de la biosíntesis de porfirinas y del grupo hemo. (Tomado de Payne et al., 1994).

confirmada al localizarse receptores androgenicos en la glándula Harderiana (Vilchis y col 1987).

### **I.2.5.3. Los indoles.**

Al principio en glándula Harderiana se ha detectado la melatonina y N-acetilserotonina (Bubenik y col. 1976; Pang y col. 1977), también numerosos indoles y sus asociadas enzimas. Esto demuestra la afinidad biosintetica entre la glándula Harderiana, la retina y la glándula pineal (Balemans. 1981).

La presencia de los indoles en glándula Harderiana no significa que están sintetizados en Harderiana. En efecto la glándula tiene receptores de melatonina (López-González y col. 1991) lo que explica que puede actuar sobre la glándula como indoles exógenos, sin embargo la actividad enzimática como el N-acetiltransferasa (NAT) y el hidroxiiindol-O-metiltransferasa (HIOMT) en el interior de la glándula amplia claramente la síntesis endogena de la melatonina (Pévet y col. 1980; Menéndez-Pelaez y col 1988a). Además otros indoles como 5-metoxiindoles, pueden ser sintetizados en tejido de Harderiana in vitro (Pévet y col. 1980; Balemans y col. 1983). También existe diferencias en el control del metabolismo de indoles entre la glándula Harderiana y pineal por ejemplo la síntesis en glándula Harderiana parece ser independiente del control nervioso autonómico (Menéndez-Pelaez y col. 1988 b). La administración de la melatonina puede primero reducir la cantidad de la porfirina en la glándula Harderiana de las hembras de hámster y conduce a la aparición de las células de tipo B células típicas de la glándula Harderiana del macho (Rodríguez-Colinga y col. 1992) y segundo suprimir la subida anticipada de la síntesis de la ARNm de la  $\delta$ -aminolaevulinate lo cual ocurre normalmente a la castración del hámster macho (Menéndez-Pelaez y col. 1991).

Los indoles han sido identificados en glándulas Harderianas de los roedores lo

mismo que en reptiles (Vakkuri y col. 1985), se han descrito en la glándula lacrimal extraorbital en hámster dorado (Mhatre y col 1988). Entre los factores que controlan los indoles en glándula Harderiana:

**1. Diferencia de sexo y hormonas:** La glándula Harderiana de las hembras de hámster contiene niveles altos de melatonina que la glándula del macho y la castración prepubertal del macho conduce a un crecimiento de los niveles de melatonina (Hoffman y col 1985; Menéndez y col 1987, 1988a; Buzzell y col 1991).

**2. Factores circadianos:** En glándula Harderiana de hámster Los niveles de melatonina, serotonina 5-hidroxitriptofol y la actividad de hidroxindolometiltransferasa (HIOMT) aumentan durante la primera fase del periodo de oscuridad (y disminuyen en periodo de luz) (Pévet y col.1980; Hoffman y col. 1985; Menéndez-Pelaez y col. 1987), los niveles de la N-acetil serotonina y la actividad de la NAT están generalmente al revés.

**3. Factores estacionales:** Se han encontrado variaciones estacionales de los indoles de la harderiana, así, Balemans y col 1983 han encontrado en Harderiana de hamster que 5-metoxi-triptamina y el triptofano están ausentes en verano mientras que Buzzell y col 1990 han encontrado en hámster un ritmo circadiano de la melatonina en otoño (días cortos).

#### **I.2.6. Efecto de las hormonas gonadales sobre la estructura y la actividad de la glándula Harderiana**

Los estudios efectuados sobre el hámster, una especie en cual la glándula Harderiana muestra muchas diferencias sexuales incluso lo siguiente:

1. La presencia de dos tipos de células epiteliales en el macho y sólo un tipo en la glándula Harderiana de la hembra. El tipo celular del macho se diferencia en tipo de vacuolas de lipidos, las células de tipo A tienen numerosas pequeñas vacuolas lipídicas

mientras que el tipo B tiene pocas y alargadas vacuolas.

2. La presencia de complejos politubulares en células de la glándula Harderiana del macho derivados del retículo endoplasmático liso mientras en hembra estos complejos están ausentes. Sin embargo en células de la hembra existen estructuras membranarias en forma de láminas lo cuales no están presentes en el macho (Bucana & Nadakavukaren, 1972).

3. Las células intersticiales son 40 veces más numerosas en glándula Harderiana de hembra que en macho (Payne y col, 1982).

4. La cantidad de la porfirina y la actividad de los enzimas porfirinogénicos están altas en glándula Harderiana de hembra que en macho.

Así tenemos una clara diferencia sexual a base de hormonas, la castración de un macho adulto convierte todas las características de la glándula (morfológicas y bioquímicas) a una glándula de hembra en pocas semanas (Woolley & Worley, 1954, Payne y col, 1977a). Este cambio se puede convertir con una administración de andrógenos (Hoffman, 1971; Payne y col 1977). También una administración similar de andrógenos a una hembra adulta resulta una aparición de células de tipo B, complejos politubulares, y una disminución en cantidad de porfirina y actividad del enzima porfirinogénico (Sun & Nadakavukaren, 1980; Spike y col 1985).

### **I.2.7. Efecto de las hormonas tiroideas y pituitarias en la estructura y la actividad de la glándula Harderiana.**

#### **I.2.7.1. Hormonas tiroideas.**

La tiroidectomía y la hipofisectomía han demostrado una disminución en el peso de la glándula Harderiana de rata, este efecto puede ser reversible por un tratamiento con la tiroxina (Boas & Bates, 1954; Ebling y col 1975). Inyecciones de la tiroxina ( $T_4$ ) o la triiodotironina ( $T_3$ ) reduce la cantidad de porfirina en la glándula Harderiana de

hembra de hámster y tiene un efecto similar en macho castrado (Hoffman y col 1989; 1990). Administración de un tratamiento antitiroideo como el metimazol produce efectos conflictivos entre diferentes estudios sin embargo al final Buzzell & Menéndez-Pelaez en 1992 han demostrado que ambas condiciones (Hipotiroidismo y hipertiroidismo) reducen la concentración de porfirina.

5'-deiodinasa tipo II (5'-D) es un enzima importante para convertir  $T_4$  a  $T_3$  esta presente en glándula Harderiana en macho de rata (Guerrero y col 1987) y hamster (Delgado y col 1988; Guerrero y col 1989) pero en macho de ratón aparentemente no existe (Rubio y col 1991). Se piensa también que este enzima es importante para mantener los niveles intracelulares de  $T_3$  en tejido que depende de hormonas tiroideas, además tiene una actividad elevada en el caso de hipotiroidismo (Silva y Leonard, 1985; Guerrero y col 1987).

La actividad del 5'-D tiene un ritmo circadiano con valores altos en segunda parte del periodo de oscuridad con 14 h de luz y 10 h de oscuridad (Guerrero y col 1987, 1989), este ritmo se puede cambiar alterando el fotoperido (Vaughan y col 1991). El ritmo circadiano de 5'-D esta controlado vía el mecanismo adrenérgico así el isoproterenol un agonista  $\beta$ -adrenérgico induce un incremento en la actividad de 5'-D efecto igual de lo que ocurre en la fase de oscuridad (Guerrero y col 1989), otros mecanismos parecen modular la actividad 5'-D tanto en glándula Harderiana como en otros tejidos es la exposición de los animales a bajas temperaturas (Guerrero y col 1990; Puing-Domingo y col 1988). Además de la desyodasa tipo II existe otro isoenzima que lleva a cabo la reacción de desyodación, la 5'-desyodasa tipo I (5'-D tipo I) , que produce también una desyodación del anillo fenólico, aunque lo hace en otros tejidos, y una desyodación del anillo tirosil dando lugar a la  $T_3$  reversa ( $T_3$  r) (fig 17).

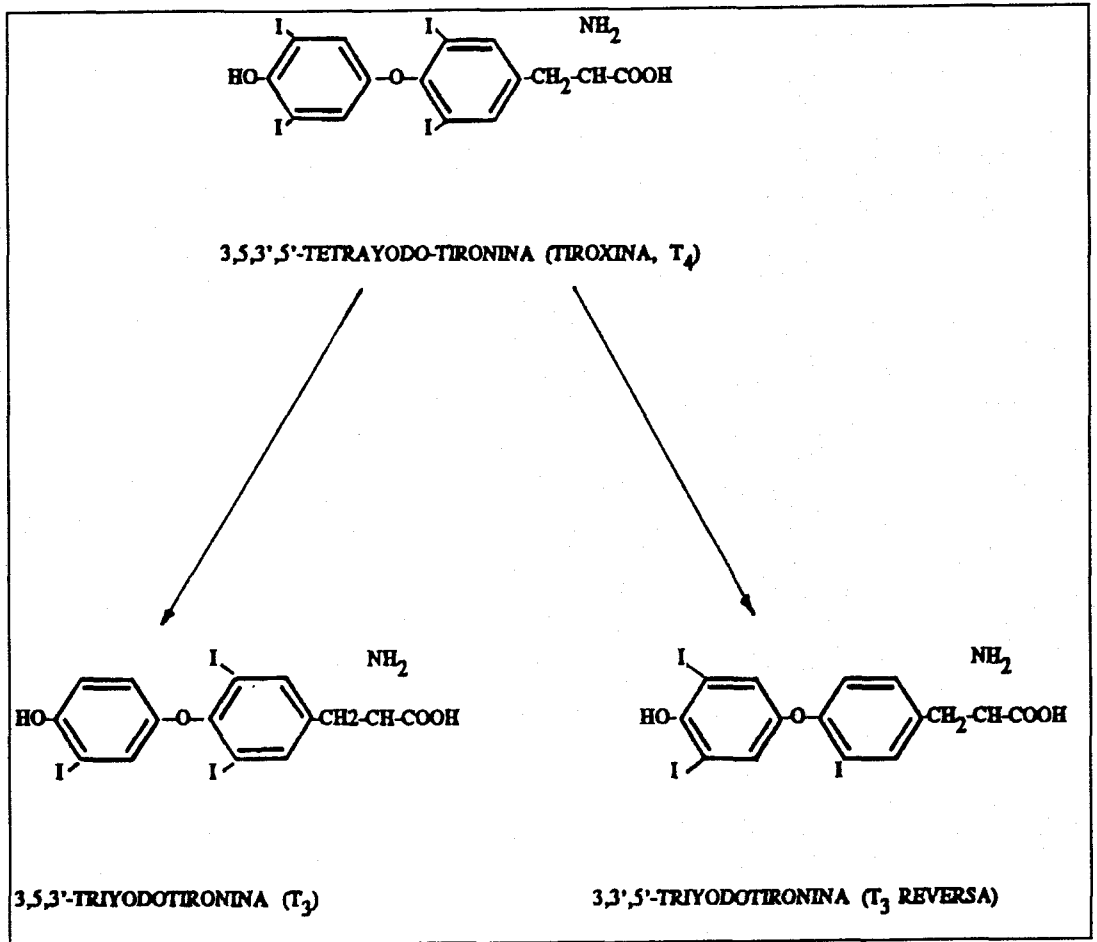


Figura. 17: Esquema de la desyodación de la T<sub>4</sub>.

### **I.2.7.2. Hormonas Pituitarias.**

Las hormonas pituitarias están directamente implicadas en el control de la glándula Harderiana, cortando el tallo pituitario o transplantando la pituitaria a un sitio periférico se suprime el control ejercido por el hipotálamo sobre la hipófisis, y su principal producto de secreción la prolactina, que esta inhibida por la dopamina. Realizando uno o otro de estos procesos conduce, en hámster macho, a una feminización de la estructura de la glándula Harderiana con desaparición de células de tipo B y incrementa la síntesis de la porfirina (Buzzell y col, 1992a). La administración de la bromocriptina (agonista (análogo) de la dopamina) impide la aumentación de la biosíntesis de la porfirina y la feminización de la glándula Harderiana lo que ocurre normalmente en hamster macho castrado (Buzzell y col 1989). Cuando se aplica una ovariectomía a una hembra de hámster, y con una administración de bromocriptina lleva a una supresión de la biosíntesis de la porfirina y la masculinización de la estructura de la glándula Harderiana de hembra de hámster. Estos cambios se pueden suprimirse por la administración de la prolactina, de este modo en hámster la prolactina parece actuar como un control fisiológico adicional de la glándula Harderiana tanto a nivel estructural como de síntesis de porfirina. Sin embargo en rata ni el tratamiento con la bromocriptina ni la prolactina tienen efecto significativo sobre las enzimas lisosomales mientras una hipofisectomía altera solamente la actividad de la  $\beta$ -glucoronidasa,  $\alpha$ -aminosidasa y el ácido fosfatasa (Vaughan y col 1988), estos autores concluyen que la hormona de crecimiento ejerce un control importante sobre las enzimas lisosomales.

### **I.2.8. Funciones de la glándula Harderiana**

La función particular de la glándula Harderiana es la lubricación de la zona ocular principalmente entre la cornea y la membrana nictatina sin embargo existen

otras funciones de esta glándula en roedores que son:

1. Fotoprotección: la fotoprotección es una función apropiada de la glándula Harderiana (Hugo y col 1987), en ratas una exposición a la luz después de un periodo de oscuridad provoca una disminución de la cantidad de porfirina en poco tiempo esta rápida respuesta a las condiciones de luz ambiental esta interpretada como la secreción de la porfirina en glándula Harderiana tiene un papel fotoprotector del ojo. Entre las diferentes formas de fotoprotección es que las células inmunocompetente (células dendríticas) pueden perder sus potencias después de un exposición a la luz Ultravioleta, así, la porfirina absorbiendo la luz UV puede proteger los elementos del sistema inmune asociados a la órbita y la conjuntiva y se supone que esta función esta presente sólo en roedores.

2. Fuente de feromonas: la glándula Harderiana de muchos mamíferos y entre ellos la de roedores, parece ser que actúa como fuente de feromonas, así, las secreciones de la glándula se extienden sobre la cara en la época de celos.

Harderianectomia del gerbil macho decrece su agresividad hacia los otros animales de los dos sexo, así, como la perdida del interés de la hembra hacia los machos (Thiessen y Harriman, 1986) igual se ha observado en hámster (Payne, 1979).

3. Glándula Harderiana como fuente de factores de crecimiento: Yokoyama y col 1989, han descrito un factor de crecimiento derivado en glándula Harderiana (HGDGF) lo cual parece al factor de crecimiento fibroblasto con una excepción que este factor no estimula las células de crecimiento endotelial en humano, también se demostrado últimamente que HGDGF *in vitro* aumenta la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina en células corneales stromal (Yokoyama y col 1992) este autor sugiere un posible papel del HGDGF en la reparación y el mantenimiento de la cornea.



### I.2.9. La glándula Harderiana durante el desarrollo.

En mamíferos, la glándula Harderiana esta presente al nacimiento, López y cols (1992) han presentado detalles sobre todo ultraestructural en el desarrollo postnatal en Harderiana de hámster, demostrando que entre el nacimiento y el tercer mes de edad:

1. El área de las células epiteliales aumenta en dimensión.
2. El porcentaje del perfil celular ocupado por el núcleo disminuye de la mitad hasta 10 %.
3. El área ocupado por vacuolas lipídicas aumenta.

Estos cambios no son constantes durante el desarrollo porque a la cuarta etapa muchas transformaciones pueden ocurrir.

Primera etapa: (del nacimiento hasta el séptimo día de vida): las células epiteliales están relativamente inmaduras y yuxtapuestas aproximadamente con un destacado espacio intercelular. Las células epiteliales tienen pocos ribosomas (polisomas), mitocondrias y aparato de Golgi, el núcleo es grande e irregular y no existen vacuolas lipídicas. Es muy difícil distinguir células epiteliales y células mioepiteliales.

Segunda etapa (7 día - 17 día de vida): esta caracterizada por la aparición de vacuolas lipídicas en muchas células. El complejo politubular (característica de la glándula Harderiana del macho de hámster) primero aparece en pocas cantidades en ambos sexos.

Tercera etapa (el día 20 - el día 37): caracterizada por la primera aparición de células de tipo A y B en glándula del macho, y la cantidad de porfirina en sexos diferentes, el complejo politubular desaparece de la glándula Harderiana de la hembra.

Cuarta etapa (a partir del día 45 de vida): Las células de la glándula alcanzan el tipo normal de células adultas con características morfológicas y bioquímicas completas según la diferencia del sexo. Shirma y Hoffman (1991) han demostrado que en ratón las células de tipo A aparecen en el quinto día después del nacimiento y el tipo B en

el séptimo día, esta aparición posterior coincide con la detección de niveles de porfirina llevando a concluir que las células B son responsable de la biosíntesis de la porfirina en la glándula del ratón.

En lo que se refiere a los ritmos biológicas, existe una relación de la glándula Harderiana con las distintas actividades rítmicas existentes en pineal, no obstante, existe la hipótesis de que la glándula Harderiana podría tener un posible papel en la modulación de la síntesis de la melatonina en pineal durante el desarrollo del individuo, sirviendo como un postransductor extrarretinal durante los primeros días de vida. Así, algunos autores han definido la teoría de que la luz ambiental actuaría sobre la glándula pineal de rata neonatas por mecanismos extrarretinal, independientemente de la vía retino-hipotalámica-epifisaria. Zweig y col 1966, Wetterberg y col 1970a sugieron que estos mecanismos podrían estar mediados por la glándula Harderiana que funcionaría como un transductor de la luz en ratas neonatales. Estos autores observaron que suprimiendo la Harderiana en rata recién nacidas se impedía el efecto originado por la luz en el metabolismo de las indolaminas pineales, es decir, la ablación del pico nocturno (Wetterberg y col 1970a,b), mientras que si esta operación se realizaba en adultos, no afectaba en absoluto la retmicidad pineal (Reiter y Klein, 1971). Parecía que existía algún tipo de relación entre la glándula Harderiana y la glándula pineal durante la primera fase del desarrollo ontogénico. Sin embargo, esta hipótesis no era muy concluyente ya que no existían evidencias morfológicas ni bioquímicas de existieran células fotoreceptoras en la glándula Harderiana, por lo que no se encuentra explicación alguna de como se traduciría en la glándula la información lumínica recibida del exterior.

### I.3. Objetivos.

La arilalkilamina acetil CoA. N-acetiltransferasa (NAT) es el enzima que cataliza la síntesis de N-acetilserotonina, precursor de la melatonina. La regulación de este enzima es vía los receptores  $\alpha$ - $\beta$  adrenergicos.

En este trabajo se aborda : Estudio en vitro de la regulación de la actividad de la NAT vía los receptores  $\alpha$ - $\beta$  adrenérgicos en glándulas pineales de ratas de 2 y 6 semanas y por otra parte la caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en glándula Harderiana de ratas. Para ello, los principales objetivos a cumplir en este trabajo son:

1. un estudio a nivel de los receptores, estudiando el efecto de distintos agonistas y antagonistas de los receptores  $\alpha$ - $\beta$  adrenérgicos sobre la actividad de la N/T. en pineales de ratas en cultivo.
2. Un estudio de la actividad de la NAT en pineales de ratas usando el dibutilil AMPc.
3. Un estudio a nivel de la membrana celular: Estudiando la cantidad de proteínas G unidas a los receptores  $\alpha$ - $\beta$  adrenérgicos en pineales de ratas de 2 y 6 semanas.
4. Un estudio de la caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en glándula Harderiana de rata.

## ***II. MATERIALES Y MÉTODOS***

## **II.1. MATERIALES.**

### **II.1.1. REACTIVOS.**

El medio de cultivo BGJb (Fitton-Jackson) y L-glutamina fueron obtenidos por Gibco (Grand Island, NY, EEUU). Acido L-ascórbico, acetilo-CoA (sal de litio), tetraborato sódico, ácido bórico, albúmina sérica bovina (BSA), penicilina, estreptomina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), bacitracina, tripsina, N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[2-ácido hidroxipropanosulfónico] (HEPES), isoproterenol, propranolol, metoxamina, prazosin, clonidina, yohimbina, dibutilil AMP cíclico (dAMPc), toxina pertusica (Ptx), toxina colérica (Ctx), ditioneitol (DTT),  $MgCl_2$ , GTP, ATP, timidina, fosfocreatina, creatina kinasa, nonidet P40, triptamina, ácido perclórico fueron obtenidos por la casa comercial Sigma (St Louis, MO, EEUU). Placas para cultivo de órganos, Falcon (3037) proporcionados por Falcon Plastics (Los Angeles, CA, EEUU).  $[^{32}P]NAD^+$ , anti- $G_{\alpha q/\alpha 11}$  ( $G_{q11}$ ), anti- $\beta$  común, anti- $G_{\alpha s}$ , anti- $G_{i1-2}$  y anti- $G_{i0-3}$  fueron proporcionados por New England Nuclear (Du Pont de Nemours, Dreieich, Alemania).  $[^{14}C]$ acetil coenzima A (acetil CoA) con una actividad específica de 50 mCi/mmol, el kit de radioinmunoanálisis de AMPc( $[^{125}I]$  AMP cíclico),  $[^{125}I]$ cyanopindolol ( $[^{125}I]$ CYP con una actividad específica 2200 Ci/mmol), anti-conejo Ig  $[^{125}I]$ labelled especie-específico  $F(ab^1)_2$  fragmento,  $[^{25}I]$ 2- $[\beta-(4-hidroxi-fenil)-etilaminometil]$ tetralone ( $[^{25}I]$ HEAT, 2200 Ci/mmol) fueron obtenidos de Amersham (Amersham, UK). Fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), N- $\alpha$ -tosil-L-lisina clorometil ketone (TLCK) y leupeptina fueron proporcionados por Boehringer-Mannheim GmbH (Alemania). Los marcadores químicos y proteicos para sulfato dodecilo sódico gel de electroforesis poliacrilamida (SDS-PAGE) fueron proporcionados por Los laboratorios Bio Rad (Richmond, CA, EEUU). La membrana de Nitrocelulosa fue proporcionada por

Hoeffler (CA, EEUU). Cloroformo, liquido de centelleofueron obtenidos de Fluka (Buchs, Suiza) Todos los reactivos de grado analítico y los productos no citados a continuación fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania).

## **II.1.2. ANIMALES.**

Se usaron ratas Wistar de ambos sexos, nacidas y criadas en nuestro propio laboratorio, y sometidas a un ciclo controlado de luz-oscuridad, con 14 horas de luz y 10 de oscuridad (14:10). La luz se apaga desde las 20:00 hasta las 06:00 horas. En caso de estudio de la regulación de la actividad de la NAT en glándula pineal se usaron ratas Wistar de 2 y 6 u 8 semanas de edad y de ambos sexos, y en estudios de la caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenergicos en glándula Harderiana se usaron ratas de ambos sexos y de 6 hasta 8 semanas de edad, y en cuanto a la fase de oscuridad, las rata fueron sacrificadas por decapitación bajo la luz roja, a los tiempos indicados.

Todos los animales recibieron comida (Purina rat chow) y agua *ad libitum* , y fueron mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura de  $24 \pm 2$  °C y humedad de  $45 \pm 5$  %.

### **II.1.2.1. Obtención de la glándula pineal.**

Los animales (2 y 6 semanas de edad) se sacrificaron por decapitación sin anestesia generalmente después de las 12:00 horas. Se levanta la tapa del cráneo y se puede observar la glándula pineal como órgano impar en la intersección entre los dos hemisferios cerebrales y el cerebelo. Después de obtener las glándulas pineales se ponen en cultivo según el método citado a bajo.

### **II.1.3. Descripción del método de cultivo.**

El cultivo de la glándula pineal se basa en el método descrito por Brammer y colaboradores (1981) con algunas modificaciones. Para el cultivo de la glándula pineal

se requieren unos materiales y unos aparatos que seguidamente pasamos a detallar.

### **II.1.3.1. Materiales.**

Se necesita el medio de cultivo BGJ-B Fitton-Jackson sin antibióticos (GIBCO, 014-02591 H), Filtros MILLIPORE (HAW-PO 2500), Placas para cultivo de órganos, Falcon 3037 (Becton-Dickinson) y plastilina. Para suplementar el medio se necesita el ácido ascórbico (Merck, 127), L-Glutamina (Sigma, G-6392), albumina sérica bovina, fracción V (Sigma, A-4503), penicilina G (Sigma, P3032), y estreptomycinina (Sigma, S6501).

### **II.1.3.2. Método de cultivo.**

Es muy importante para el cultivo de cualquier glándula, y en este caso de la pineal, mantener unas óptimas condiciones de esterilidad. Así se trabaja en cámara de flujo laminar utilizando guantes estériles y material desechable: puntas, etc., previamente esterilizado. Dentro de la cámara se tendrá un mechero, importante para flamear pinzas, botella de medio de cultivo...

Tanto las placas de cultivo como los filtros se abren dentro de la cámara. El medio de cultivo debe estar unos 10 min a temperatura ambiente antes de utilizarse, y es necesario suplementarlo antes de ponerlo en las placas de cultivo con :

- Ac. Ascórbico 0.1 mg/ml.
- Glutamina 0.2 mM.
- Albumina sérica bovina 1 mg/ml.
- Penicilina 100 U/ml.
- Estreptomycinina 100  $\mu$ g/ml.

El orden de adición al medio de cultivo no es importante salvo para la albúmina que debe ser la última en añadirse ya que provoca espuma y haría que no se disolvieran los demás productos. Una vez preparado se cogerá 1 ml de medio por cada placa de

cultivo, y a continuación se colocarán encima los filtros MILLIPORE muy lentamente para evitar la producción de burbujas en el medio. Sobre el filtro se colocaran las pineales (2 por cada placa de cultivo) y se tapa la placa, bajo la placa de cultivo, y en un extremo, se pone una bolita de plastilina para inclinar la placa y permitir que las pineales se nutran del medio por igual y así evitar que alguna se quede sobre la burbuja que siempre existe en el medio. Se incuban las placas en el incubador de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, 3157) a temperatura de 37 °C y bajo una atmósfera de 95 % aire y 5 % de CO<sub>2</sub> una vez pasado el tiempo de incubación (6 horas) se recogen las pineales en tubos Eppendorf y se almacenan a -70 °C hasta su procesamiento.

## **II.2. MÉTODOS.**

### **II.2.1. Medida de la actividad N-acetiltransferasa.**

La actividad de la N-acetiltransferasa se midió según el método descrito por Champney y colaboradores (1984).

#### **Fundamento.**

El análisis se basa en la N-acetilación de la triptamina por la NAT, utilizando como donador del grupo acetilo el acetilo CoA marcado con <sup>14</sup>C, y dando por tanto como producto N-acetiltriptamina marcada. El producto de la reacción será directamente proporcional a la actividad enzimática.

#### **Reactivos.**

- La soluciones utilizadas fueron un tampón homogeneizante fosfato sódico [pH 6.8] 0.05 M (PBS), y un tampón borato sódico [pH 10] 0.2 M (a partir de tetraborato sódico y ácido bórico).

- Aceti-CoA, sal de litio (AcCoA), 0.8 mM en PBS.

- Triptamina HCl, 5.6 mM en PBS.



- [1-<sup>14</sup>C]acetil Coenzima A (<sup>14</sup>C-AcCoA), 40 nCi por muestra.
- Cloroformo frío.
- Líquido de centelleo.

### **Método.**

La mezcla de ensayo se prepara inmediatamente antes de empezar el ensayo con los sustratos de la reacción. Está compuesta para cada muestra de las siguiente soluciones:

- Triptamina: 5  $\mu$ l.
- AcCoA: 2  $\mu$ l.
- <sup>14</sup>C-AcCoA: 2  $\mu$ l.
- PBS: 1  $\mu$ l.

Después del cultivo las pineales siempre mantenidas en frío se sonicar (Sonicador, MSE) durante 5 segundos, a baja intensidad, en 50  $\mu$ l de tampón de homogeneización (PBS, pH 6.8). Se toman 20  $\mu$ l de homogenado de cada muestra y se transfieren al fondo de un tubo de microfuga en frío. Se añade 10  $\mu$ l de la mezcla de ensayo sobre la cara del tubo de forma que las dos fases, la del homogenado y la de la solución, no se mezclen. Una vez realizada la operación anterior con todas las muestras, se lanzan todas las reacciones al mismo tiempo golpeando y agitando con rapidez cada tubo para unir las dos fases. Se incuban los tubos durante 20 minutos a 37 °C en un baño con agitación. Una vez finalizada la incubación, se detiene la reacción añadiendo 100  $\mu$ l de tampón borato frío (agitando), y 1ml de cloroformo también frío y se agita durante 5 minutos para extraer la N-acetilriptamina marcada radioactivamente.

En la fase acuosa se encuentra el <sup>14</sup>C-AcCoA que no ha transferido el grupo acetilo a la triptamina, por lo que centrifugamos en una microfuga (Sigma, 2K-15) 30 segundos a 10.000 rpm y aspiramos el sobrenadante quedándonos sólo con el

cloroformo. Se añaden de nuevo 100  $\mu\text{l}$  de tampón borato para lavar el cloroformo de  $^{14}\text{C}$ -AcCoA, y se repite la misma operación de agitado, centrifugación y aspirado. Se toman 500  $\mu\text{l}$  del cloroformo y se transfieren a un vial de centelleo donde se deja evaporar para su posterior contaje. Una vez evaporado el cloroformo se añaden 3 ml de líquido de centelleo a los viales, se agitan, y se cuentan durante 10 min en un contador beta (contador de radioactividad beta, LKB).

La radiactividad inespecífica debida a la contaminación de  $^{14}\text{C}$ -AcCoA es determinada por el valor de los blancos. Estos siguen el mismo tratamiento que las muestras en su análisis salvo que, en vez de llevar homogenado, se le añade 10  $\mu\text{l}$  de PBS. Las actividades totales (AT) o cuentas totales en el ensayo se efectuarán añadiendo 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla de ensayo a un vial de centelleo dejándolo evaporar al igual que las muestras para poder contarlo.

#### **Calculo de la actividad de NAT.**

El cálculo de la actividad se realiza mediante la formula siguiente:

- cpmM = cuenta por minuto de cada muestra

- cpmB = cuenta por minuto del blanco

$$\text{Actividad de NAT} = \frac{(\text{cpm M} - \text{cpm B}) \times 2 \times 3 \times 2,4 \times 2,5}{\text{AT}}$$

- 2 = porque tomamos sólo la mitad de cloroformo

- 3 = porque sólo se incubó 20 minutos y lo expresamos por hora

- 2.4 = nmoles totales de acetil CoA en cada muestra

nmoles de  $^{14}\text{C}$ -AcCoA:

como la actividad específica es de 50 nCi/nmol y en el ensayo añadimos

40 nCi, son 0.8 nmoles.

nmoles de acetil CoA:

Se añaden por muestra 2  $\mu$ l de una solución 0.8 mM, por lo que tenemos 1.6 nmoles.

- Factor de dilución = 2.5, debido a que tomamos 20  $\mu$ l de los 50  $\mu$ l del homogenado.

- AT = cuentas totales añadidas a cada tubo.

La actividad NAT se expresa como nmol de N-acetiltriptamina/glándula.hora, o nmol de N-acetiltriptamina/mg de proteína.hora.

### **II.2.2. ACTIVIDAD DE NAT:**

Después de 30 minutos de preincubación, las glándulas pineales fueron trasladadas a otras placas de cultivo y se incubaron 6 horas en presencia de concentraciones crecientes de Isoproterenol y Metoxamina. Al acabar la 6 horas de incubación, cada glándula pineal se sónica en un tubo Eppendorff en 50  $\mu$ l de tampón fosfato frío de 0,05 M de concentración y pH 6,8, inmediatamente se usa 20  $\mu$ l del homogenado para medir la actividad de NAT según el método descrito por Deguchi y Axelrod (Deguchi y Axelrod 1972 a) con modificaciones de Champney y cols (Champney y cols 1984) y la actividad de NAT se expresa en nmol N-acetiltriptamina producida /mg proteínas/hora.

### **II.2.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL AMPc:**

Después de una preincubación de 30 min, las glándulas pineales fueron trasladadas a otras placas de cultivo y se incuban durante 20 min en presencia de un inhibidor fosfodiesterasa IBMX (Isobutilmetilxantin 1mM), 10  $\mu$ M Isoproterenol y 10  $\mu$ M de Metoxamina. Una vez la incubación terminada las glándulas pineales se

homogeneizan cada una en 100  $\mu$ l de tampón fosfato frío (PBS), después añadimos a cada tubo 50  $\mu$ l del ácido perclórico (4%) y agitamos suavemente el homogenado, luego se centrifuga el homogenado a 3000 x g durante 10 min . El AMPc contenido en el sobre nadante esta determinado según el proceso de non acetilación usando un kit radioinmunoanálisis. Así se cogen 50  $\mu$ l del homogenado y se le añaden 450  $\mu$ l del tampón del kit de AMPc.

#### **II.2.4. EFECTO DEL DIBUTIRIL AMPc SOBRE LA ACTIVIDAD NAT:**

Se cambian las glándulas a otras placas después de 30 min de preincubación y se incuban 6 horas en ausencia de drogas (control), en presencia de 10  $\mu$ M de Isoproterenol y de 1mM de dibutiril-AMPc (d-AMPc).

Se homogeneizan las glándulas pineales en 50  $\mu$ l de tampón fosfato frío de 0,05 M de concentración y pH 6,8, inmediatamente se usa 20  $\mu$ l del homogenado para medir la actividad de NAT según el método descrito por Deguchi y Axelrod (Deguchi y Axelrod 1972 a) con modificaciones de Champney y cols (Champney y cols 1984) y la actividad de NAT se expresa en nmol N-acetiltriptamina producida /mg proteínas/hora.

#### **II.2.5. ESTUDIOS DE ESPECIFICIDAD:**

Para el estudio de unión, el volumen final por cada tubo es de 0,4 ml que contiene 200  $\mu$ l de homogenado de pineal en un tampón tris frío 10 mM a pH 7,6, 100  $\mu$ l de [<sup>125</sup>I]CYP a concentración de 50 pM en el caso del receptor  $\beta$ -adrenérgico, o, 100  $\mu$ l de [<sup>125</sup>I]HEAT a concentración de 50 pM encaso del receptor  $\alpha$ -adrenérgico, y añadiendo 100  $\mu$ l de los agonistas y antagonistas de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos con concentraciones crecientes hasta 1 $\mu$ M.

Después de la incubación de 30 min a 30 °C, la reacción fue detenida añadiendo 10 mM del tampón tris-HCl frío a pH 7,6 (que contiene 154 mM NaCl,

1mM MgCl<sub>2</sub>, y 1mM de ácido ascorbico), se centrifugan los tubos durante 10 min a 12000 rpm, luego se aspira el sobrenadante y se lava el pellet con tris-HCl frío y se centrifuga. Al final la radioactividad del pellet fue contada en el contador gamma LKB.

La unión específica esta determina como la unión total menos la unión obtenida en presencia de 1 μM del propranolol en caso del receptor β-adrenérgico o 1μM prazosin en el caso del receptor α<sub>1</sub>-adrenérgico.

### **II.2.6. ADP-RIBOSILACIÓN:**

Las toxinas pertúsica y colérica son importantes herramientas de investigación para el estudio de la identificación y función de las proteínas G. El mecanismo de acción de ambas toxinas implica una modificación covalente de las proteínas G a través de una ADP-ribosilación con NAD como sustrato (57). Esta ADP-ribosilación de las proteínas G producida por estas toxinas ha sido aprovechada para introducir ADP-ribosa marcada con <sup>32</sup>P en las proteínas G, la cual es posteriormente detectada por técnicas de electroforesis y autoradiografía. Basicamente consiste en tratar las membranas con las toxinas preactivadas, realizar una separación de las distintas proteínas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida y detectar la proteína ADP-ribosilada con <sup>32</sup>P mediante una autoradiografía.

La ADP-ribosilación de las membranas fue llevada a cabo según el método citado en Pozo y col (1994) con menores modificaciones. Las membranas de las glándulas pineales de ratas de 2 y 6 semanas (1 mg de proteína/ml) fueron incubadas en presencia de 80 μg/μl de toxina colérica preactivada con tiol. Las membranas y la toxina colérica fueron incubadas en 0,25 M de tampón fosfato a pH 7,0 que contiene 5 mM ATP, 50 μM de GTP, 1,5 μM de α-[<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup>, 2 mM de EDTA, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y un sistema generador de ATP.

En otro lado, se usa 1mg/ml de membranas de las glándulas pineales de ratas



de 2 y 6 semanas de edad para ADP-ribosilación del sustrato de la toxina pertusica, esta reacción se lleva a cabo en un tampón tris-HCl a pH 8,0 que contiene 10 mM de timidina, 100  $\mu$ M GTP, 1mM ATP, 1,25 mM  $MgCl_2$ , 1mM EDTA, 0,6 mg/ml de creatina kinasa, 4,5 mg/ml de fosfocreatina y 0,7  $\mu$ M de  $\alpha$ -[ $^{32}P$ ]NAD<sup>+</sup> con o sin 20  $\mu$ g/ml de toxina pertusica preactivada con tiol. Después de una incubación de 45 min a 30 °C. Las reacciones de ADP-ribosilación catalizado con toxina colerica o toxina pertusica fueron paradas añadiendo 10 % (W/V) de ácido tricloroacético frío, se lava el pellet con aceto y se solubiliza en el tampón del gel SDS para el electroforesis en gel SDS-PAGE.

#### **II.2.7. INMUNODETECCIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE LA PROTEINA G:**

Las membranas de las glándulas pineales fueron obtenidas , sonicando en un tampón que contiene 0,3 mg/ml de EDTA, 0,05 mg/ml de tripsina, 0,1 mg/ml de bacitracina, 0,01 mg/ml de TLCK, 0,01 mg/ml de leupeptina, 0,05 mg/ml de PMSF, y 20 mM HEPES, con un pH de 7,4. El homogenado fue centrifugado durante 45 min a 30000 x g a temperatura de 4 °C, se lava el pellet 2 veces y se resuspende en tampón de reacción.

Las membranas pineales (150  $\mu$ g) se resuelven en 12 % de sulfato dodecilsodico (SDS) gel de electroforesis poliacrilamida (Laemmli 1970) después se transfieren en membrana de nitrocelulosa. El electroblot fue sondeado con anticuerpos, anti- $G_{s\alpha}$ , anti- $G_{i\alpha 1-2}$ , anti- $G_{i\alpha 0-3}$ , anti- $G_{\alpha q11}$ , y anti- $\beta$  común como principales anticuerpos, están diluidos a 1:1000 en 50 mM de tampón Tris-HCl que contiene 2 mM  $CaCl_2$ , 80 mM NaCl, 0,2 % nonidet P40, 0,02 % ácido sódico y 5 % leche en polvo (tampón WB). Se visualiza la inmunodetección con el método autoradiografico usando Ig anti-conejo, y fragmento específico  $F(ab^1)_2$  marcado con [ $^{125}I$ ] (5-20  $\mu$ Ci/ $\mu$ g proteína anticuerpo, 200,000 cpm/ml en tampón WB).

### **II.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES $\beta$ -ADRENÉRGICOS EN GLÁNDULA HARDERIANA.**

#### **Obtención de membranas de células de glándulas Harderianas:**

##### **Material:**

- Glándulas Harderianas de ratas Wistar.
- Tampón Hepes 20 mM pH 7,5.
- Tampón de homogeneización más inhibidores.
- Tampón Hepes 20 mM con PMSF.
- Polytron Kinem'atica GmbH.
- Sonicador vibra-cell Danbury.
- Centrifuga J-21.

##### **Método:**

(todos los pasos se harán en frío).

Se añade 30 ml de tampón de homogenización más inhibidores por bote de centrifuga y 3-4 glándulas por tubo.

Se llevan los tubos al polytron durante 2x1 min a velocidad media. El homogenado resultante, se centrifuga durante 30 min a 15850 rpm y a un intervalo de temperatura entre -2 y 15 °C. Tras la centrifugación, se desecha el sobrenadante y la capa lipídica aspirando al vacío con pipeta pasteur, dejando sólo el pellet, al que se le añade 30 ml de tampón Hepes 20 mM (por tubo). Se lleva el pellet al polytron (velocidad media y 2x1 min) o bien se sónica durante 5 sg a intensidad media cada tubo, dependiendo de la cantidad de pellet obtenido, de forma que si hay poco, se emplea el sonicador y si no, el polytron.

Obtenido el homogenizado, se llevan los tubos a la centrifuga J-21 durante el

mismo tiempo y velocidad y temperatura a la que estuvo antes, se desecha el sobrenadante y la capa lipídica, dejando sólo el pellet, y luego se añade 0,5 ml de tampón Hepes con PMSF por glándula. Cada tubo se sonica durante 5 sg a intensidad media. En una probeta, se añaden todos los tubos y se le añade más tampó con PMSF si es necesario. Se distribuye el homogenado en alícuotas de un determinado volumen en tubos Eppendorf, para congelarlas a -80 °C posteriormente para su conservación.

#### **Tampón de homogeneización más inhibidores proteasas.**

Para 250 ml:

- Sacarosa 0,25 M	21,4 g
- Trietanolamina 10 mM	0,464 g
- EDTA 0,5 mM	0,025 g
- Bacitracina	25 mg
- TLCK	2,5 mg
- PMSF	12,5 mg
- pH 7,5 con NaOH	

Al final , las membranas de células de glándulas Harderianas se resuspenden en Hepes 20 mM con PMSF (5 mg PMSF/100 ml Hepes 20 mM).

#### **II.3.1. ESTUDIOS DE FIJACIÓN (BINDING).**

Antes de iniciar los estudios de fijación donde ucentes a la caracterización del receptor  $\beta$ -adrenérgicos, hay que establecer las condiciones físico-químico-temporales en que el sistema se encuentra en equilibrio, siendo este requisito imprescindible para poder aplicar la ley de acción de masa correctamente que es :

La unión de un ligando con su receptor se rige por la ley de acción de masas según estas si dos especies químicas se encuentran en forma monomolecular, con una



distribución espacial aleatoria, y la interacción se produce molécula a molécula y es reversible, la cinética del proceso puede describirse mediante las siguientes ecuaciones:



$$[L] \times [R] \times K_{+1} = [LR] \times K_{-1}$$

$$[L][R]/[LR] = K_{-1} / K_{+1} = K_d = 1/K_A$$

Siendo. L: ligando; R: receptor;  $K_{+1}$  : constante cinética de asociación;  $K_{-1}$ : constante cinética de disociación;  $K_d$ : constante de disociación;  $K_A$ : constante de asociación.

Así, se estudiarán todos los criterios relacionados con la caracterización de estos sitios de unión como la cinética de asociación, reversibilidad, concentraciones de muestras, concentraciones del radioligando, estudio estequiométrico, especificidad y ritmo circadiano.

### **II.3.2. Determinación de tiempo y temperatura de incubación.**

En este experimento se estudia la unión del [ $^{125}$ I]CYP en relación con el tiempo y la temperatura de incubación. Entonces para la unión se usa 200  $\mu$ l de membrana cruda de la glándula Harderiana, 100  $\mu$ l del [ $^{125}$ I]CYP con una concentración de 50 pM y añadiendo 100  $\mu$ l de drogas o con tampón.

Las temperatura de incubación fueron de 0 °C, 20 °C y 30 °C durante unos tiempos de 0, 5, 15, 30, 60, 90 min. La incubación se para añadiendo 100  $\mu$ l del tampón tris frío 10 mM a pH 7,6 (que contiene 154 mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, y 1mM ácido ascórbico) . A 300  $\mu$ l de la mezcla después se centrifuga durante 2 min a 12000 R.P.M., se aspira el sobrenadante y se lava el pellet añadiéndole 200 o 300  $\mu$ l de tampón tris frío, se centrifuga otra vez durante 2 min a 12000 rpm. Luego se hace la cuenta de la radioactividad del pellet en el contador Beckman gamma LKB. La unión específica está definida con la unión total menos la unión en presencia de 1  $\mu$ M de propranolol.

### **II.3.3. Determinación de concentración de proteínas.**

Para definir la concentración óptima de proteínas a utilizar en los ensayos de fijación se realizan experimentos en los que , cantidades fijas del radioligando [<sup>125</sup>I]CYP (50 pM) se enfrentan a concentraciones crecientes de proteínas. Así, en un volumen final de 400  $\mu$ l que contiene 200  $\mu$ l de membrana cruda de Harderiana, con concentraciones crecientes de 0; 25; 50; 100; 200 y 300  $\mu$ g/ml de proteína, 100  $\mu$ l del radio ligando a concentración 50 pM y 100  $\mu$ l de drogas o tampón. La incubación se efectúa en un baño con agitación durante 30 min a temperatura de 0 °C y 30 °C, se para la reacción añadiendo 100  $\mu$ l de tampón tris frío 10 mM a 300  $\mu$ l de la muestra y se centrifuga durante 2 min a 12000 rpm. La radioactividad del pellet fue contada en contador a Beckman gamma LKB.

### **II.3.4. Estudios de asociación-disociación.**

En este experimento se estudia asociación -disociación del complejo receptor-trazador. En ambos casos, se analiza la cantidad del radioligando unido a las proteínas a lo largo del tiempo, utilizando concentraciones fijas de radioligando (50 pM) y 300  $\mu$ g/ml de proteínas. La disociación del complejo receptor-trazador se induce mediante una adición de una concentración alta del propranolol (10  $\mu$ M) para así eliminar los procesos de reasociación. Después de 30 min de incubación se añade 10  $\mu$ l del propranolol, luego se para la reacción a los tiempos 0; 5; 10; 20; 30 y 60 min añadiendo tampón tris 10mM.

El análisis de los datos de disociación se hace según ecuaciones de primer orden, y el de los de asociación mediante ecuaciones de pseudo primer orden, obteniéndose la  $K_{-1}$  y  $K_{+1}$  respectivamente. Estas constantes cónicas dependen tanto de la concentración del radioligando como de la concentración de las proteínas de las membranas, pero su cociente ( $K_{-1}/K_{+1}$ ) es siempre Kd.

### **II.3.5. Estudios de saturación.**

Los estudios de saturación permiten obtener estimaciones de la afinidad del ligando por el receptor ( $K_d$ ), definida como la concentración de ligando con lo que se ocupan la mitad de los receptores, y de la concentración de receptores ( $B_{max}$ ) expresada como pmol/L.

Los experimentos de saturación, se usa una concentración fija de proteínas (300  $\mu\text{g/ml}$  200  $\mu\text{l}$ ) a concentraciones crecientes de radioligando en un rango entre 3 y 1200 pM (100  $\mu\text{l}$ ) y llevando a un volumen de 400  $\mu\text{l}$  añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de tampón o de ligando no radioactivo. Se incubó la mezcla durante 30 min a una temperatura de 30 °C. se para la reacción añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de tampón tris frío 10 mM a 300  $\mu\text{l}$  de la muestra y se centrifuga durante 2 min a 12000 rpm. La radioactividad del pellet fue contada en contador a Beckman gamma LKB.

### **II.3.6. Estudio estequiometrico.**

El experimento de la unión de [ $^{125}\text{I}$ ]CYP al receptor  $\beta$ -adrenérgico en relación con el desplazamiento de esta unión específica por medio del propranolol contaba con los siguientes reactivos: 200  $\mu\text{l}$  de membrana cruda de Harderiana con una concentración de proteínas (300  $\mu\text{g/ml}$ ); 100  $\mu\text{l}$  de [ $^{125}\text{I}$ ]CYP a concentración de 50 pM y 100  $\mu\text{l}$  de propranolol con concentraciones crecientes de  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M o tampón.

- La incubación fue a 30 °C durante 30 min.
- Se detenga la reacción añadiendo tampón tris frío y centrifugación durante 2 min a 12000 rpm.
- El pellet lavado dos veces y la radioactividad fue contada en el contador Beckman gamma LKB.

Con estos experimentos se determina el IC50, o la concentración de sustancia competidora (propranolol) que inhibe la fijación del radioligando en un 50 %.

### **II.3.7. Estudios de especificidad.**

Los estudios de competición, inhibición o desplazamiento permiten estudiar la afinidad que presentan una serie de ligandos fríos por un receptor determinado.

Estos experimentos, se realizan exponiendo concentraciones fijas de [<sup>125</sup>I]CYP 50 pM (100  $\mu$ l) y concentraciones de proteínas de 300  $\mu$ g/ml (200  $\mu$ l), a concentraciones crecientes en ordenes logaritmicos de 10<sup>-9</sup>- 10<sup>6</sup> M de drogas (Propranolol, Isoproterenol, Morepinefrina, Clonidina, Yohimbina, Metoxamina y Prazosin) con un volumen de 100  $\mu$ l. El proceso de unión se llevo a cabo como está descrito en el párrafo anterior.

### **II.3.8. Estudios de la variación día-noche de la unión del [<sup>125</sup>I]CYP a los receptores.**

En estos experimentos las ratas fueron sacrificadas a las 10:00, 14:00, 17:00, 20:00, 22:00, 24:00, 03:00 y 06:00 h. De noche las ratas fueron sacrificadas en oscuridad bajo luz roja y las glándulas Harderianas fueron almacenadas a -70 hasta sus procesamiento. Se usa 200  $\mu$ l de membranas crudas a 300  $\mu$ g/ml de proteínas después de sus aislamiento más 100  $\mu$ l del trazador a 50 pM, y se lleva al volumen final de 400  $\mu$ l añadiendo 100  $\mu$ l de propranolol (1  $\mu$ l) o tampón tris. Se incuban los tubos a 30 °C durante 30 min luego se detiene la reacción con 100  $\mu$ l de tampón tris frío y centrifugación durante 2 min a 12000 rpm, se lava el pellet dos veces y se cuenta la radioactividad en el contador Beckman gamma LKB.

#### **II.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICOS Y PROGRAMAS DE ORDENADORES:**

En algunos los casos los valores están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM).

Los resultados de la actividad de NAT se expresan en pmol/mg proteína.

La unión específica del radio ligando, expresada en % del máximo, es la diferencia entre la unión total y la unión no específica dividido por la radioactividad total expresada en cpm.

Los datos de los experimentos en lo que se comparaban más de dos poblaciones, fueron estadísticamente analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de Student-Newman-Keuls de multiple rango.

Se utilizaron también los siguientes programas:

Word Perfect versión 5.1 y 6.1 para windows.

Sigma Plot Scientific grafic

Freelance grafic.

### ***III. RESULTADOS.***

### **III.1. REGULACIÓN ADRENÉRGICA DE LA ACTIVIDAD N-ACETILTRANSFERASA (NAT) EN PINEAL DE RATA DURANTE EL DESARROLLO: ESTUDIOS *EN VITRO*.**

#### **III.1.1. Estudio del efecto del Isoproterenol y la Metoxamina sobre la actividad NAT en pineal de ratas de 2 y 6 semanas de edad en cultivo.**

En estos experimentos, estamos comparando el efecto de los agonistas de los receptores  $\alpha$ - $\beta$ -adrenérgicos sobre la actividad de la NAT durante el desarrollo en pineal de ratas. Las ratas fueron sacrificadas y las glándulas pineales fueron incubadas con Isoproterenol (Iso) y Metoxamina (Met), agonistas de receptores  $\beta$ - y  $\alpha$ -adrenérgicos respectivamente.

En figura.18, el Isoproterenol se comporta como un potente activador del enzima en pineal de ratas adultas, sin embargo en ratas de 2 semanas observamos que el Iso es menos eficaz en la estimulación de la NAT(gráfica de izquierda).

En la otra gráfica la Metoxamina estimula legeramente la actividad de la NAT en pineal de ratas de 2 y 6 semanas y el efecto de la metoxamina en ratas de 2 y 6 semanas es similar al contrario del Isoproterenol

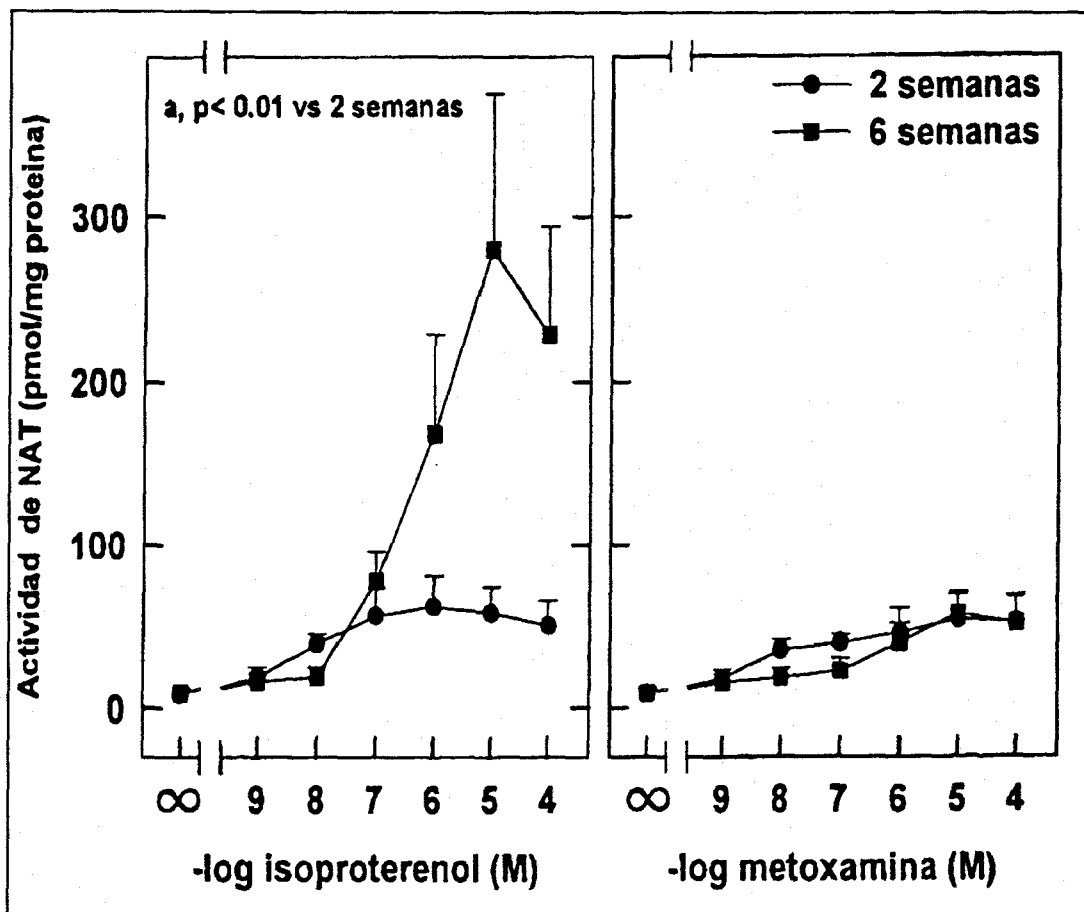


Figura. 18: Efecto del Isoproterenol (gráfica Izquierda) y de la Metoxamina (gráfica derecha) sobre la actividad de la NAT en glándula pineal de ratas de 2 y 6 semanas de edad.



### **III.1.2. Estudio del efecto del Isoproterenol y la Metoxamina sobre la producción del AMPc en pineales de ratas de 2 y 6 semanas de edad en cultivo.**

En este experimento, se estudia el efecto de Isoproterenol y la Metoxamina sobre la producción del AMPc en pineal de rata durante el desarrollo. las glándulas pineales fueron incubadas en presencia de 10  $\mu$ M de Isoproterenol, 10  $\mu$ M de Metoxamina y 1mM de IBMX. Hemos obtenido resultados similares que el estudio anterior al estudiar la producción del AMPc (figura. 19). El Isoproterenol es un potente activador de la producción del AMPc en ratas de 6 semanas que en ratas de 2 semanas . Sin embargo el efecto de la Metoxamina produce menos cantidad de AMPc en ambas edades esta cantidad es similar a la cantidad de AMPc producida bajo efecto del Isoproterenol en ratas de 2 semanas.

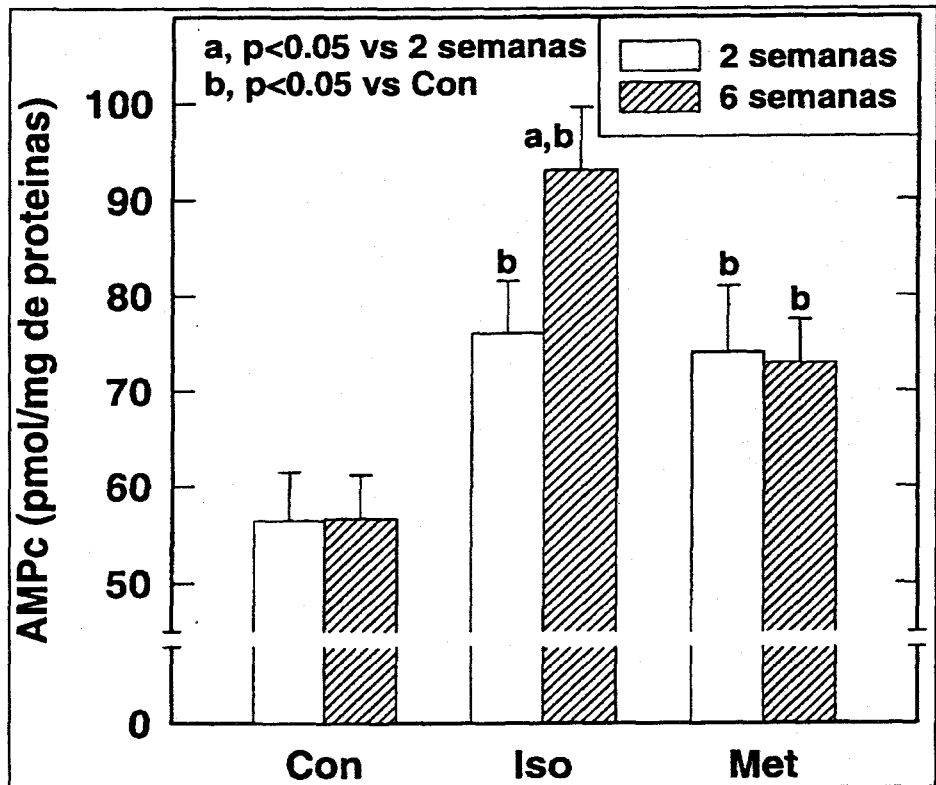


Figura. 19: Efecto del Isoproterenol (ISO) y la Metoxamina (Met) sobre la producción del AMPc en ratas de 2 y 6 semanas de edad. (Con: Control).

### **III.1.3. Estudio del efecto del Isoproterenol y del dibutiril-AMPC sobre la actividad de NAT de pineales de ratas de 2 y 6 semanas de edad en cultivo.**

En este experimento, se estudia el efecto del dibutiril-AMPC y del ISO sobre la actividad de NAT en pineales de ratas durante el desarrollo. Las glándulas pineales fueron incubadas en presencia de 10  $\mu$ M de ISO y 1 mM de dibutiril-AMPC este compuesto entra fácilmente en pinealocitos y unirse a las subunidades reguladoras de la proteína Kinasa AMPC dependiente, liberando las subunidades catalíticas, entonces el dibutiril-AMPC puede activar la NAT sin mediación del sistema receptor/efector de la membrana del pinealocito. Así, en figura.20, el ISO es un potente activador de N-acetiltransferasa en pineal de ratas de 6 semanas de edad que en pineales de ratas de 2 semanas de edad. Sin embargo el dibutiril-AMPC se comporta como un potente activador de la NAT en pineales de ratas de ambas edades. Este resultado confirma que la causa de la poca sensibilidad de la NAT en ratas de 2 semanas a través del mecanismo agonista  $\beta$ -adrenergico esta localizado a nivel de la membrana.

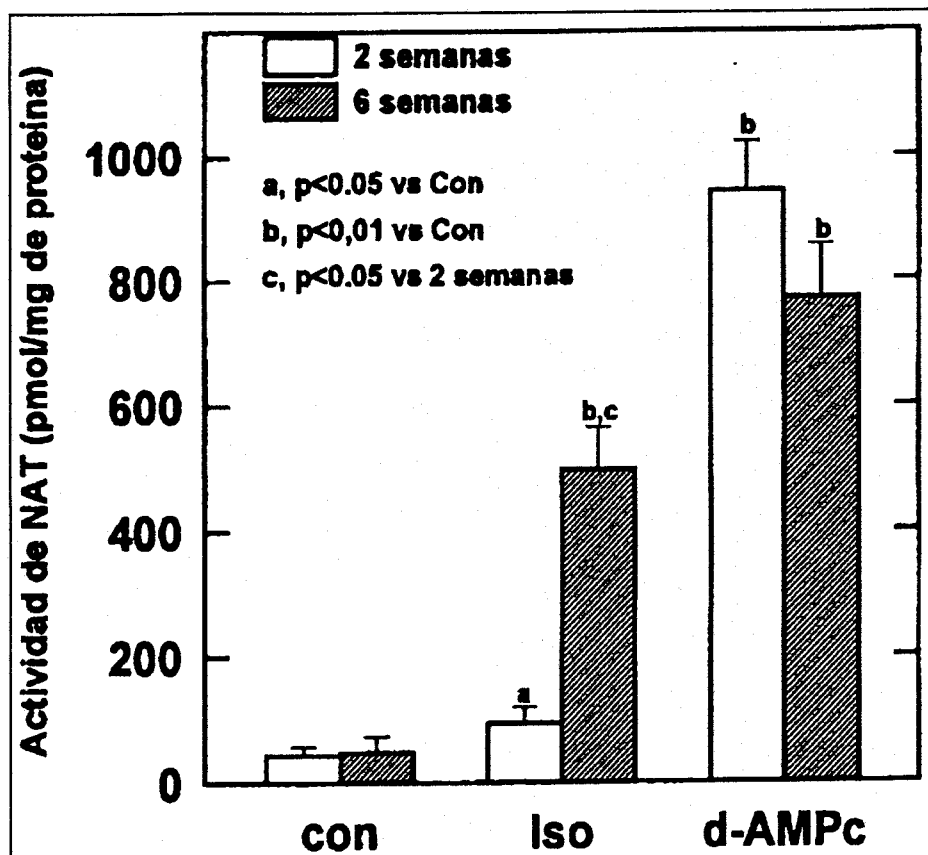


Figura. 20: Actividad de la NAT en glándulas pineales de ratas de 2 y 6 semanas de edad incubadas en ausencia (control: Con) o en presencia de  $10 \mu\text{M}$  de Isoproterenol (Iso) y  $1\text{mM}$  del dibutiril-AMPC (d-AMPC).

### III.1.4. Estudios de especificidad de los receptores $\alpha$ - $\beta$ -adrenérgicos.

En este estudio se requiere definir si los receptores  $\alpha_1$ - $\beta_1$ -adrenérgicos están implicados en disminuir la actividad de la NAT en glándula pineal de ratas de 2 y 6 semanas después de una incubación con Isoproterenol. Las glándulas pineales fueron incubadas con [ $^{125}$ I]CYP y [ $^{125}$ I]HEAT trazadores específicos de los receptores  $\alpha_1$ - $\beta_1$ -adrenérgicos respectivamente.

#### III.1.4.1. Estudio de unión del [ $^{125}$ I]CYP en pineales de ratas de 2 y 6 semanas.

En figura.21, la unión del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas de las glándulas pineales de ratas de 2 semanas es equivalente a los niveles de unión del trazador a las membranas pineales en ratas adultas. De hecho, la unión de trazador está alta en membranas pineales de ratas de 2 semanas de edad comparado a la unión del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas pineales de ratas adultas, además los estudios farmacológicos demuestran que el receptor  $\beta_1$ -adrenérgico reconoce específicamente el trazador específico. Así, en las gráficas (fig.21) la unión del [ $^{125}$ I]CYP está desplazado con el Isoproterenol y el Propranolol agonista y antagonista respectivamente del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico, mientras la Metoxamina y el Prazosin agonista y antagonista respectivamente del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico son ineficaces para desplazar la unión receptor-trazador.

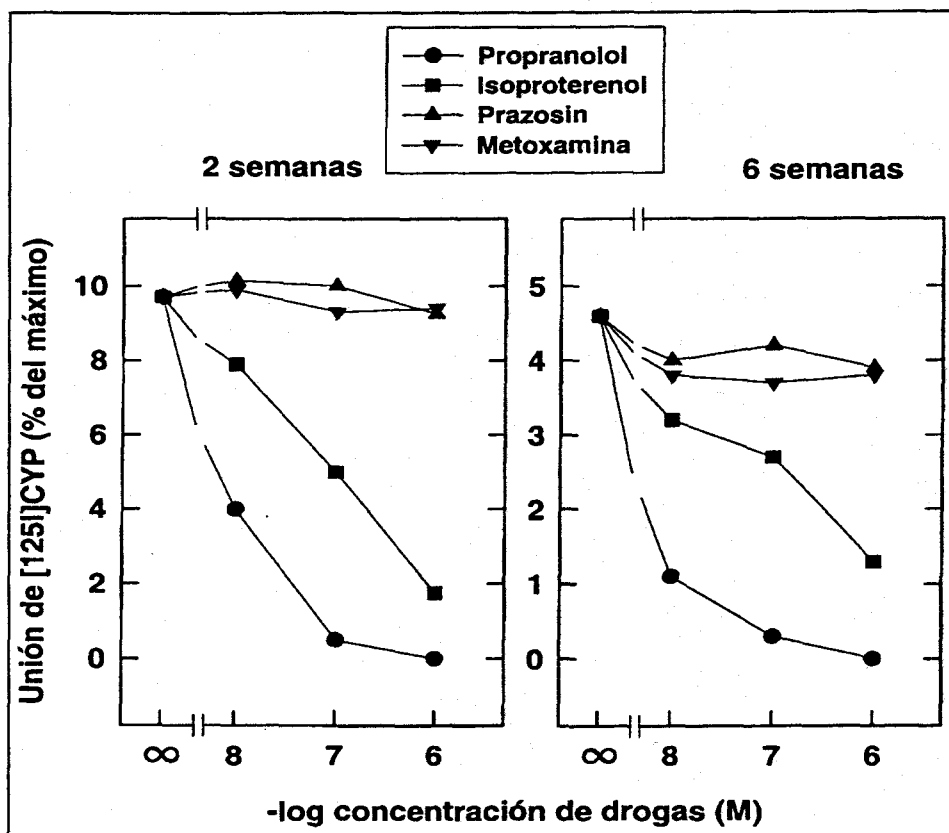


Figura. 21: Inhibición competitiva de la unión del [125I]CYP a las membranas de las glándulas pineales de ratas de 2 y 6 semanas con concentraciones crecientes de Isoproterenol, Propranolol, Metoxamina y Prazosin.

#### **III.1.4.2. Estudio de la unión del [<sup>125</sup>I]HEAT en pineales de ratas de 2 y 6 semanas.**

En este experimento usando [<sup>125</sup>I]HEAT tenemos resultados similares al estudio anterior usando [<sup>125</sup>I]CYP. En figura.22 la unión del trazador a las membranas de las glándulas pineales es alto en ratas adultas que en jóvenes. Los estudios farmacológicos también demuestran que esta unión es específica, así en ratas adultas y jóvenes la unión del [<sup>125</sup>I]HEAT a las membranas pineales está desplazada por Metoxamina y Prazosin. Sin embargo el Isoproterenol y el propranolol son ineficaces.

Estos estudios de unión demuestran la existencia de los dos receptores  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ -adrenérgicos en pineales de las ratas durante el desarrollo (2 y 6 semanas) y la unión de los trazadores es completamente específica en las diferentes edades, por lo tanto, la baja activación de la NAT con Isoproterenol en ratas de 2 semanas no está causada por los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos.

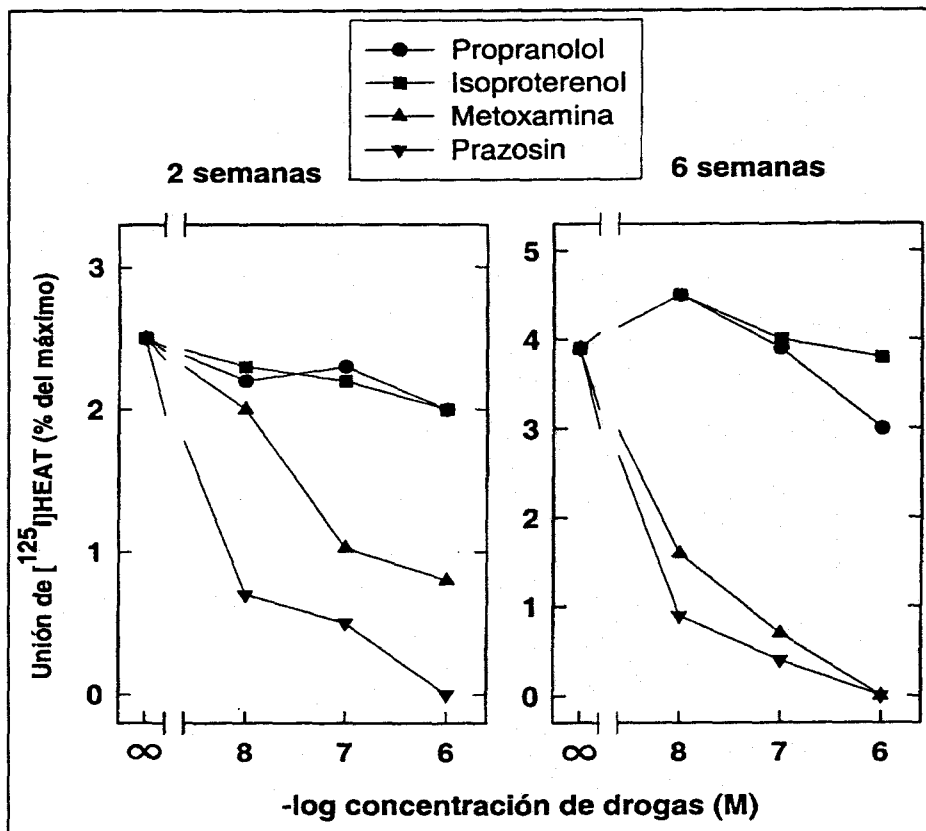


figura.22: Inhibición competitiva de la unión del  $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$  a las membranas de las glándulas pineales de ratas de 2 y 6 semanas con concentraciones crecientes de Isoproterenol, Propranolol, Metoxamina y Prazosin.



---

### III.1.5. ESTUDIO DE ADP-RIBOSILACIÓN CATALIZADA POR TOXINA COLÉRICA Y PERTUSICA EN MEMBRANAS PINEALES DE RATAS DE 2 Y 6 SEMANAS.

Para identificar el mecanismo postreceptor implicado en la diferencia de la sensibilidad de las glándulas pineales de ratas durante el desarrollo, hemos estudiado la presencia de las proteínas G en las membranas de pinealocitos.

Las membranas fueron incubadas con toxina colérica o la toxina pertusica en presencia de  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]NAD<sup>+</sup> para inducir la ADP-ribosilación de las proteínas G<sub>s</sub> o proteínas G<sub>i</sub>, respectivamente. Como se ve en figura 23 la existencia de 2 proteínas una de 45.0 KDa y otra de 42.0 KDa cuando la ADP-ribosilación de las membranas fue catalizada por toxina colérica, estas 2 proteínas corresponden a las dos formas de la proteína G<sub>sc</sub>. Sin embargo la cantidad del material ADP-ribosilado es mayor en membranas de las glándulas pineales de ratas de 6 semanas con relación de ratas de 2 semanas de edad.

Cuando las membranas pineales fueron incubadas con toxina pertusica, la figura 24, demuestra la existencia de una proteína de 40.0 KDa y la cantidad de material ADP-ribosilado es similar en ratas adultas que jóvenes. Así, la presencia de la proteína G<sub>sc</sub> es necesario para la activación del adenilato ciclasa a través del mecanismo  $\beta$ -adrenérgico, por lo tanto la presencia relativamente menor de las proteínas G<sub>sc</sub> en membranas de las glándulas pineales de ratas de 2 semanas de edad puede explicar la poca sensibilidad de la glándula pineal al ISO en esta edad (2 semanas).

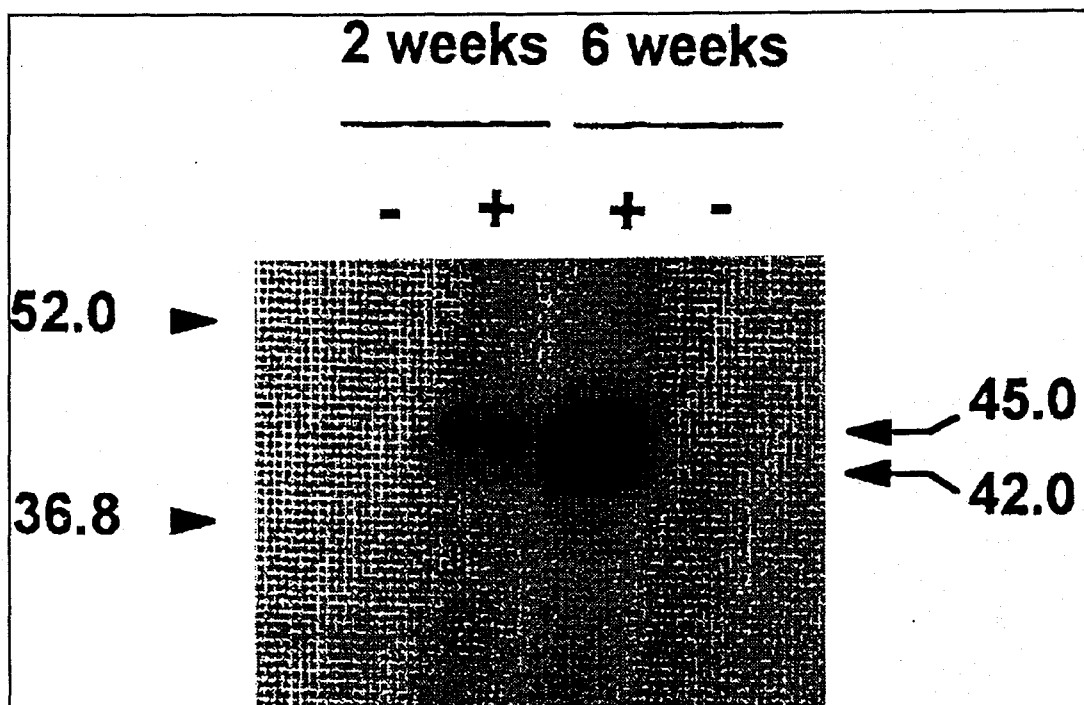


Figura.23 : ADP-ribosilación, catalizada con toxina cólerica, de las membranas de las glándulas pineales de las ratas durante el desarrollo postnatal. Las membranas pineales de las ratas de 2 y 6 semanas de edad fueron incubadas con  $1,5 \mu\text{M}$  de  $[^{32}\text{P}]\text{NAD}$  en presencia (+) o en ausencia (-) de la toxina cólerica.

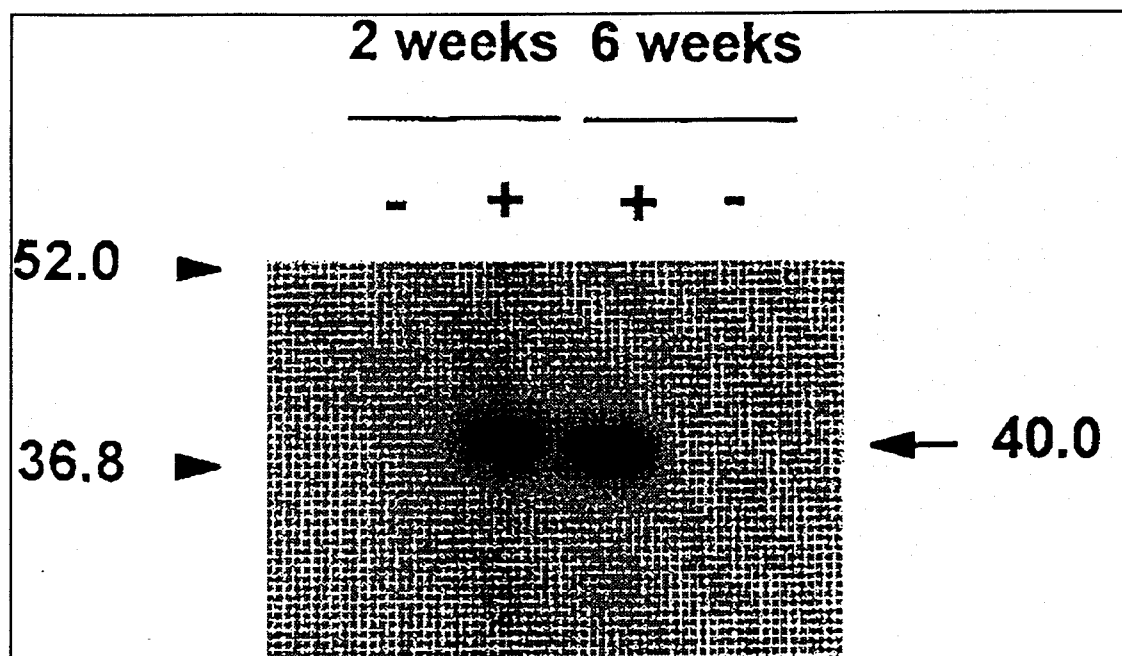


Figura.24 : ADP-ribosilación, catalizada con toxina pertusica, de las membranas de las glándulas pineales de las ratas durante el desarrollo postnatal. Las membranas pineales de las ratas de 2 y 6 semanas de edad fueron incubadas con  $0,7 \mu\text{M}$  de  $[^{32}\text{P}]\text{NAD}$  en presencia (+) o en ausencia (-) de la toxina pertusica.

### III.1.6. INMUNODETECCIÓN DE LA DIFERENTES SUBUNIDADES DE LAS PROTEÍNAS G EN MEMBRANAS DE LAS GLÁNDULAS PINEALES DE RATAS DE 2 Y 6 SEMANAS DE EDAD.

En este experimento se estudia la inmunodetección de las diferentes subunidades de  $G_{\alpha}$  y  $G_{\beta}$  común, la figura 25, revela la existencia de una diferencia entre los niveles de las proteínas  $G_{s\alpha}$  en membranas pineales de ratas de 2 y 6 semanas de edad. Así, los niveles de las proteínas de 45.0 KDa y 42.0 KDa son relativamente inferiores en ratas jóvenes y aumentan en ratas de 6 semanas. Al contrario, los niveles de la subunidad  $G_{i\alpha 1-2}$  son altos en ratas jóvenes que adultos. Otras proteínas como  $G_{i\alpha 0-3}$ ,  $G_{q\alpha 11}$  o  $G_{\beta}$  común están en una cantidad similar en ambas edades. Este resultado demuestra que la diferencia de la sensibilidad de las glándulas pineales en ratas de 2 semanas puede explicarse con los niveles inferiores de las proteínas  $G_{s\alpha}$ .

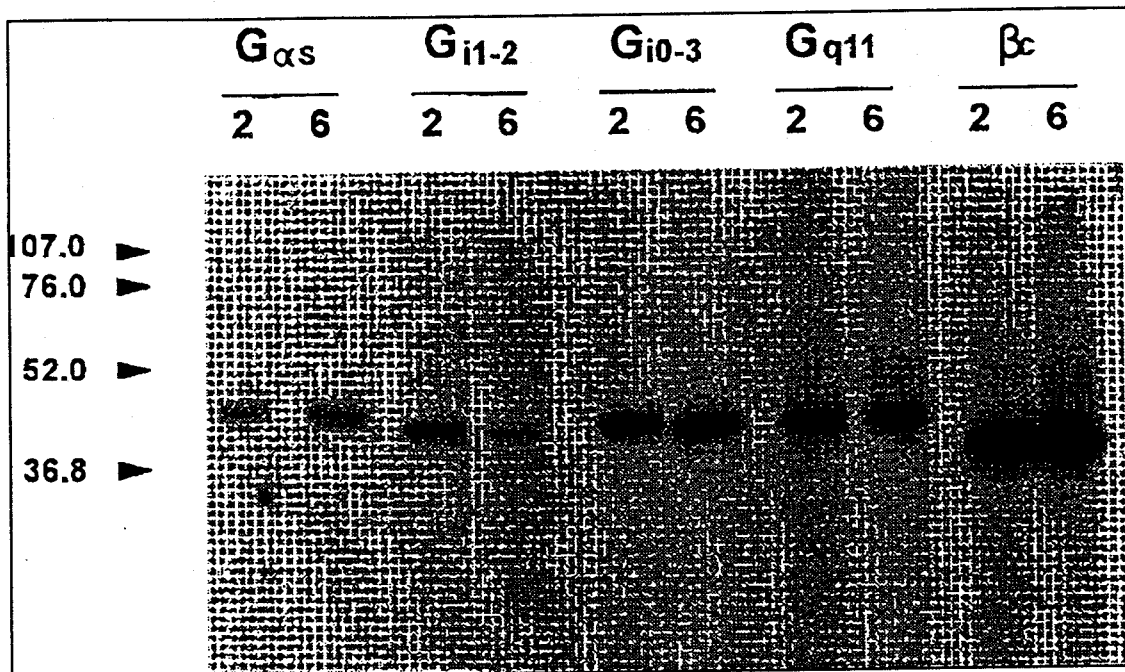


Figura.25 : Inmunodetección de diferentes subunidades de la proteína G en membranas de las glándulas pineales de ratas de 2 y 6 semanas.

---

## III.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES $\beta$ -ADRENÉRGICOS EN GLÁNDULA HARDERIANA.

La caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos comprende los estudios de la unión específica del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas crudas de la glándula Harderiana de rata, realizándose estudios cinéticos, estudios de la concentración de proteínas, la saturación, estudios estequiometricos, estudios de especificidad y la diferencia día-noche de la unión del [ $^{125}$ I]CYP a la membrana de la glándula Harderiana.

### III.2.1. ESTUDIOS CINÉTICOS.

Se comenzó la caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos para estudiar la unión específica del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas de la glándula Harderiana de rata en relación con la temperatura y el tiempo de incubación. 200  $\mu$ l de membranas crudas de la glándula Harderiana se incubaron con 50 pM del [ $^{125}$ I]CYP y 1  $\mu$ M de Propranolol a las temperaturas de 0, 20 y 30 °C durante 5, 15, 30, 60 y 90 minutos.

La unión específica del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas de la glándula Harderiana depende del tiempo y la temperatura (Figura. 26). A una temperatura de 30 °C la unión del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas crudas de la glándula Harderiana es rápido con valor máximo a las 30 min y se queda estable hasta las 90 min. La unión específica del trazador a las temperaturas de 0 °C, 20 °C esta ascendiendo durante las primeras 30 min, después un aparente equilibrio se estabiliza enter 60 min y 90 min sin embargo la unión máxima a 0 °C y 20 °C se queda inferior a la unión obtenida a 30 °C. Así, durante todos los ensayos, el tiempo de incubación sera de 30 min y a una temperatura de 30 °C. Los resultados se expresan en % de la unión total de [ $^{125}$ I]CYP a las membranas.

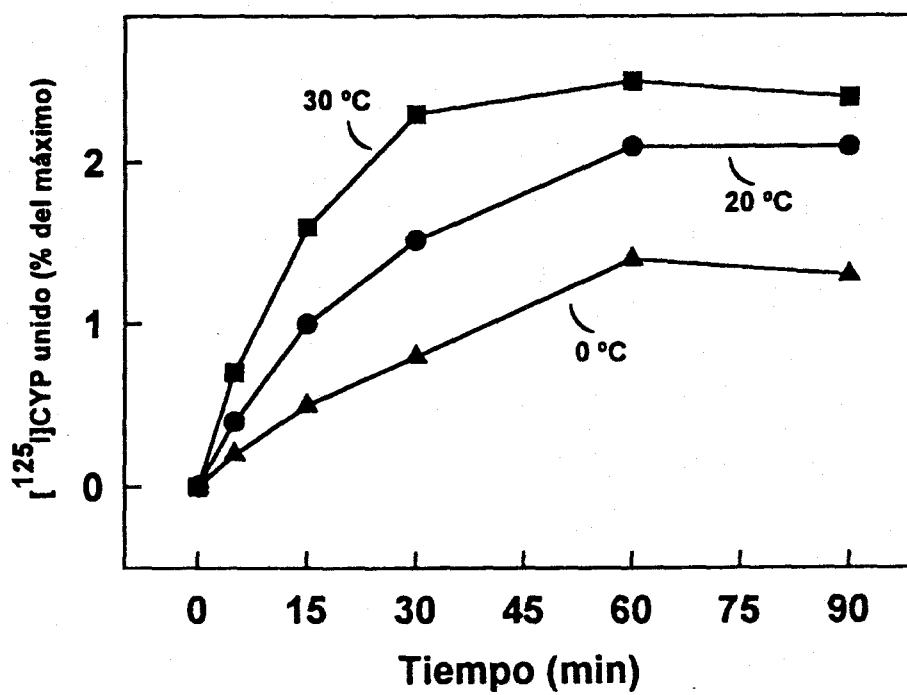


Figura. 26: Cinética de asociación del [<sup>125</sup>I]CYP a las membranas crudas de la glándula Harderiana en función de la temperatura y tiempo de incubación.

### **III.2.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.**

Se estudió la unión específica del [<sup>125</sup>I]CYP a las membranas crudas de la glándula Harderiana de rata con concentración de proteína.

En figura.27, observamos que la unión específica del [<sup>125</sup>I]CYP incrementa proporcionalmente cuando aumenta la concentración de proteína hasta 300 µg/ml (r= 0.995). Concentraciones de proteínas de 25, 50, 100, 200 y 300 µg/ml se incubaron con [<sup>125</sup>I]CYP (50 pM) a 30 °C durante 30 min para obtener la unión máxima.



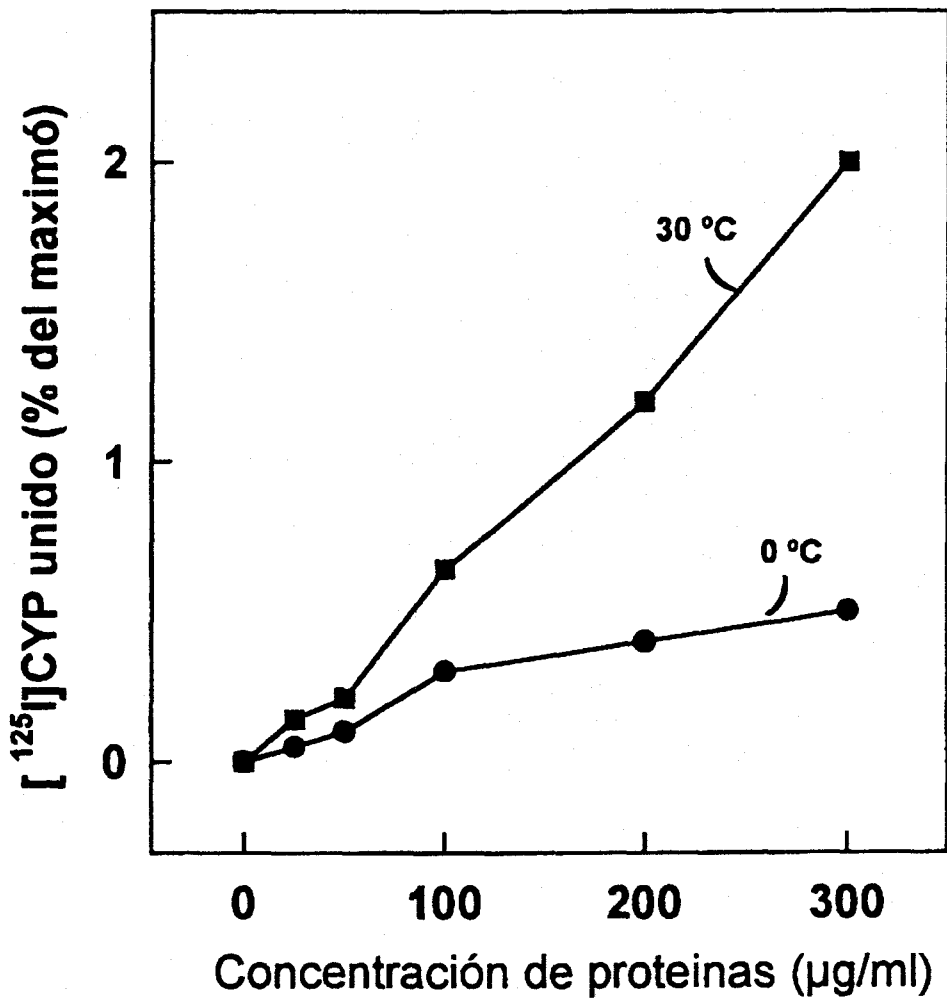


Figura. 27: Cinética de asociación del [<sup>125</sup>I]CYP a las membranas crudas de la glándula Harderiana en función de la concentración de proteínas.

### III.2.3. ASOCIACIÓN DISOCIACIÓN.

A continuación se estudió la asociación y disociación del [ $^{125}$ I]CYP a la membrana de la glándula Harderiana de rata. Bajo las condiciones óptimas (temperatura de incubación de 30 °C durante 30 min, con una concentración de proteínas de 300  $\mu$ g/ml) la unión del [ $^{125}$ I]CYP a la membrana incrementa durante las primeras 30 min alcanzando un equilibrio aproximadamente después de 30 min hasta 60 min (figura 28 arriba), mostrando una  $K_{+1} = 1,62 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  (figura 28 bajo izq). La unión del [ $^{125}$ I]CYP a la membrana es reversible, así, la disociación del complejo membrana-trazador está estudiado añadiendo 1  $\mu$ M del propranolol (antagonista del receptor  $\beta$ -adrenérgico). La disociación se produce en unos 10 minutos, según una cinética con una constante cinética  $K_{-1} = 0,086 \text{ min}^{-1}$  (figura 28 bajo derecha). La constante de disociación, se calcula a partir del cociente de las constantes cinéticas previamente indicadas ( $K_{-1}/K_{+1}$ ) es 13,2 pM.

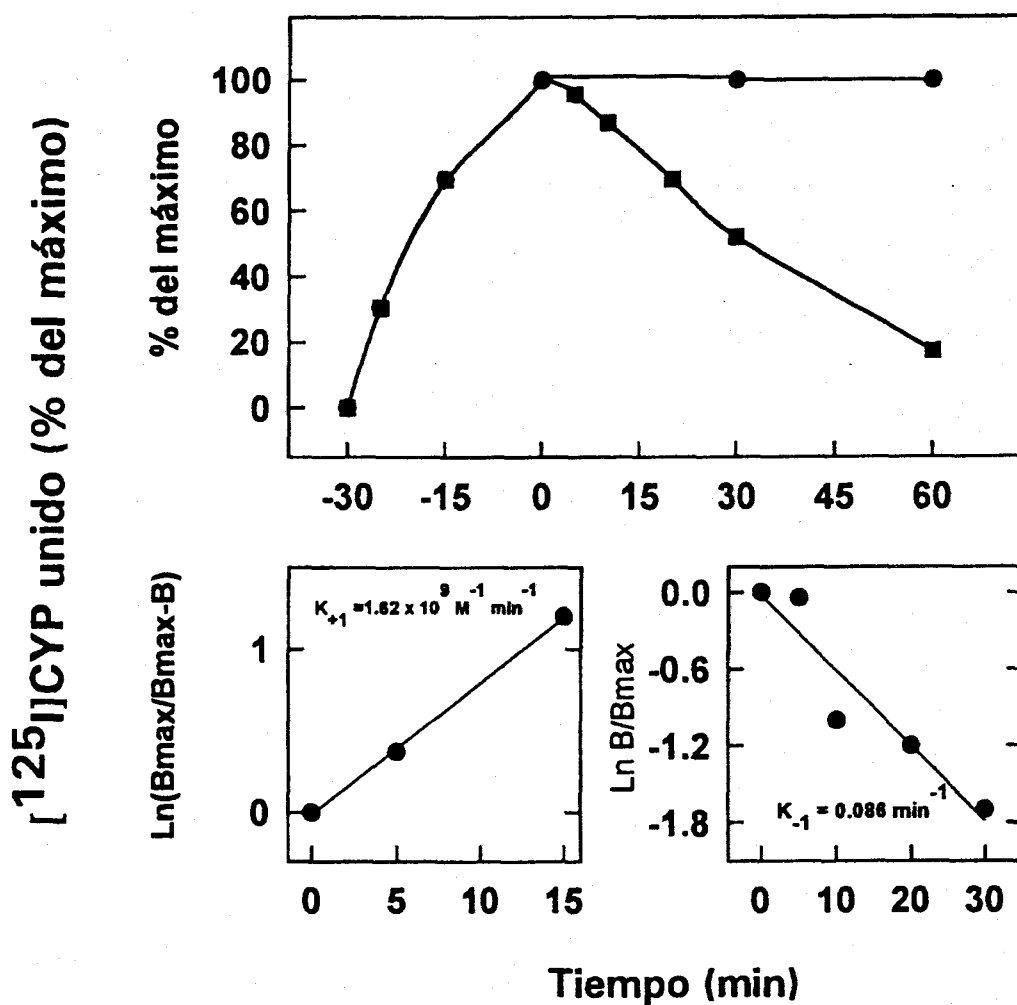


Figura.28: Asociación y disociación del  $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$  a las membranas de la glándula Harderiana. Bajo.izq: transformación lineal de la cinética de asociación. Bajo derecha: transformación lineal de la cinética de disociación.

### III.2.4. ESTUDIOS DE SATURACIÓN.

También se estudió la fijación del radioligando a las membranas crudas de la glándula Harderiana de rata en función de la concentración del [<sup>125</sup>I]CYP. 300 µg/ml de proteínas de la membrana se incubaron con concentraciones de 3, 50, 150, 300, 600 y 1200 pM del radioligando a 30 °C durante 30 min.

La unión específica del [<sup>125</sup>I]CYP incrementa proporcionalmente hasta una concentración del trazador de 1,2 nM (figura 29), y demostró ser saturable, produciendo un análisis de Scatchard lineal indicativo de un solo tipo de sitio de unión. La afinidad se encuentra en el rango picomolar  $K_d = 290$  pM, próxima a la obtenida en los experimentos de asociación-disociación, presentando una densidad de receptores de  $B_{max} = 32$  pmol/L.

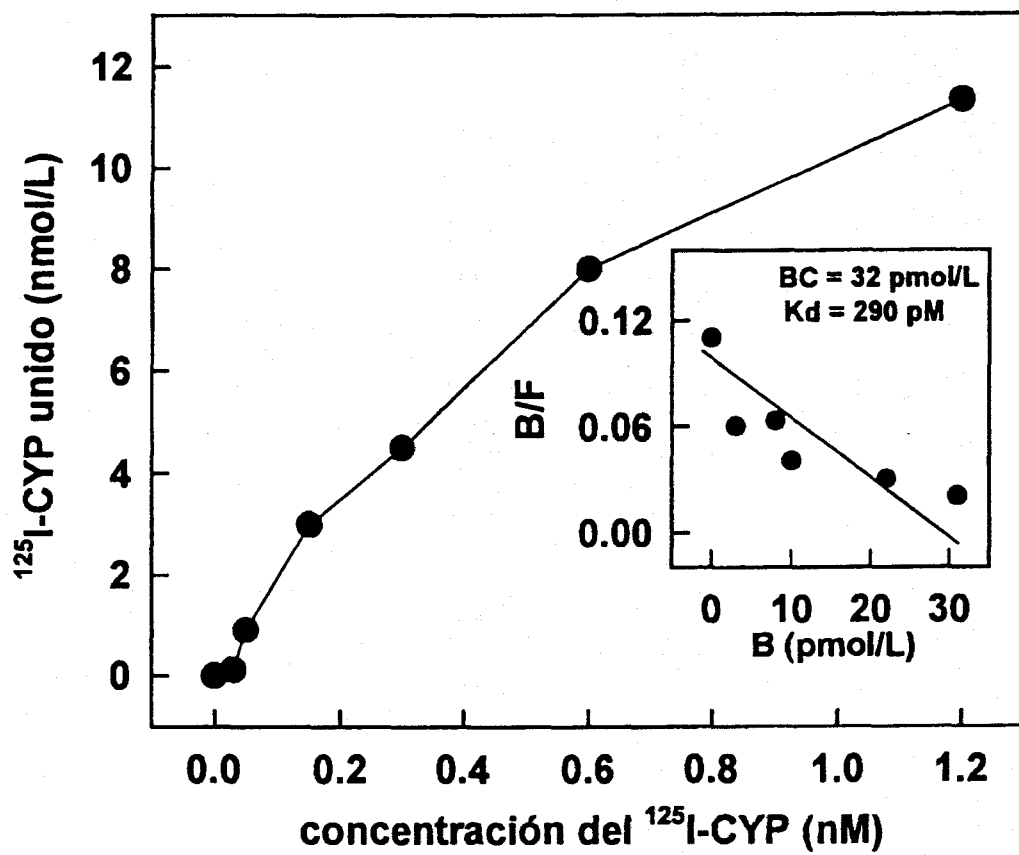


Figura. 29: Saturación isoterma de la unión del  $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$  en membranas de la glándula Harderiana, y análisis de Scatchard de la unión con  $K_d=0,29 \text{ nM}$  y  $B_{\text{max}}= 32 \text{ pmol/L}$ .

### **III.2.5. ESTUDIOS ESTEQUIMETRICOS.**

En este experimento realizamos el estudio que consiste a la unión específica del [<sup>125</sup>I]CYP a las membranas crudas de la glándula Harderiana de rata en relación con el desplazamiento de éste unión específica por medio del propranolol. 300 µg/ml de proteínas de la membrana se incubaron con 50 pM del trazador en presencia de concentraciones crecientes del propranolol (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 nM) a 30 °C durante min. Los resultados muestran una inhibición de la unión del trazador a la membrana con concentraciones crecientes de propranolol, alcanzandose la IC<sub>50</sub> a 28,1 nM. La representación gráfica de la figura 30, muestra la curva de desplazamiento en porcentaje de la unión total con sus correspondientes errores entandares.

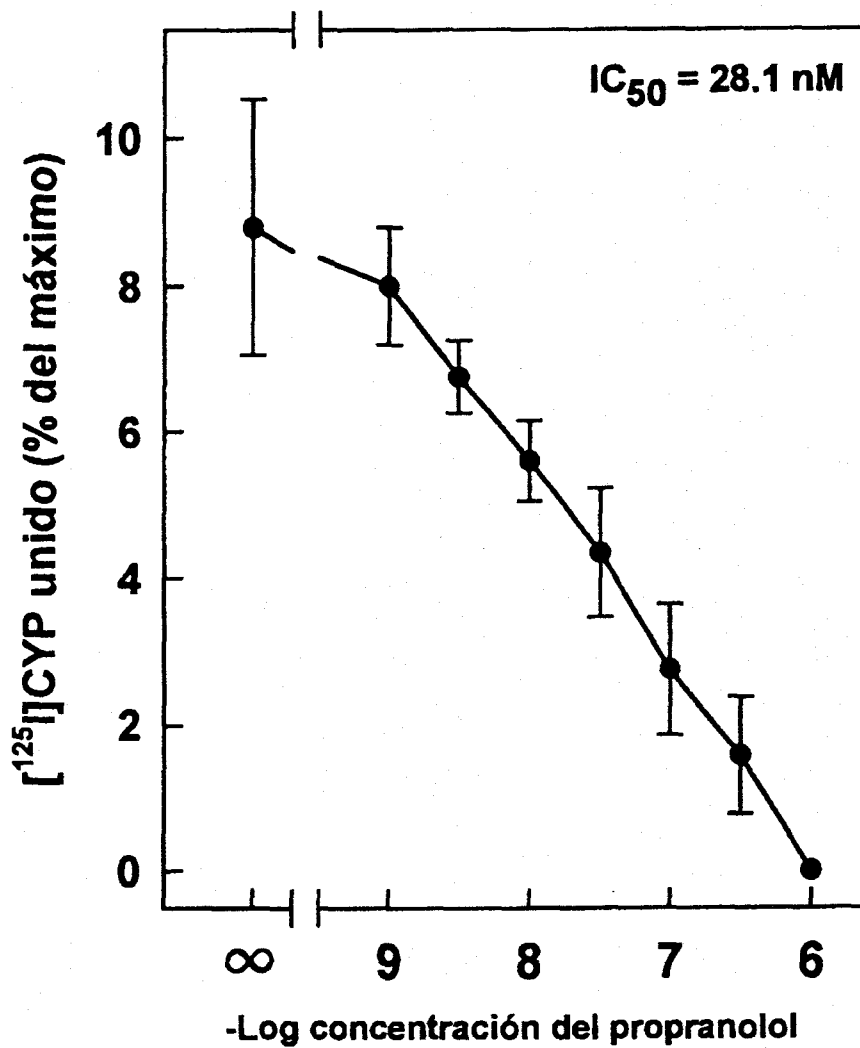


Figura. 30: Estudio estequiometrico de la unión del  $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$  a las membranas de las glándulas Harderianas, con  $\text{IC} = 28,1 \text{ nM}$ .

### III.2.6. ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD.

Se estudió la especificidad de la unión específica del [<sup>125</sup>I]CYP a las membranas de la glándula Harderiana de rata. 300 µg/ml de proteínas crudas se incubaron con 50 pM del trazador a 30 °C durante 30 min, añadiéndose concentraciones entre 10<sup>-9</sup> y 10<sup>-6</sup> M de Clonidina, Yohimbina, Metoxamina, Prazosin, Isoproterenol, Propranolol y Norepinefrina. En figura 31, únicamente la Ne, Iso y PP son capaces de desplazar la unión del [<sup>125</sup>I]CYP a los receptores. Sin embargo ningún otro compuesto estudiado afectó la unión específica del trazador. Así, el orden de eficacia de estos compuestos esta expresando con la concentración de inhibición a la mitad (IC<sub>50</sub>): Iso 19.1 nM; PP 28.1 nM y Ne 96.3 nM, Clonidina, Yohimbina, Metoxamina y Prazosin son ineficaces a concentración de 1 µM.



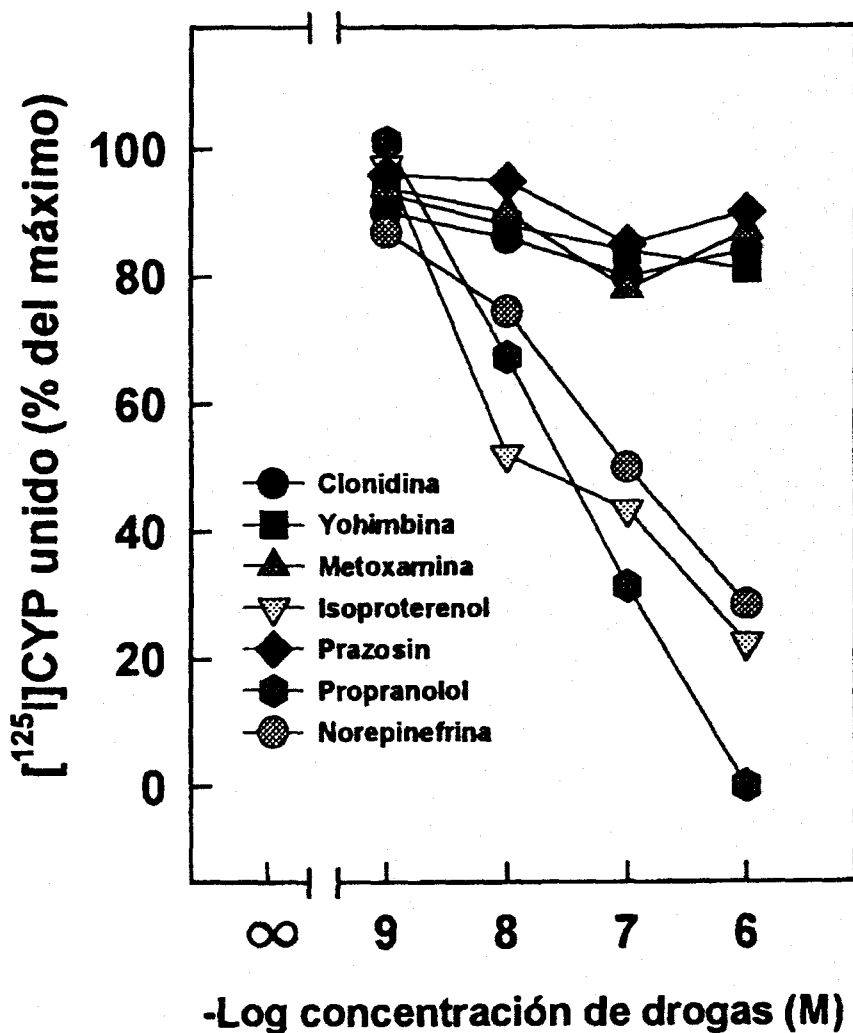
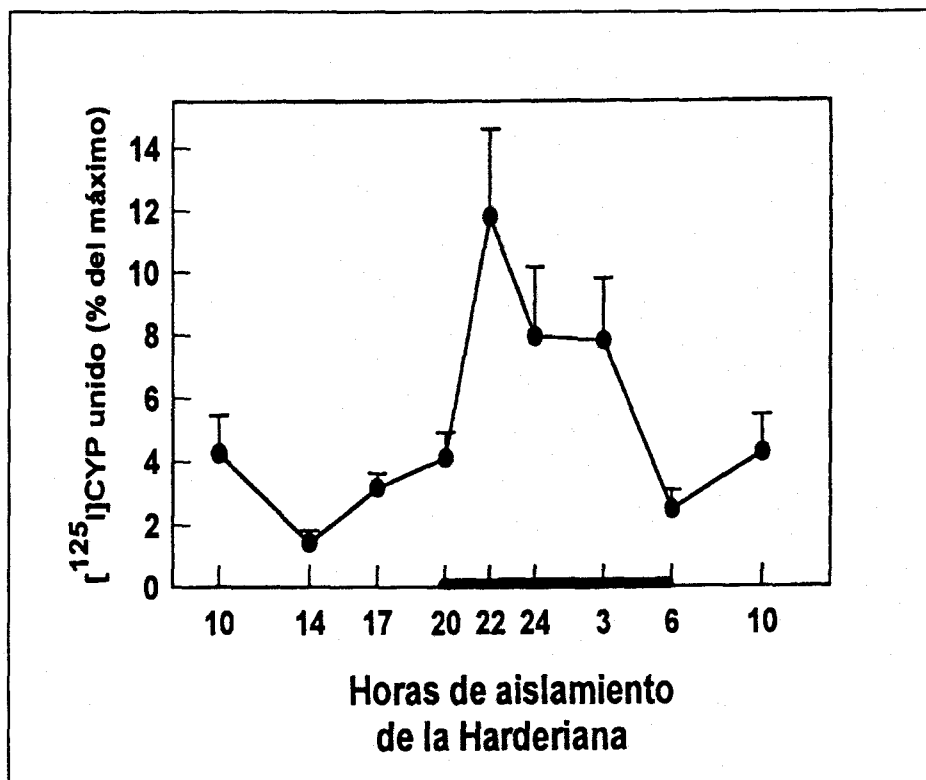


Figura. 31: Inhibición competitiva de la unión del  $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$  en membranas de las glándulas Harderianas de ratas.

### **III.2.7. ESTUDIO DE RITMO CIRCADIANO EN LA FIJACIÓN DEL [<sup>125</sup>I]CYP A LAS MEMBRANAS CRUDAS DE LA GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.**

El estudio de fijación del [<sup>125</sup>I]CYP (50 pM) a lo largo de 24 horas revela que la unión específica es máxima en la primera mitad de la fase oscura (22:00 h) representando una diferencia significativa respecto a los otros puntos del ciclo (figura 32).

Así, en la fase luminosa tenemos un bajo número de receptores libres, en la primera parte de la fase de oscuridad aparece un aumento importante en número de receptores libres en Harderiana alcanzando su máximo a las 22:00 h. En la segunda parte de la fase de oscuridad se produce una importante disminución del número de receptores libres en glándula Harderiana.



**Figura. 32:** Variación día-noche de la unión del  $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$  a las membranas de la glándula Harderiana. Los animales fueron sacrificados a tiempo indicado y la fase oscura esta indicada con una barra en negro en el eje de abscisas.

#### ***IV. DISCUSIÓN.***

En el presente trabajo se ha estudiado la regulación de la actividad de NAT en pineales de ratas durante el desarrollo. También la caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenergicos en glándula Harderiana de ratas. La finalidad de este estudio es de aportar nuevos datos sobre la diferencia de sensibilidad de la regulación de NAT vía los receptores  $\alpha$ - $\beta$ -adrenergicos durante el desarrollo.

La NAT (N-acetiltransferasa) es el enzima que cataliza la síntesis de N-acetilserotonina y paso limitante en la producción de melatonina, se mide de acuerdo con el metodo radioenzimatico descrito por Deguchi y Axelrod (1972) y Champney y cols (1984). La NAT es un enzima soluble localizado en el citoplasma del pinealocito y actua transfiriendo un grupo acetilo procedente del acetilCoA a la serotonina (Weissbach y cols, 1961). Considerando tales Caracteristicas se basa en que la NAT convierte mediante acetilación de la triptamina en N-acetiltriptamina utilizando como dador de grupos acetilos el [ $^{14}$ C]-acetilCoA.

Para el estudio in vitro el metodo de cultivo que hemoq utilizado para este estudio fue descrito por Brammer y cols (1981). Posteriormente, ha sido en numerosos estudios por otros autores. Así Santana y cols (1988a,b,c.1989,1990) emplean dicho método en sus trabajos sobre la glándula pineal de hámster; Guerrero y cols. (1988) y Murakami y cols (1989a) lo adoptan en sus trabajos sobre la pineal de ratas para estudiar la actividad 5'D. En estos experimentos se ha estudiado las causas por lo cual la NAT en pineales de ratas esta relativamente insensible al Isoproterenol en ratas de 2 semanas con comparación a las ratas de 6 semanas de edad, así, la activación con el Isoproterenol de la producción del AMPc y de la actividad de la NAT es muy importante en ratas adultas que ratas jovenes. Sabiendo que en glándula pineal de rata está establecido que la actividad de NAT esta regulada por un impulso nervioso simpático que estimula la liberación de la noradrenalina desde las terminaciones nerviosas simpáticas a la glándula pineal (Browstein y cols 1974). La noradrenalina

actúa sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de la membrana del pinealocito estimulando la adenilato ciclasa a través de una proteína  $G_s$ , dando lugar a un aumento de la concentración intracelular de AMPc este último que actúa en 3 diferentes niveles: primero, induciendo la transcripción de la NAT o de un regulador de NAT, segundo, estimulando la translación de NAT o de su regulador y tercero, en mantener la NAT en una forma activa.

No obstante, el efecto del dibutilil AMPc, que entra fácilmente en pinealocitos y aumenta el efecto del AMPc, sobre la actividad de la NAT es similar en pineales de ratas de ambas edades. Por lo tanto, la deficiencia de la sensibilidad de la glándula pineal de ratas al Isoproterenol, probablemente está situado a nivel de la membrana del pinealocito.

En estudios *in vivo* y *in vitro* anteriores se ha demostrado que los agonistas de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos estimulan la actividad de la NAT y otras enzimas, eg. tiroxina 5'-deiodinasa, en pineales de ratas durante el desarrollo, (Rubio y col. 1991 a, Rubio y col. 1991 b, Rubio y col. 1993.). En ratas adultas se conoce que el Isoproterenol es muy eficaz que la fenilifrina en la estimulación de la actividad de NAT, sin embargo, la fenilifrina tiene un efecto de potenciación sobre la respuesta al Isoproterenol (Klein y col. 1983), además, la fenilifrina que es un agonista del receptor  $\alpha$ -adrenérgico, es capaz de estimular la actividad de NAT en pineales de ratas durante el día y la noche en ratas de 2 semanas de edad, mientras en ratas adultas no tiene ningún efecto. También la metoxamina estimula la actividad de NAT en ratas de 2 semanas de edad, pero sin efecto en ratas adultas.

Por otra parte, la activación de NAT en ratas de 2 semanas inducida por el agonista del receptor  $\beta$ -adrenérgico (Iso) está impedida por el bloqueante del receptor  $\beta$ -adrenérgico (Propranolol) sin embargo el Prazosin antagonista  $\alpha$ -adrenérgico no puede evitar la activación de la NAT. No obstante, la activación de la NAT en glándula



pineal de ratas inducida por el agonista  $\alpha$ -adrenérgico (Fenilifrina) esta evitada no sólo por bloqueantes  $\alpha$ -adrenérgicos también por el Propranolol (antagonista del receptor  $\beta$ -adrenérgico. (Rubio y col. 1993).

A partir de estos resultados se sugiere que los agonistas de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgico actúan de una manera inespecífica al unirse a unos receptores relativamente inmaduros (Rowe y Parr 1981). Sin embargo la capacidad de unión de los trazadores con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en ratas de 6 semanas de edad es inferior a la capacidad de unión en ratas de 2 semanas de edad lo que se puede explicar con una disminución en la densidad o números de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con la edad sin modificación en la afinidad de estos receptores por sus agonistas (L.H. Greenberg y B. Weiss, 1978).

Así, en estos experimentos hemos estudiado la especificidad de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos en glándulas pineales de ratas de 2 y 6 semanas de edad usando unos trazadores radioactivos específicos para estos receptores, entonces se ha demostrado que ambos receptores están altamente específicos para sus trazadores en ambas edades (2 y 6 semanas) ya que la unión de los trazadores a sus receptores puede ser desplazado solamente por antagonistas y antagonistas correspondientes a estos receptores.

Por lo tanto, la especificidad de estos receptores o otras características de unión no pueden explicar la relativa sensibilidad de la NAT en pineal a la Metoxamina y la poca sensibilidad al Isoproterenol en ratas jóvenes. Estos resultados demuestran unas diferencias entre pineales de ratas jóvenes y adultas cuando fueron estudiadas la subunidades  $\alpha$  de las familias de proteínas G en membranas de pinealocitos. Así, estudios de ADP-ribosilación y inmunoblot demuestran claras diferencias entre ambas formas de la proteína  $G_{sa}$  (42 y 45 kDa), las dos formas demuestran unos valores bajos en pineales de ratas de 2 semanas de edad que los valores en ratas adultas. Este resultado está en acuerdo con los resultados de otros estudios indicando bajos valores

en la forma 42 kDa durante los primeros días de vida durante el desarrollo postnatal, sin embargo la forma 45 kDa no demuestra ningunos cambios (Babila y cols. 1992).

Así, en el presente estudio, la presencia creciente durante el desarrollo de las dos formas de la proteína  $G_{s\alpha}$  esta aproximadamente similar a la activación potente de la producción de AMPc y de la actividad de NAT en ratas adultas con relación a las ratas juvenes. Entonces este resultado aumenta la posibilidad que haya una relación entre la proteína  $G_{s\alpha}$  y la respuesta de la glándula pineal al Isoproterenol. Además, se han encontrado otras diferencias cuando las proteínas  $G_{i\alpha}$ ,  $G_{q\alpha11}$  o  $G_{\beta}$  comun fueron analizadas, la proteína  $G_{i\alpha}$  fue estudiada usando a dos antisueros locales detectan a la  $G_{i\alpha0-2}$  y  $G_{i\alpha0-3}$ , respectivamente, mientras la cantidad de materiales ADP-ribosilado de  $G_{i\alpha1-2}$ , al contrario de  $G_{s\alpha}$ , es bajo en ratas adultas que en ratas juvenes, luego no existe ninguna diferencia en la proteína  $G_{i\alpha0-3}$  durante el desarrollo.

Aunque es necesario otros experimentos, los bajos niveles de la proteína  $G_{i\alpha1-2}$  en pineales de ratas adultas y la capacidad de esta proteína de regular negativamente la actividad adenilato ciclasa, puede también participar en el aumento de la sensibilidad de la glándula pineal al Isoproterenol en ratas adultas. La proteína  $G_{q\alpha11}$  que pertenece a la familia de la proteína  $G_{q\alpha}$  es capaz de activar la fosfolipasa C, ademas es insensible a la toxina pertusica (Lee y cols. 1992, Helper y cols. 1993). Así, miembros de esta familia de proteínas estan acoplados a muchos tipos de receptores como, los receptores muscarinicos cholenergicos, romboxane  $A_2$ , bradikinina, angiotensina, y los receptores  $\alpha$ -adrenergicos (Mochizuki y cols. 1995), mientras que los niveles de la proteína  $G_{q\alpha11}$  no demuestra ningún cambio durante el desarrollo (en ratas de 2 y 6 semanas de edad).

Además los resultados son similares al estudiar la proteína  $G_{\beta}$  comun durante el desarrollo, esta subunidad  $\beta$  es comun en las distintas familias de la proteína G y no demuestra ningún cambio durante el desarrollo postnatal en glándula pineal de ratas. Mientras que ambas proteínas  $G_{q\alpha11}$  y  $G_{q-}$  parecen que no esta implicadas en ningún



cambio de sensibilidad de la glándula pineal de ratas al Isoproterenol durante el desarrollo.

Por otra parte, los estudios de caracterización de los receptores  $\beta$ -adrenergicos en glándula Harderiana se llevaron acabo con [ $^{125}$ I]CYP que es un trazador del receptor  $\beta$ -adrenergico que hace posible de examinar los sitios de los receptores  $\beta$ -adrenergicos en pequeñas cantidades de tejidos (Petrovic y cols, 1983), así con ICYP se ha demostrado una mejora en la propiedades de unión a los receptores  $\beta$ -adrenergicos (Engel y cols 1981). El trazador puede unirse con las membranas crudas de la glándula Harderiana de rata a traves de unos sitios de union de alta afinidad.

La union del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas crudas cumple todos los criterios de una unión a un receptor, de este modo la unión demuestra unas propiedades como la dependencia del tiempo y la temperatura lo mismo que la reversibilidad, la saturabilidad, alta afinidad y la especificidad. La  $K_d$  calculada a partir del analisis de estudios cineticos estan en acuerdo con la  $K_d$  derivada a partir de estudios de la saturación sugiriendo que la unión del ligando con su receptor sigue los principios de acción de masa según una reacción de primer pseudoorden.

Los estudios de saturación se llevaron acabo usando exclusivamente la aumentación de la concentración del [ $^{125}$ I]CYP. La interpretación de los resultados de analisis de Scatchard (Scatchard, 1949) revelan la existencia de un sitio de unión por el ligando a nivel de la membrana de la glándula Harderiana. Los valores de la constante de afinidad ( $K_d = 290$  pM) y la capacidad de unión (32 pmol/L) estan en el mismo rango de la  $K_d$  y  $B_{max}$  encontradas en la glándula harderiana de Syrian hámster (Pangerl y cols. 1989a), y en glándula pineal de rata (Gonzalez-Brito y cols. 1988) y la glándula pineal de hámster (Pangerl y cols. 1989b, 1990); estos valores de  $K_d$  y  $B_{max}$  son similares a los valores encontrados en otros tejidos usando diferentes ligando

(Dax y cols. 1986; Neve y cols. 1986). Así, respecto a la especificidad, se ha demostrado la alta afinidad a los agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenergicos y sus bloqueantes comparados a otros agonistas adrenergicos en distintos tejidos con distintos ligandos.

En estos estudios, la unión del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas crudas de la glándula Harderiana demuestra una variación diurna con valores altos en la primera fase del periodo de oscuridad, y valores bajos en la segunda fase y durante el día. A pesar de que los estudios estequiometricos debenser llevados acabo durante el ciclo día-noche, los resultados sugieren que estos cambios de la unión del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas estan asociados a los cambios en la capacidad de unión más que a los cambios de la afinidad del receptor (Pangerl y cols, 1989a). Nuestros resultados estan en acuerdo con las investigaciones anteriores que demuestran que el ritmo circadiano existe en la capacidad de unión del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas de la glándula Harderiana de hámster (Pangerl y cols 1989a y en glándula pineal de hámster (Pangerl y cols 1989b) o la rata (Gonzalez-Brito y cols. 1988). El papel fisiologico del receptor  $\beta$ -adrenergico en glándula Harderiana de rata no esta establecido, no obstante, los estudios indican que los agonistas adrenergicos son capaces de activar el enzima tiroxina 5'deiodinasa tipo II. Este enzima se ha encontrado en glándula Harderiana de rata (Guerrero y cols. 1987) y hámster (Guerrero y cols, 1989) donde deja pensar que este enzima tiene un papel importante para mantener los niveles intracelulares de  $T_2$  y servir como defensa contra de deficiencia de las hormonas tiroideas. La actividad de este enzima esta regulada no sólo por el tiroide pero también con los agonistas de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenergicos (Osuna y cols. 1990, 1992; Rubio y cols. 1991).

## **V. CONCLUSIONES.**

La actividad N-acetiltransferasa esta regulada vía los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos durante el desarrollo:

- Una activación potente con el Isoproterenol "*In vitro*" a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en seis semanas de edad mientras que en ratas de dos semanas de edad la activación es menos potente.

- A través de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos existe también una estimulación de la actividad de NAT, con la Metoxmina, que es semejante en ratas de 2 y 6 semanas de edad.

- El Isoproterenol es un potente activador de la producción de AMPc en ratas de 6 semanas que en ratas de 2 semanas de edad. Sin embargo el efecto de la metoxamina en la producción de AMPc es similar en ratas de ambas edades, y mucho menos que el efecto del Isoproterenol.

- El dibutilil-AMPc es un potente activador de la NAT en glándula pineal de ratas de 2 y 6 semanas de edad.

- Los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos son maduros en ambas edades reconociendo específicamente sus agonistas y antagonistas.

- La cantidad de material ADP-ribosilado por toxina colérica en ratas de 6 semanas es mayor que en ratas de 2 semanas, sin embargo la cantidad de material ADP-ribosilado por toxina pertusica es semejante en ambas edades.

- La cantidad de otras proteínas,  $G_{i\alpha 0-3}$ ,  $G_{q\alpha 11}$ , o  $G_{\beta}$  comun son similares en ambas edades no obstante la subunidad  $G_{i\alpha 1-2}$  esta en cantidades altas en ratas de 2 semanas

que en ratas de 6 semanas.

En general la baja sensibilidad de la glándula pineal de ratas de 2 semanas a los agonistas del receptor  $\beta$ -adrenergicos, no esta causado, ni por el mecanismo post-receptor ni por la característica del receptor  $\beta$ -adrenergico de la membrana del pinealocito, no obstante esta baja sensibilidad esta relacionada con los niveles bajos de la proteína  $G_{sa}$  en la membrana de pinealocito de ratas de 2 semanas de edad.

- Los sitios de unión del [ $^{125}$ I]CYP estan caracterizados en membranas de la glándula Harderiana de rata parcialmente purificada.

- La unión especifica del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas de la Glándula Harderiana depende del tiempo y la temperatura, estan estables, saturables, y reversibles.

- La unión del trazador es saturable y el analisis de Scatchard es una linea recta sugiriendo la unión a una única clase de sitio de unión:  $K_d = 290$  pM con una capacidad de unión es de 32 pmol/L.

- Estudios de competición: La unión especifica del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas de la glándula Harderiana esta inhibida por concentraciones crecientes del Propranolol ( $IC = 28,1$  nM).

- La unión del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas de la glándula Harderiana es especifico para los agonistas o los antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenergicos, así sólo el Iso, PP, y Ne son capaces de inhibir o desplazar la unión del trazador a la membrana.

- La unión del [ $^{125}$ I]CYP a las membranas de la glándula Harderiana alcanza valores maximales al principio del periodo de oscuridad.

## ***VI. BIBLIOGRAFÍA.***

**Akagi N; Morimoto T; Watanabe M.**

The Harderian gland and the porphyrins. *Bulls Osaka Med Sch* 33:97-115, (1987).

**Arendt J.**

Mammalian pineal rhythms, Pineal research. Review, vol 3 R.J. Reiter (ed) A.R. Liss, Nueva York pag 161-213, (1985).

**Arvy L.**

Contribution a l'histoenzymologie de la glande de Harder du rat albino. *CR Soc Biol* 153: 915-917, (1959).

**Balemans MGM.**

Indole metabolism in the pineal gland, The Harderian gland and the retina of mammals. In *The pineal Organ: Photobiology-Biochronometry-Endocrinology* (ed. A. Oksche & P. Pévet), pp. 261-279. Amsterdam: Elsevier, (1981).

**Balemans MGM, Pévet P, Van Benthem J, Haldar-Misra C, Smith I, Hendriks H.**

Day/night rhythmicity in the methylating capacities for different 5-hydroxyindoles in the pineal, the retina and the Harderian gland in the golden hamster (*Mesicricetus auratus*) during the annual seasons. *Journal of Neural transmission* 56, 53-72. (1983).

**Barlow-Walden, L.R., Reiter, R.J., Abe, M., Pablos, M.I., Menendez-Pelaez, A., Chen, L.D. y Poeggeler, B.**

Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.*, (en prensa) (1995).

**Birnbaumer I; Abramowitz J; Brown AM.** *Biochem, Biophys, Acta.* 1031: 163-224, (1990).

**Blask, D.E.**

The pineal: an oncostatic gland? *EN THE PINEAL GLAND*, pp 253-284. R.J. Reiter (ed), *Raven Press, Nueva York* (1984).

**Bloom W, Fawcett D.W.**

Epífisis o Cuerpo Pineal. *En tratado de Histología (Ed) labor, Buenos aires, Capitulo 21, 537-544 (1973).*

**Boas N F; Bates R W.**

Role of the thyroid and anterior pituitary glands in the maintenance of the Harderian glands of the rat. *Endocrinology. 55:417-424, (1954).*

**Brammer M; Binkley S; Enrico J; y Duffy M.**

The rise and fall of N-acetyltransferase in vitro: the influence of age. *Dev. Biol. 256-258, (1981).*

**Brownschidle CM, Niewenhuis RJ.**

Ultrastructure of the Harderian gland in male Albino rats. *Anatomical Record 190: 735-754, (1978).*

**Bubenik GA, Brown GM, Grota LJ.**

Immunohistochemical localization of melatonin in the rat Harderian gland. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry 24, 1173-1177 (1976).*

**Bucana CD, Nadakavukaren MJ.**

Fine structural of the hamster Harderian gland. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie 129, 178-187 (1972a).*

**Buijs, R.M. y Pevet, P.**

Vasopressin and oxytocin-containing fibres in the pineal gland and subcommisural organ of the rat. *Cell Tissue Research, 205: 11-17. (1980).*

**Buzzell GR, Menendez-Pelaez A, Porkka-Heiskanen T. Pangerl B, Vaughan MK, Reiter RJ.** Bromocriptine prevents the castration-induced rise in porphyrin concentration in the Harderian glands of the male syrian hamster, *Mesocricetus auratus. Journal of experimental Zoology 249, 172-176, (1989).*

**Buzzell GR, Pangrel A, Pangrel B, Menendez-Pelaez A, Vaughan MK, Little JC et al.** Melatonin and porphyrin in the Harderian glands of the Syrian hamster: circadian



patterns and response to autumnal condition. *International Journal of Biochemistry* 22, 1465-1469, (1990c).

**Buzzell GR, Menendez-Pelaez A, Blank JL, Nonaka KO, Reiter JR.**

Effects of gender, age and castration on porphyrin concentration and melatonin synthesis in the Harderian glands of Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Canadian Journal of Zoology* 69: 151-155, (1991).

**Buzzell GR, Hoffman RA, Vaughan MK, Reiter RJ.**

Hypophysectomy prevents the castration-induced increase in porphyrin concentrations in the Harderian glands of the male golden hamster: a possible role for prolactin. *Journal of Endocrinology* 133: 29-35, (1992a).

**Buzzell GR, Menendez-Pelaez A.**

The inter-relationship between the Harderian glands and the neuroendocrine-thyroid axis in rodent. In *Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects* (ed. S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo & R.J. Reiter), pp. 255-270, (1992b).

**Cardinali, D.P., Vacas, M.I., Rosenstein, R.E. y col.**

Multifactorial control of pineal melatonin synthesis: an analysis through binding sites. *En Advances in Pineal Research. Reiter, R.J., Fraschini R. (Ed). Vol2. Londres, John Libbey, pp 51. (1987).*

**Carriere R.**

Ultrastructural visualization of intracellular porphyrin in the rat Harderian gland. *Anatomical Record* 213: 496-504, (1985).

**Champney T H; Hollorf A P; Steger R W; y Reiter R J.**

Concurrent determination of enzymatic activities and substrate concentrations in the melatonin synthetic pathway within the same rat pineal. *J. Neurosci. Res.* 11:59-66, (1984).

**Chan, A., y Ebadi, M.**

The kinetics of norepinephrine-induced stimulation of serotonin N-acetyltransferase in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology*, 31: 244-251. (1980).

**Cogburn LA, Wilson-Placentra S, Letcher LR.**

Influence of pinealectomy on plasma and extrapineal melatonin rhythms in young chickens (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* 68, 343-356, (1987).

**Collin, J.P. y Oksche, A.**

Structural and functional relationship in the non mammalian pineal gland. The pineal gland, R.J.Reiter (Ed). *CRC Press, Boca Raton, Vol I. Anatomy and Biochemistry*, 27-67 (1981).

**Cunnane, S. L., Horrobin, D. F., Manku, M.S. y Oka, M.**

The vascular response to zinc varies Seasonally effects of pinealectomy and melatonin. *Chronobiologia*. 7: 505-512, (1980).

**Dafny, N.**

Electrophysiological evidence of photic, acoustic, and central input to the pineal body and hypothalamus. *Experimental Neurology* 55: 449-457. (1977).

**Dafny, N.**

Two photic pathways contribute to pineal evoked responses. *Life Sciences*. 26: 737-742 (1980).

**Davis FA.**

The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. *Transactions of the American Ophthalmology Society* 27: 401-441, (1929).

**Deguchi J; y Axelrod J.**

Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in the rat pineal gland. *Anal. Biochem.* 50:174-179, (1972a)

**Delgado MJ, Guerrero JM, Santana C, Menendez-Relaez A, Gonzalez-Brito A, Chen ZL et al.** Thyroxine<sup>5'</sup>-deiodinase activity in brown adipose tissue, *Harderian*

gland, pineal gland and pituitary gland of the male syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Neuroendocrinology Letters* 10: 363-368, (1988).

**Derrien E, Turchini J.**

Sur l'accumulation d'une porphirine dans la glande de Harder des rongeurs du genre *Mus* et sur son mode d'excrétion. *Compte Rendu des Séances de la Société de Biologie et ses filiales* 91: 637-639, (1924).

**Diehl, B. J. M.**

Ocurrence and regional distribution of calcareous concretions in the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* 195: 359-366, (1978).

**Ebels, I. y Benson, B.**

A survey of the evidence that unidentified pineal substances affect the reproductive system in mammals. En "Progress in Reproductive Biology, P.O. Hubinont, ed. vol 4". The pineal and Reproduction, R.J. Reiter, S. Karger eds, Nueva York, pg 51, 1978.

**Ebels, I., De Moree, A., Hus-Citharel, A., y Moszkowska, A.**

Survey of some active sheep pineal fractions and a discussion on the possible significance of pteridines in those fractions in vitro and in vivo assays. *J. Neural. Transm.* 44:97. (1979).

**Ebling F J; Ebling E; Randall V; Skinner J.**

The effects of hypophysectomy and of bovine growth hormone on the responses to testosterone of prostate, preputial, Harderian and lacrimal glands and of brown adipose tissue in the rat. *J. Endocrinol.* 66: 401-406, (1975).

**Edinger, L.**

"Vorlesungen über den Bau der Nervösen centralorgane des Menschen und der thiere". Vogel, Leipzig, 1900.

**Fabre, L.F.J.R., Banks, R.C., McIsaac, W.M., y Farell, G.**

Effects of ubiquinone and related substances on secretion of aldosterone and cortisole.

*Am. J. Physiol.* 208: 1275. (1965).

**Finocchiaro, L.M.E., Scheucher, A., Finkielman, S., Nahmod, V.E y Pirola, C.J.**  
Muscarinic effects on the hydroxy-and methoxyindole pathway in the rat pineal gland.  
*Journal of Endocrinology* 123: 205-211. (1989).

**Finocchiaro, L.M.E. y Teliez-Iñon, M.T.**

Effect of cholinergic, muscarinic agents on protein kinase C activity in rat pineal gland.  
*Cell Biology. International Reports* 15: 943-954. (1991).

**Fiske, V.M.**

Effect of light on the weight of the pineal in the rat. *Endocrinol.* 66: 489, 1960.

**Fiske, V.M.**

Effect of light on sexual maturation, estrous cycles and anterior pituitary of the rat.  
*Endocrinol.* 29: 187, 1981.

**Garbarg, M., Julien, C., y Schwartz, J.C.**

Circadian rhythm of histamine in the pineal gland. *Life Sci.* 14: 539, (1974).

**Gauquelin G, Gharib C, Ghaemmaghani F, Allevard A, Cherbal F, Geelen G, Bouzeghrane F, Legros J-J.** A day-night rhythm of vasopressin and oxytocin in rat retina, pineal and Harderian gland. *Peptides* 9: 289-294, (1988).

**Gonzalez G. y Alvarez-Uría M.**

The process and terminal bulbs in the pineal gland of mammals. *Trab inst Cajal. Inv. Biol.* 63, 47-56 (1971).

**Govitrapong P. Hama Y. Pfeiffer R. y Ebadi M.**

Status of dopamine in bovine pineal glands and the stimulation of N-acetyltransferase activity by D<sub>2</sub>-dopaminergic receptor agonists in the rat pineal glands in culture.  
*Journal of pineal Research* 6: 17-31. (1989).

**Govitrapong P. Pariyanonth M. y Ebadi M.**

The presence and actions of opioid receptors in bovine pineal gland. *Journal of Pineal*

*Research* 13: 124-132. (1992).

**Grafflin AL.**

Histological observations upon the porphyrin-excreting Harderian gland of the albino rat. *American Journal of Anatomy* 71: 43-64, (1942).

**Greene EC.**

Anatomy of the rat. *Transactions of the American Philosophical Society* 27: 1-370, (1935).

**Green JP. Day M. y Robinson JD.**

Some acidic substances in neoplastic mast cells and in the pineal body. *Biochem Pharmacol*, 11:957-961 (1962).

**Greenberg LH. y Weiss B.**

Beta-adrenergic receptors in rat aged brain: reduced number and capacity of pineal gland to develop supersensitivity. *Science* 201:61 (1978).

**Gregorek JC. Seibel HR. Reiter RJ.**

The pineal complex and its relationship to other epithalamic structures. *Acta Anat. (Basel)*, 99, 425-434 (1977).

**Guerrero JM, Puig-Domingo M, Vaughan GM, Reiter RJ.**

Characterization of type-II thyroxine 5'-deiodinase activity in rat Harderian gland. *Life Sciences* 41: 1179-1185, (1987).

**Guerrero JM, Santana C, y Reiter RJ.**

Protein synthesis, but not RNA transcription, is required for the Isoproterenol induced activation of type II 5'-deiodinase activity in the rat pineal gland. *Neurosci. Res. Commun* 3: 77-84, (1988a).

**Guerrero JM, Santana C, y Reiter RJ.**

Effect of Isoproterenol and dibutyrylcyclic AMP on thyroxin type II 5'-deiodinase and N-acetyltransferase activities in rat pineal organ cultures; *Neurosci. Lett*, 89: 229-233, (1988b).

**Guerrero JM, Gonzalez-Brito A, Santana C, Reiter RJ.**

Nocturnal increase of type-II thyroxine 5'-deiodinase activity in the syrian hamster Harderian gland is abolished by light exposure and induced by isoproterenol. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine* 190: 186-189, (1989).

**Guerrero JM, Santana C, y Reiter RJ.**

Type II Thyroxine 5'-deiodinase activity in the rat brown adipose tissue, pineal gland, harderian gland and cerebral cortex: effect of acute cold exposure and lack of relationship to pineal melatonin synthesis. *J. Pineal Res* 9: 159-166, (1990),

**Guroff, G.**

Transport and metabolism of amino acids. En "Basic Neurochemistry". R.W. Albers, G.J. Siegel, R. Katzman y B.W. Agranoff (eds). *Little, Brown, Boston*. Pg. 194, (1972).

**Harder JJ.**

Glandula nova lachrymalis una cum ductu excretorio in cervis et damis. *Acta Eruditorum Lipsiae*, 49-52, (1694).

**Harriman A F, Thiessen D D.**

Harderian letdown in male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) contributes to proceptive behavior. *Horm Behav.* 19:213-219, (1985).

**Ho A K; Chik C L; y Klein D C.**

Protein kinase C is involved in adrenergic stimulation of pineal cGMP accumulation. *The journal of Biological Chemistry.* 262:10059-10064, (1987).

**Ho A K; Thomas T P; Chik C L; Anderson W B; y Klein D C.**

Protein kinase C: subcellular redistribution by increased  $Ca^{2+}$  influx. *The Journal of Biological Chemistry* 263:9292-9297, (1988).

**Hoffman RA.**

Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the Histology of the

Harderian glands of golden hamsters. *American Journal of Anatomy* 132: 463-478, (1971).

**Hoffman RA, Johnson LB, Reiter RJ.**

Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *Journal of Pineal Research* 2: 161-168, (1985).

**Hoffman RA, Wertz P, Habeeb P.**

Harderian glands of golden hamsters: morphological and biochemical responses to thyroid hormones. *Journal of comparative Physiology B* 159: 293-299, (1989).

**Hoffman RA, Habeeb P, Buzzell GR.** Further studies on regulation of the Harderian glands of golden hamsters by the thyroid gland. *Journal of Comparative Physiology B* 160: 269-275, (1990).

**Hugo J, Krijt J, Vokurka M, Janousek V.**

Secretory response to light in rat Harderian gland: Possible photoprotective role of Harderian porphyrin. *General Physiology and Biophysics* 6: 401-404, (1987).

**Huhtala A, Huikuri KT, Palkama A, Tervo T.**

Innervation of the rat Harderian gland by adrenergic and cholinergic nerve fibres. *Anatomical Record* 188: 263-272, (1977).

**Jackson AHD, Kenner GW, Smith KM, Suckling CJ.**

Pyrroles and related compounds. XXXVII. Harderoporphyrin. *Tetrahedron* 32: 2757-2762, (1976).

**Johnston R E.**

Effects of female odors on the sexual behavior of male hamster. *Behav Neural Biol.* 46:168-188, (1986).

**Juillard M T.**

The proteinaceous content and possible physiological significance of dense-cored vesicles in hamster and mouse pinealocytes. *Ann. Biochem. Biophys.* 19:413-428,

(1979).

**Kanwar KC.**

Morphological and cytochemical studies on the Harderian glands of rats. *Cellule* 61: 129-143, (1960).

**Kappers, J.A.**

Descartes (1596-1650) and the pineal gland. En Pevet, P. Tapp, E. Eds., "European pineal study Group Neuws Letters. 3". Amsterdam, Elsevier, 1980.

**Kappers, J.A.**

"The Pineal Gland. I. Anatomy and Biochemistry". R.J. Reiter, eds. Boca Raton, Florida. CRC, Capitulo 1, 1981.

**Karasek, M., M. Pawlikowski, J. Kappers, J. Arieus y H Stepien.**

Influence of castration followed by administration of LH-RH on the ultrastructure of rat pinealocytes. *Cell Tissues. Res* 167: 325-339, (1976).

**Karasek, M., A. Bartke, T.S King, J.T. Hansen y R.J. Reiter.**

Effects of Hereditary hypopituitarism ectopic pituitary transplants on pinealocytes of the mouse: a quantitative ultrastructure study. *Endocrinol.* 110: 2183-2185 (1982).

**Karasek M.**

Ultrastucture of the mammalian pineal gland: its comparative and foncional aspects. R.J. Reiter (Ed): "*Pineal Research reviews*" Vol 1 Alan R, Liss, Nueva York, pg 1-48, (1983a).

**Karasek, M., A. Bartke, J.T. Hansen.**

Influence of prolactin on pinealocytes of the mouse with hereditary hypopituitarism: a quantitative ultrastructure study: *Mol Cell Endocrinol.* 29 : 101-108 (1983b).

**Kasama K, Uezumi N, Itoh K.**

Characterization and identification of glycerol ether diesters in Harderian gland tumors of mice. *Biochim Biophys Acta* 202: 56-66, (1970).

**Kasama K, Blank ML, Snyder F.**



Identification of 1-alkyl-2-acyl-3-(2',3'-diacylglycerol) glycerols, a new type of lipid class, in Harderian gland tumors of mice. *J Biol Chem* 264(16): 9453-9461, (1989).

**Kelly, D.E.**

Pineal anatomy. En "The pineal", Wurtman, R.J. Axelrod, J. y Kelly, D.E. eds. Academic Press, New York, Capítulo 1. 1968.

**Kelly, D.E.**

Developmental aspect of amphibian pineal systems, en the pineal gland, un simposium de la fundación CIBA, Wolstenhome, G.E.W. y Knight, J. eds Churchill Livingstone, Edinburgo, pg.53, 1971.

**Kenny GCT.**

The "nervus conarii" of the monkey. (An experimental study). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 20: 563-570. (1961).

**Klein D C; Weller J L.**

Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*. 169:1093-1095, (1970).

**Klein D C; Buda M J; Kapoor C L; y Krishna G.**

Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turn off". *Science*. 199:309-311, (1978).

**Klein D C; Auerbach A D; y Weller J L.**

seesaw signal processing in pineal cells: homologous sensitization of adrenergic stimulation of cyclic GMP accompanies homologous desensitization of  $\beta$ -adrenergic stimulation of cyclic AMP. *Proceeding of the National Academic of science of the USA*. 78:4625-4629, (1981).

**Krstic R.**

Glande pineale de rat. Analyse morphométrique aux microscopes photonique et électronique. *Labyrinth, Publicación del primer simposium Yugoslavo* pg 121-124. (1977).

**Kurumado K, y Mori W.**

Amorphological study of the circadian cycle of the pineal gland of the rat. *Cell. Tiss. Res* 182: 565-568 (1977).

**Laemmli U K.**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*. 277:680-688, (1970)

**Laitinen JT, Torda T, y Saavedra JM.**

Pineal muscarinic phosphoinositide response-pertussis toxin resistant signalling with very low receptor number. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164: 645-652. (1989).

**Lerner A.B; Case J.D; Takahashi Y; Lee,T.H., Mori, W.**

Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*. 80:2587, (1958).

**Lerner,A.B, Case, J.D y Heinzchman, R.V.**

Structure of melatonin *J. Amer. Chem. Soc.* 81. 6084, 1959.

**Lerner A.B; Case J.D.**

Melatonin, *Fed.Pro. Fed. Am. Soc. Exp* 19:590, 1960.

**Lin W-L, Nadakavukaren MJ.**

The androgenic effect on the fine structure of the Harderian gland in the male hamster. *Cell and Tissue Research* 198: 119-127, (1979).

**Lin W-L, Nadakavukaren MJ.**

Harderian gland lipids of male and female golden hamsters. *Comparative Biochemistry and Physiology* 70B: 627-630, (1981).

**Lin W-L, Nadakavukaren MJ.**

Aminolevulinate synthase activity in the Harderian gland of male and female golden hamsters (*mesocricetus auratus*). *Comp Biochem. Physiol.* 71 B:539-540, (1982).

**López JM, Tolivia J, Alvarez-Uría M.**

Postnatal development of the Harderian gland in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a light and electron microscopic study. *Anatomical Record* 223: 597-616, (1992a)

**Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Rubio A, Goberna R, Guerrero JM.**

Characterization of melatonin-binding sites in the Harderian gland and median eminence of the rat. *Life Sciences* 48: 1165-1171, (1990).

**Lynch, H.J., Azaki, Y. y Wurtman, R.J.**

The measurement of melatonin in mammalian tissues and body fluids. *J. Neural Transm.* 13 (supl): 251-264. (1978).

**Maestroni y Georges J.M.**

The immunoneuroendocrine role of melatonin. *Journal of Pineal Research* 14: 1-10. (1993).

**Maestroni, G.J.M., Conti, A. Y Pierpaoli, W.**

Melatonin, stress, and the immune system. *Journal of Pineal Research* 7: 203-229. (1989).

**McCord, C.P. y Allen F.B.**

Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 23: 207-227. (1917).

**Meister, A.**

On the antioxidant effect of ascorbic acid and glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 44: 1905-1915. (1992).

**Menendez-Pelaez A, Howes KA, Gonzalez-Brito A, Reiter RJ.**

N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase activity and melatonin levels in the Harderian glands of the female Syrian hamster: changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachloro-phenylalanine administration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45: 1231-1238, (1987).

**Menendez-Pelaez A, Reiter RJ, Guerrero JM, Puig-Domingo M Howes KA.**

Sexual dimorphism in N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity and melatonin content in the Harderian glands of Syrian hamster: Changes following gonadectomy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 187: 287-291, (1988a).

**Menendez-Pelaez A, Reiter RJ, Guerrero JM, Santana C, Howes KA, Gonzalez-Brito A.**

N-acetyltransferase activity and melatonin concentrations in the Harderian glands of female Syrian hamsters: alterations following either pinealectomy or bilateral superior cervical ganglionectomy. *Biochemical Archives* 4: 231-238, (1988b).

**Menendez-Pelaez A, Reiter RJ, Gonzalez-Brito A Howes KA.**

N-acetyltransferase activity and indole contents of the male Syrian hamster Harderian gland: Changes during the light:dark cycle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 268: 20-25, (1989).

**Menendez-Pelaez A, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ, Reiter RJ.**

Ultrastructure of blood vessel in the Harderian gland of the hamster (*Mesocricetus auratus*): existence of sinusoids. *Journal of Morphology* 204: 257-263, (1990).

**Menendez-Pelaez A, Rodriguez C Dominguez P.**

5-aminolevulinate synthase mRNA levels in the Harderian gland of Syrian hamster: correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 80: 177-182, (1991).

**Mhatre MC, Van Jaarsvel AS, Reiter RJ.**

Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 153: 1186-1192, (1988).

**Milcu, S.M., Pavel, S. y Neacsu, C.**

Biological and chromatographic characterization of a polypeptid with pressor and oxytocic activities isolated from bovine pineal gland. *Endocrinology*, 72: 563-566.(1963).

**Moller, M.**

Presence of a pineal nerve (nervus pinealis) in the human fetus: a light and electron microscopical study of the innervation of the pineal gland. *Brain Research* 154: 1-12. (1978).

**Moore, R.Y.,**

The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog. Reprod. Biol.*, 4: 1-29, (1978).

**Moss J; y Vaughan M.**

Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol 61:303-379, (1988).

**Mullen, P.E., Linsell, C.R., Leone, R.M., Silman, R.E., Smith, I., Hooper, R.J.,**

**Finnie, M. Y Parrat, J.**

Melatonin and 5-methoxytryptophol, the 24 hour pattern of secretion in man. *Adv. Biosci* 29: 337-342. (1981).

**Müller HB.**

Die postnatale entwicklung der Harderschen Drüse der weien Ratte. Lichtmikroskopische Befunde. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 100:421-438, (1969a).

**Müller HB.**

Die postnatale Entwicklung der Harderschen Drüse der weien Ratte. II. Fermenthistochemische Befunde. *Histochemie* 20:181-196, (1969b).

**Müller HB.**

Untersuchungen zur postnatale Entwicklung der Harderschen Drüse der weien Ratte. *Anat Ges* 64: 503-509, (1970).

**Murawski U, Jost U.**

Unsaturated wax esters in the Harderian gland of the rat. *Chem Phys Lipids* 13: 155-158, (1974).

**Neuwelet, E.A., y Lewy, A.J.**

Disappearance of plasma melatonin after removal of a neoplastic pineal gland. *New.Eng. J. Med.* 308:1132-1135. (1983).

**Oksche, A.**

Sensory and glandular elements of the pineal organ, en "The pineal gland", un simposium de la Fundación CIBA, Wolstenholme, G.E.W. y Knight, J. eds. Churchill Livingstone, Edinburgo, pg 127, 1971a.

**Oksche, A.M. Veck y C. Rudeberg.**

Comparative ultrastructural studies of sensory and secretory elements in pineal organs, Mem. Soc. Endocrinol. Cambridge University Press, Londres, 19: 7, 1971b.

**Ostrowski, K., A. Dziedzic-Goclawska, J. Michalik, W. Stachowicz y S. Mazur.**  
Crystallinity of human pineal calcospherulites. *Calcif. Tissue Int.* 30: 179-182, (1980).

**Otsuru O; Otsuka H; Kasama T; Seyama Y; Sakai T; Yohro T.**

The characterization of 2,3-alkanediol diacyl esters obtained from the Harderian glands of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Biochem.* 94:2049-2054, (1983).

**Packer, L.**

Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci. Amer. (Sci. Med.)* Mar/ Apr, pp. 54-63. (1994).

**Pang SF, Brown GM, Grota JL, Chambers JW, Rodman RL.**

Determination of N-acetyl-serotonin and melatonin activities in the pineal gland, retina, Harderian gland, brain and serum of rats and chickens. *Neuroendocrinolgy* 23: 1-13, (1977).

**Panke ES, Reiter RJ, Rollag MG.**

Effect of removal of the Harderian glands on pineal melatonin concentrations in the Syrian hamster. *Experientia* 35: 409-412, (1979).

**Paule WJ.**

The Comparative Histochemistry of the Harderian Gland. Dissertation, Ohio State University, Columbus, Ohio, (1957).

**Payne AP.**

Pheromonal effects of Harderian gland Homogenates on aggressive behaviour in the

hamster. *Journal of Endocrinology* 73: 191-192, (1977).

**Payne AP, McGadey J, Moore MR, Thompson GG.**

Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. *Journal of Endocrinology* 75: 73-82, (1977a).

**Payne AP.**

The attractiveness of Harderian gland smears to sexually naive and experienced male golden hamsters. *Animal Behaviour* 27: 897-904, (1979).

**Payne AP, McGadey J, Johnston HS, Moore MR, Thompson GG.**

Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrin. *Journal of Anatomy* 135, 3, 451-461, (1982).

**Payne AP.**

The Harderian gland; its biology role in porphyrin synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 11: 145-152, (1990).

**Pazo, I.H.,**

Electrophysiological study of evoked electrical activity in the pineal gland. *J. Neuronal Transm.*, 52: 137-148 (1981).

**Pearse, A.E.**

The citochemistry and ultrastructure of poly peptide hormone producing cells of the APUD series and the embryology, physiology, and pathologic implications of the concept, *J. Histochem. Cytochem.* 17: 303. 1969.

**Pévet, P.**

On the presence of different populations of pinealocytes in the mammalian pineal gland. *J. Neural Transm.* 40:289-304 (1977).

**Pévet P, Balemans MGM, Legerstee WC, Vivien-Roels B.**

Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and

---

Harderian gland of the golden hamster. *Journal of Neural transmission* 49: 229-245, (1980).

**Pévet, P.,**

Ultrastructure of the mammalian pinealocytes. En R.J.Reiter (Ed): "The pineal gland, Vol I, Anatomy and biochemistry" CRC Press, Boca Raton, pg. 121-154, (1981. a).

**Pévet, P., Balemans, M.G.M., y De Reuver, G.F.**

Activity of Hydroxyindole-O-methyle transferase (HIOMT) and the formation of 5-methoxytryptophan, 5-methoxytryptamine, 5-methoxyindole-3-acetoacid, 5-methoxytryptophol and melatonin in the eyes and the pineal gland, *J.Neural,Trans.*, 51: 271. (1981. b).

**Pévet P, Heth G, Hiam A, Nevo E.**

Photoperiod perception in the blind male rat (*Sphalax ehrenbergi*, Nehring): involvement of the Harderian glands, atrophied eyes, and melatonin. *Journal of Experimental Zoology* 232: 41-50, (1984).

**Phansuwan-Pujito, P., Govitrapong, P. Y Ebadi, M.,**

Inhibitory actions of muscarinic cholinergic receptor agonist on serotonin N-acetyltransferase in bovine pineal explants in culture. *Neurochemical Research* 16: 885. (1991).

**Piechowiak, H. y Schnizer, W.**

On electrolyte determination in the pituitary and pineal gland: is there a diurnal rhythm. *Endocrinologie* 67: 51, (1976).

**Pieri, C., Marra M., Moroni, F., Recchioni, R. Y Marcheselli, F.**

Melatonin: A Peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sciences* 15: PL271-PL276. (1994).

**Pozo, D., Reiter, R.J., Calvo, J.R. y Guerrero, J.M. Physiological**

concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sciences* 55: PL455-PL460. (1994).



**Prechel, M.M., Audhya, T.K., y Schlesinger, D.H.**

A seasonal variation in arginin vasocin immunoreactivity in rat pineal glands. *Endocrinology*. 112: 1474-1478. (1983).

**Puig-Domingo M, Guerrero JM, Reiter RJ,**

Tannenbaum MJ, Hulburt EC, Gonzalez-Brito A, y Santana C. Thyroxine 4'-Deiodination in brown adipose tissue and pineal gland: Implications for thermogenic regulation and role of melatonin. *Endocrinology* 123: 677-680, (1988).

**Quay, W.B.**

Circadian rhythms in rat pineal serotonin and its modification by estrous cycle and photoperiod. *Gen. Comp. Endocrinol*, 3:473 (1963).

**Quay, W. B.**

Pineal chemistry in cellular and physiological mechanisms, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, (1974).

**Quay, W. B.**

General biochemistry of the pineal gland of mammals. En: "The pineal gland, Vol I, Anatomy and biochemistry" R.J. Reiter (ed), Boca . Raton, pg. 174-198, (1981).

**Ramón y Cajal, S.**

"textura del sistema Nervioso del Hombre y de los vertebrados, TII, 2da. parte" Moy, Madrid, 1904.

**Rapin M.**

Aperçus sur la glande de Harder du rat. Son development sa secretion et son histologie. *Soc Zool Fr* 77: 239, (1962).

**Reiter, R.J., Hester, R.J.**

Neuroendocrinological relationship. En "Metabolic Regulation of physiologic Activity", B.Sacktor, R.J. Reiter, J.E. Wilson, H.J. Smith, C.G.Tiekert y R.J. Hester eds. Research Laboratory U.S. Army, Edgwood. Arsenal, Maryland, pg 13, 1965.

**Reiter RJ, Klein DC.**

Observations on the pineal gland, the Harderian gland, the retina and the reproductive organs of the adult female rat exposed to continuous light. *J. Endocr* 51:117-125, (1971).

**Reiter R J; Rollag M D; Panke E S; y Banks A F.**

Melatonin: reproductive effects. *J. Neural. Transm.* 13(supl): 209, (1978).

**Reiter, R.J.**

The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrinology Review* 1: 109-131. (1980).

**Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G y Acuña-castroviejo, D.**

A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research* 18: 1-11. (1995).

**Relkin, R.**

Miscellaneous effects of the pineal. En *The Pineal Gland*. Reiter, R (ed). Nueva York, Elsever. Pp 247-272. (1983).

**Rodriguez C, Menendez-Pelaez A, Reiter RJ, Buzzell GR, Vaughan MK.**

Porphyrin metabolism in the Harderian gland of Syrian hamster: "in vivo" Regulation by testicular hormones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 200: 25-29, (1992).

**Rohonyi B, Kelényi G.**

Porphyrin content of the Harderian gland of the rat. *Acta Biol Hung* 13: 241-245, (1962).

**Rollag, M.D., Morgan, R.J., y Niswender, G.D.**

Route of melatonin in sheep. *Endocrinology* 102: 18. (1978).

**Romijn, H.J.**

Structure and innervation of the pineal gland of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L)III. An electron microscopic investigation of the innervation. *Cell Tiss. Res.*, 157:

25-51 (1975).

**Romijn, H.J., M.T. Mud. Y P.S. Wolters.**

A pharmacological and autoradiographic study on the ultrastructural localization of indolamine synthesis in the rabbit pineal gland. *Cell. Tissue. Res.* 185: 199-214, (1977).

**Rosebluth, J.**

Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. *J. Cell. Biol.* 13: 405-421, (1962).

**Rubio A, Osuna C, Lopez-Gonzalez MA, Reiter RJ, Guerrero JM.**

Nyctohemeral rhythmicity of type II thyroxine 5'-deiodinase activity in the pineal gland but not in Harderian gland of the swiss mouse. *Bioscience Reports* 11: 111-117, (1991).

**Sakai T, Yohro T.**

A histological study of the Harderian gland of Mongolian gerbils, *Meriones meridianus*. *Anatomical Record* 100: 259-270, (1981).

**Shirama K, Furuya T, Takeo Y, Shimizu K, Maekawa K.**

Neural control of the Harderian gland in the rat. *Zool Mag (Tokyo)* 88: 149-154, (1979).

**Schapiro. Y Salas, M.**

Effect of age, light and sympathetic innervation on electrical activity of the rat pineal gland. *Brain Research* 28: 47-55. (1971).

**Schneider, T., Semm, P. Y Vollrath, L.,**

Ultrastructural observation on the central innervation of the guinea-pig pineal gland. *Cell Tiss. Res.*, 220: 19-41 (1981).

**Sewerynek, E., Abe, M., Reiter, R.J., Barlow-walden, L.R., Chen, L.D., McCabet, T.J., Roman, L.J. y Diaz-Lopez, B.**

Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in

phenobarbital-treated animals. *Journal of Cellular Biochemistry* (en press) (1995).

**Sheridan, M.N. y R.J. Reiter.**

The fine structure of the hamster pineal gland. *Am. J Anat.* 122 : 357-376 (1968).

**Shirama K, Hokano M.**

Electron-microscopic studies on the maturation of secretory cells in the mouse Harderian gland. *Acta Anatomica* 140: 304-312, (1991).

**Silva JE, Leonard JL.**

Regulation of rat cerebrocortical and adenohipofyseal type II 5'-deiodinase by thyroxine triiodothyronine and reverse triiodothyronine. *Endocrinology* 116: 1627-1635, (1985).

**Simonneaux, V., Ebadi, M., y Bylund, D.B.**

Identification and characterization of alpha 2D-adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol. Pharmacol.* 40(2): 235-241. (1991).

**Spencer, H.B.**

The parietal eye of Hatteria. *Nature*, May, 13, 1986a.

**Spencer, H.B.**

Preliminary communication on the structure and presence in Sphenodon and other lizards of the median eye, described by Von Graaf in *Anguis Fragilis*. *proc.R.Soc London*, June 10th. *Proc.R.Soc, Londres*. 1986b.

**Spike RC, Johnston HS, McGadey J, Moore MR, Thompson GG, Payne AP.**

Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphirin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster. I. The effects of ovariectomy and androgen administration. *Journal of Anatomy* 142: 59-72, (1985).

**Spike RC, McGadey J, Johnston HS, Payne AP, Thompson GG, Moore MR.**

The prevention of porphyrin loss from tissues during routine histological processing: quantitation studies on the Harderian gland. *Histochemical Journal* 18: 245-250, (1986b).

**Spike RC, Payne AP, Thompson GG, Moore MR.**

Highperformance liquid chromatographic analyses of porphyrins in hamster Harderian glands. *Biochemica et Biophysica Acta* 1034: 1-3, (1990).

**Spike RC, Payne AP, Moore MR.**

Porphyrins and their possible significance in Harderian glands. In *Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine effects* (ed. S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo & R.J. Reiter), pp. 165-193. Berlin: Springer, (1992).

**Stehle, J.H., Foulkes, N.S., Molina, C.A, Simonneaux, V., Pevet, P. Y Sassone-Corsi, P.** Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, 365: 314. (1993).

**Strum JM, Shear CR.**

Harderian gland in mice: Fluorescence, peroxidase activity and fine structure. *Tissue Cell* 14: 135-148, (1982).

**Sugden D; Vaneck J; Klein D C; Thomas T P; y Anderson W B.**

Activation of protein kinase C potentiates Isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature*. 314:359-361, (1985).

**Sugden A L; Sugden D; y Klein D C.**

$\alpha_1$ -adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *The Journal of Biological Chemistry*. 262:741-745, (1987).

**Sugden, D., HO, A.K., Sugden, A.L. y Klein, D.C.**

Negative feedback mechanism: evidence that desensitization of pineal  $\alpha_1$ -adrenergic responses involves protein Kinase-C. *Endocrinology*, 123 (3): 1425.(1988).

**Sun CY, Nadakavukaren MJ.**

Effect of testosterone on the female hamster Harderian gland pigmentation and ultrastructure. *Cell and Tissue Research* 207: 511-517, (1980).

**Tashiro S, Smith CC, Badger E, Kezur E.**

Chromodacryorrhea, a new criterion for biological assay of acetylcholine. *Proceedings*

of the Society for Experimental Biology and Medicine 44: 658-661, (1940).

**Tan, D.X., Reiter, R.J., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C., y Barlow-Walden, L.R.** Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis* 15: 215-218. (1994).

**Tapp. E.,.**

The histology and pathology of the human pineal gland. *Progress of Brain Research*, 52: 481-500, (1979).

**Tervo TA, Huhtala A, Palkama A.**

Innervation of the rat Harderian gland. *Exp Eye Res* 22: 299-300, (1968)(abstr).

**Thiessen DD, Graham M, Perkins J, Marcks S.**

Temperature regulation and social grooming in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Behavioral Biology* 19: 279-288, (1977).

**Thiessen DD, Kittrell EMW.**

The Harderian gland and thermoregulation in the gerbil, (*Meriones unguiculatus*). *Physiology and behavior* 24: 417-424, (1980).

**Thiessen DD, Harriman AE.**

Harderian gland exudates in the male *Meriones unguiculatus* regulate female proceptive behavior, aggression and investigation. *Journal of Comparative Psychology* 100: 85-87, (1986).

**Thiessen DD.**

The function of the Harderian gland in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. In *Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects* (ed. S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo & R.J. Reiter). Pp, 127-140. Berlin: Springer, (1992).

**Thompson GG, Hordovatz X, Moore MR, McGdey J, Payne AP.**

Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. *International Journal of Biochemistry* 16: 849-852, (1984).

**Towbin EJ, Fanta PE, Hodge HC.**

The porphyrin of harder's gland. *Proc Soc Exp Biol Med* 60:228-231, (1945).

**Tsukara S, Jacobowitz DM.**

Peptidergic innervation of the rat Harderian gland. *Histochemistry* 87: 233-236, (1987).

**Ulrich R, Yuwler A, Geller E, Wetterberg L.**

Effects of sex hormones and environmental lighting on rat Harderian gland porphyrin. *Journal of Endocrinology* 63: 99-102, (1974).

**Vakkuri O, Rintamäki H, Leppäluoto J.**

Plasma and tissue concentration of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *Journal of Endocrinology* 105:263-268, (1985).

**Vaneck J; Sugden D; Weller J; y Klein D C.**

Atypical synergistic alpha- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*. 116: 2167-2173, (1985).

**Vaughan M K; Herbert D C; Brainard G C; Johnson L Y; Zeagler J W; y Reiter R J.**

A comparison of blinding and afternoon melatonin injections on the histology of the reproductive organs, pineal ultrastructure and gonadotropin hormone levels in female syrian hamster. (En N. Biran y W. Schlooheds): Melatonin, current status and perspectives. Pergamon Press, Oxford, pp. 65-75, (1980a).

**Vaughan, M.K.**

The pineal gland. A survey of its antigonadotropic substances and their actions. En: "Endocrine physiology III". University Park press, Baltimore pg. 41-95. (1981).

**Vaughan M K; Chenoweth P C; Sabry I; Chambers J P; y Reiter R J.**

Lysosomal enzymes in the Harderian gland are altered by either bromocriptine treatment or hypophysectomy and hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med.* 187:469-473, (1988).

**Vaughan MK, Vaughan GM, Chenoweth PC, Menendez-Pelaez A, Kumar P, Chambers JP et al.**

Harderian gland porphyrin, lysosomal, ATPase and type II 5'-deiodinase rhythms in Sprague-Dawley and Fischer-344 rats kept under long or short photoperiod conditions. *International journal of Biochemistry* 23: 919-924, (1991).

**Vijayalax, M.I., Reiter, R.J., y Meltz, M.L.**

Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation chromosome damage. *Mutat. Res.*, (en prensa). (1995).

**Vilchis F, Hernandez A, Perez-Palacios G.**

Hormone regulation of the rodent Harderian gland binding properties of the androgen receptor in male golden hamster. *Journal of endocrinology* 112: 3-8, (1987).

**Vivien-Roels B, Pévet P, Dubois P, Arendt J, Brown GM.**

Immunohistochemical evidence for the presence of melatonin in the pineal gland, the retina and the Harderian gland. *Cell and Tissue Research* 217: 105-115, (1981).

**Voisin, P., Namboodiri, M.A.A., y Klein, D.C.**

Arylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J. Biol. Chem.* 259: 10913-10918. (1984).

**Vollrath, L.**

The pineal organ. *Springer Verlag, Berlin* (1981).

**Waniewski, R.A y Suria, A.**

GABA in the rat pineal gland. *Fed-Pro. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 37: 908, (1978).

**Watanabe M.**

An autoradiographic biochemical and morphological study of the Harderian gland of mouse. *Journal of Morphology* 163: 349-365, (1980).





**Wettebeg L, Geller E, Yuwiler A.**

Harderian gland: an extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats? *Science* 167: 884-885, (1970a).

**Wettebeg L, Yuwiler A, Ulrich R, y Geller E.**

Harderian gland: Influence on pineal Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in neonatal rats. *Science* 170:194-196, (1970b).

**Winterhager E, Kühnel W.**

Membrane specializations of the cells of the Harderian gland of rabbit with particular reference to the mechanism of exocytosis. *Cell and Tissue Research* 231: 623-636 (1993).

**Welsh, M. G., I.L. Cameron y R.J. Reiter.**

The pineal gland of the Gerbil *Meriones unguiculatus*. II. Morphometric analysis over a 24-hour period. *Cell Tissue Res.* 204: 95-109, (1979).

**Wissbach, H., Lovenber, W., Redfield, B.G. y Udenfriend, S.**

In vivo metabolism of serotonin and tryptamine effect of mono amine oxidase inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 131: 26-30. (1961).

**Wolfe D E.**

The epiphysal cell: an electron-microscopic study of its intracellular relationship and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat. *Prog. Brain Res.* 10:332-386, (1965).

**Wooding F B P.**

Lipid droplet secretion by the rabbit Harderian gland. *J Ultrast Res.* 71:68-78, (1980).

**Woolley GW, Worley J.**

Sexual dimorphism in the Harderian gland of the hamster (*Cricetus auratus*) *Anatomical Record* 118: 416-417, (1954).

**Wurtman, R.J., Roth, W., Altschule, M.D.**

Interactions of the pineal and the exposure to continuous light on organ weights: of female rats. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, 36: 617, 1961.

**Yokoyama Y, Kano K, Kaji K, Seyama Y.**

Purification and Characterization of a growth factor from guinea-pig Harderian gland. *Journal of biological Chemistry* 264: 17058-17063, (1989).

**Yokoyama Y, Kano K, Kaji K, Shirama K, Matsuda Y, Namiki H et al.**

Effect of Harderian gland-derived growth factor on the growth of cornea stromal cells. *Cornea* 11: 380-385, (1992).

**Zacker J, Egge H, Murawski U.**

1-Alkyl-2,3-diacylglycerine in der Harderschen Drüse der Ratte. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 357:288-289, (1976).

**Zweig M, Snyder SH, y Axelrod J.**

Evidence for a nonretinal pathway of light to pineal gland in newborn rats. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)* 56: 515- 520, (1966).

**Arendt J.**

Mammalian pineal rhythms, Pineal research. Review, vol 3 R.J. Reiter (ed) A.R. Liss, Nueva York pag 161-213, (1985).

**Murakami M; Greer SE; McADAMS S; Greer MA.**

Comparison of Isoproterenol and dibutyryl adenosine cyclic 3',5'-monophosphate stimulation of tyroxine 5'-deiodinase activity in cultured pineal glands from euthyroid and hypothyroid rats. *Life. Sci.* 44: 425-429 (1989).

**Brownstein MJ; Axelrod J.**

Pineal gland: A 24 rhythm in norepinephrin turnover, *Science.* 184: 173-175, (1974).

**Santana C; Guerrero JM; Reiter RJ; Puig-Domingo M; Gonzalez-Brito A.**

Stimulatory effect of isoproterenol but not dibutyryl cAMP on N-acetyltransferase

activity and melatonin content of syrian hamster pineal gland in organ culture. *Neuroendocrinology* 48: 229-234, (1988a).

**Santana C; Guerrero JM; Reiter RJ; Gonzalez-Brito A; Menendez-Pelaez A.**  
Forskolin, an activator of adinylate cyclase activity, promotes large increases in N-acetyltransferase activity and melatonin production in the syrian hamster pineal gland only during the late dark period. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 155, 1: 209-215, (1988b).

**Santana C; Guerrero JM; Reiter RJ; Troiani ME.**

The in vitro activation of cyclic AMP production by either forskolin or isoproterenol in the Syrian hamster pineal during the day is not accompanied by an increase in melatonin production. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 157, 3: 930-936, (1988c).

**Santana C; Guerrero JM; Reiter RJ.**

Effects of either forskolin, the 1,9-dideoxy derivative of forskolin, or 8-Bromocyclic AMP and melatonin production in the Syrian hamster pineal gland in organ culture. *Neurosci. Lett.* 103: 338-342, (1989).

**Santana C; Menendez-Pelaez A; Reiter RJ; Guerrero JM.**

Treatment with forskolin for 8 hours during the day increases melatonin synthesis in the Syrian hamster pineal gland in organ culture: the long lag period is required for RNA synthesis. *J. Neurosci. Res.* 25:545-548, (1990).

**Babila T; Schaad NC; Klein DC.**

Rat pineal G $\alpha$ , Gi $\alpha$  and Go $\alpha$ : relative abundance and development. *Brain Research* 572, 232-235, (1992).

**Helper JR; Kozasa T; Smrcka AV; Simons MI; Rhee SG; Stenweiss PC; Gilman AG.**

Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$ . *JBC* 268, 14367-14375, (1993).

**Klein DC; Sudgen D; Weller JL.**

Postsynaptic  $\alpha$ -adrenergic receptor potentiated the  $\beta$ -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 80, 599-603, (1983).

**Lee CH; Park D; Wu P; Rhee SG; Simon MI.**

Members of the Gq $\alpha$  subunit gene family activate phospholipase C $\beta$  isozymes. *JBC* 267, 16044-16047, (1992).

**Rowe V; Parr J.**

Developmental changes in the stimulation of serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin synthesis in the rat pineal in monolayer culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 218, 97-102, (1981).

**Rubio A; Osuna C; Guerrero JM.**

$\beta$ -and  $\alpha$ -adrenergic mechanisms are involved in regulation of rat pineal type II thyroxine 5'-deiodinase activity during development. *Endocrinology*, 128, 1661-1667, (1991a).

**Rubio A; Osuna C; Jimenez J; Molinero P; Guerrero JM.**

*In vivo* activation of pineal N-acetyltransferase but not type II thyroxine 5'-deiodinase by phenylephrine in young rats. *Neuroscience Letters* 127, 13-15, (1991b).

**Rubio A; Guerrero JM; Reiter RJ; Osuna C.**

Involvement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase activity during development. *Endocrinology*. 132, 393-398, (1993).

**Mochizuki N; Urasawa K; Sanchez A; Insel PA.**

Developmental regulation of the  $\alpha$ -subunit of Gq/G11 as determined by quantitative immunoblot analysis. *Biochemical and biophysical Research Communications*. 210, 246-252, (1995).

**Dax EM; Partilla JS; Jackson KL; Gregerman RI.**

J. Receptors Research. 6: 165-182, (1986).

**Gonzalez-Brito A; Jones DJ; Ademe RM; and Reiter RJ.**

Brains research 238: 108-114, (1988).

**Guerrero JM; Puig-Domingo M; Vaughan GM and Reiter JR.**

Life Sci. 41: 1179-1185.

**Guerrero JM; Gonzalez-Brito A; Santana C; and Reiter JR.**

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 190: 186-189, (1989).

**Neve KA; McConigle P; and Molinoff PB.**

J. Pharmacol. Exp. Ther. 238: 46-53, (1986).

**Osuna C; Rubio A; Goberna R; Guerrero JM.**

Life Sci. 46: 1945-1951, (1990).

**Osuna C; Jimenez J; Reiter JR; Rubio A; Guerrero JM.**

Amer. J. Physiol. 263: E884-E889, (1992).

**Rubio A; Guerrero JM; Gonzalez MA; Lopez-Gonzalez MA; Osuna C.**

Life Sci. 49: 1523-1530, (1991).

**Pangerl A; Pangerl B; Buzzell G; Jones DJ; Reiter JR.**

J. Neurosci. Res. 22: 456-460, (1989a).

**Pangerl B; Pangerl A; Reiter JR; Jones DJ.**

Neuroendocrinology. 49: 570-573, (1989b).

**Pangerl B; Pangerl A; Reiter JR.**

J. Neural Transm [Gen. Sect.] 81: 17-29, (1990).

**Scatchard G.**

Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, (1949).

## Different sensitivity of rat pineal *N*-acetyltransferase to $\alpha$ - and $\beta$ -adrenergic receptor agonists during development: in vitro studies

Ahmed Harmouch, Juan M. Guerrero, Carmen Osuna\*

Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville School of Medicine and Virgen Macarena Hospital, Avenida Sanchez Pizjuan 41, 41009 Seville, Spain

Received 12 May 1994; Revised version received 15 September 1994; Accepted 30 September 1994

### Abstract

Herein, we investigate the mechanisms involved in the adrenergically mediated stimulation of rat pineal *N*-acetyltransferase (NAT) activity during development using an in vitro model. Compared with adults, results suggest a different regulation of pineal NAT activity in growing rats where a similar efficiency of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor agonists is observed during the 1st weeks of age for activating the enzyme. In adult rats,  $\beta$ - but not  $\alpha$ -adrenergic receptors appear to play the preeminent role. The results indicate that the adrenergic receptor agonists used acted in a non-specific manner by binding to relatively immature receptors early during development.

**Key words:** Pineal; *N*-acetyltransferase; Development; Adrenergic agonist

The pineal gland, and its major hormone melatonin, is capable of translating environmental lighting information into signals that modulate reproductive, adrenal and other neuroendocrine interactions as well as immune function [8]. *N*-acetyltransferase (NAT) is the enzyme that acetylates serotonin to *N*-acetylserotonin in the pineal gland, controlling the circadian rhythm of melatonin production [9]. During the night, norepinephrine (NE) released from pineal sympathetic nerve endings interacts with  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors on the pinealocyte membrane [2]. In adult rats, NE acts primarily on  $\beta$ -adrenergic receptors by increasing the intracellular concentration of cAMP which leads to the subsequent activation of NAT activity and melatonin synthesis [4]. Also in adult rats,  $\alpha$ -adrenergic receptors exert a synergistic effect on the stimulation of NAT activity [6] and cAMP production [14] by  $\beta$ -adrenergic receptors.

Several authors have studied pineal melatonin synthesis during ontogenic development [7]. The circadian rhythms in serotonin content and NAT activity appear

as early as 2 days after birth but a daily rhythm of enzyme activity starts on postnatal day 4. On the other hand, sympathetic innervation and  $\beta$ -adrenergic receptors are present from the end of the 2nd week of extrauterine life [7]. Previous in vivo studies have shown that maximal doses of isoproterenol can completely activate pineal NAT in adult rats but there are no data available concerning the in vivo regulation of NAT activity during development. Only in vitro studies have shown that neonatal rat pinealocytes are sensitive to both isoproterenol and to phenylephrine, an  $\alpha$ -adrenergic agonist, as suggested by the stimulation of cAMP and NAT activity [2].

We had investigated previously in vivo the nature of the mechanisms involved in the adrenergically mediated stimulation of pineal NAT activity during development [11–13]. The aim of the present work was to study the response to  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor agonists of rat pineal NAT, using an in vitro model to control the real concentration of drugs in the incubation medium.

Wistar rats of both sexes, weighing 100–120 g, were allowed to acclimate to the animal facilities. Animals received food and water ad libitum and were exposed to

\*Corresponding author. Fax: (34) (5) 490-7048.

an automatically regulated light:dark (LD) cycle of 14:10; the lights were turned off daily from 20:00 to 06:00. Animals were killed at the indicated ages and pineals collected for organ culture studies.

Pineal glands were cultured using a method described by Brammer et al. [1] with some modifications. Two pineals were placed on a filter (HAWP 02500, Millipore, Bedford, MA) which rested at top 1 ml well of pH 7.4 culture medium (Falcon organ culture dish 3037, Falcon Plastic, Los Angeles, CA). The dishes were incubated at 37°C under 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The culture medium (BGJb Fitton-Jackson modification, GIBCO, Grand Island, NY) was supplemented with ascorbic acid (0.1 mg/ml) and penicillin (100 U/ml). After a preincubation of 30 min, pineals were transferred to other dishes and cultured for 6 h in the presence of increasing concentration of methoxamine and isoproterenol up to 1 μM. Pineal glands were individually disrupted by ultrasound in 100 μl cold 0.05 M phosphate buffer, pH 6.8. Then, they were immediately used for determination of NAT activity, using the procedure outline by Deguchi and Axelrod [5] with the modifications of Champney et al. [3] and expressed as pmol *N*-acetyltryptamine produced/gland/h.

We compared the effect of β- and α-adrenergic receptor agonists on pineal NAT activity in 2-week-old and 6-week-old rats. Rats were killed and pineals were collected and incubated with either isoproterenol, a β-adrenergic agonist, or methoxamine, an α-adrenergic receptor agonist. As shown in Fig. 1 (top), methoxamine was able to stimulate NAT activity in young rats as well as isoproterenol. In adults rats (Fig. 1, bottom), methoxamine slightly stimulated NAT activity but isoproterenol markedly increased the activity of the pineal acetylating enzyme. Thus, in adult rats, isoproterenol was 5 × more potent than methoxamine in stimulating NAT activity. This result suggests a different regulation of pineal NAT activity in growing rats, showing a similar efficiency for α- and β-adrenergic receptor agonists during the 1st weeks of age. However, in adult rats, α-adrenergic receptors do not appear to play a preeminent role. Klein et al. [6] showed that isoproterenol, in adult rats, was more effective than phenylephrine in stimulating NAT activity but phenylephrine had a potentiating effect on isoproterenol response. On the other hand, Rowe and Parr [10] suggested the presence of an undifferentiated adrenergic pineal receptor having α- and β-adrenergic characteristics. Our results support this hypothesis and suggest the immature αβ-adrenergic receptors is limited to the young rat. This receptor presumably matures to reach a preeminent β-adrenergic characteristics in adults.

Previous results in vivo showed that treatments with both α- and β-adrenergic receptor agonists stimulated pineal NAT and other enzymes early during development [11–13]. However, in adult rats, NAT activation is mostly due to a β-adrenergic receptor stimulus [11,13].

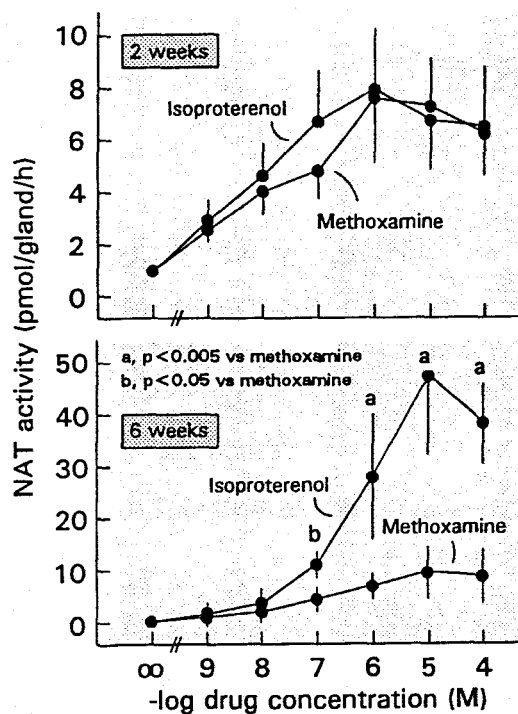


Fig. 1. Effect of isoproterenol and methoxamine on pineal NAT activity at different ages. Pineals were incubated for 6 h in the presence of increasing concentration of the drugs. Data are mean  $\pm$  S.E. of six experiments.

Moreover, phenylephrine, another α-adrenergic receptor agonist, stimulated pineal NAT activity during both the day and at night in 2-week-old rats while exhibiting no effect in adults. Methoxamine also activated NAT activity in young but not in adult rats. On the other hand, the activation of pineal NAT activity induced by the β-adrenergic agonist isoproterenol was prevented by the β-adrenergic blocker propranolol but not by prazosin in 2-week-old rats. Nevertheless, the activation of pineal NAT induced by the α-adrenergic agonist phenylephrine was prevented not only by the α-adrenergic blocker prazosin but also by propranolol [13]. These results indicate that the adrenergic receptor agonists used acted in a non-specific manner by binding to relatively immature receptors. Further studies concerning the specificity of adrenergic receptor to α- and β-adrenergic agonists and blocker during development could confirm this hypothesis.

In conclusion, we have observed in vivo and in vitro the presence of different adrenergic mechanisms involved in the regulation of NAT activity during development because β-adrenergic receptors seem to be mainly involved in adult rats. In young rats, both α-β-adrenergic receptors appear to be implicated in the activation of NAT. These different results are possibly based on the presence of relatively immature adrenergic receptors in the rat pineal gland during development.

This work was supported by a grant from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (PB91-0616) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (93/0210).

- [1] Brammer, M., Binkley, S., Enrico, J. and Duffy, M., The rise and fall of *N*-acetyltransferase in vitro: the influence of age, *Dev. Biol.*, 86 (1981) 256–258.
- [2] Buda, M. and Klein, D.C., A suspension culture of pinealocytes: regulation of *N*-acetyltransferase activity, *Endocrinology*, 103 (1978) 1483–1493.
- [3] Champney, T.H., Holtorf, A.P., Steger R.W. and Reiter, R.J., Concurrent determination of enzymatic activities and substrate concentrations in the melatonin synthetic pathway within the same pineal, *J. Neurosci. Res.*, 11 (1984) 59–66.
- [4] Deguchi, T., Role of  $\beta$ -adrenergic receptors in the elevation of adenosine cyclic 3,5'-monophosphate and induction of serotonin *N*-acetyltransferase in rat pineal gland, *Mol. Pharmacol.*, 9 (1973) 184–187.
- [5] Deguchi, T. and Axelrod, J., Sensitive assay for serotonin *N*-acetyltransferase activity in the rat pineal gland, *Anal. Biochem.*, 50 (1972) 174–179.
- [6] Klein, D.C., Sugden, D. and Weller, J.L., Postsynaptic  $\alpha$ -adrenergic receptor potentiated the  $\beta$ -adrenergic stimulation of pineal serotonin *N*-acetyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (1983) 599–603.
- [7] Lytle, L.D., Hook, K.A. and Torres, G., Maturational changes in rat pineal gland and neuronal mechanisms controlling its functions, *Pineal Res. Rev.*, 6 (1988) 172–199.
- [8] Reiter, R.J., Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions, *Endocr. Rev.*, 12 (1991) 151–179.
- [9] Reiter, R.J., Pineal gland: interface between the photoperiodic environment and the endocrine system, *Trends Endocrinol. Metab.*, 2 (1991) 13–19.
- [10] Rowe, V. and Parr, J., Developmental changes in the stimulation of serotonin *N*-acetyltransferase activity and melatonin synthesis in the rat pineal in monolayer culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218 (1981) 97–102.
- [11] Rubio, A., Osuna, C., Jimenez, J., Molinero, P. and Guerrero, J.M., In vivo activation of pineal *N*-acetyltransferase but not type II thyroxine 5'-deiodinase by phenylephrine in young rats, *Neurosci. Lett.*, 127 (1991) 13–15.
- [12] Rubio, A., Osuna, C. and Guerrero, J.M.,  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenergic mechanisms are involved in regulation of rat pineal type II thyroxine 5'-deiodinase activity during development, *Endocrinology*, 128 (1991) 1661–1667.
- [13] Rubio, A., Guerrero, J.M., Reiter, R.J. and Osuna, C., Involvement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in the regulation of rat pineal *N*-acetyltransferase activity during development, *Endocrinology*, 132 (1993) 393–398.
- [14] Vanecek, J., Sugden, D., Weller, J.L. and Klein, D.C., Atypical synergistic  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes, *Endocrinology*, 116 (1985) 2167–2173.



# Binding of [<sup>125</sup>I]Iodocyanopindolol by Rat Harderian Gland Crude Membranes: Kinetic Characteristics and Day–Night Variations

A. Harmouch,<sup>1</sup> C. Osuna,<sup>1</sup> M. Rafii-El-Idrissi,<sup>1</sup> J. R. Calvo,<sup>1</sup>  
and J. M. Guerrero<sup>1,2</sup>

Received February 26, 1996; accepted May 30, 1996

The Harderian glands are innervated by sympathetic fibers originating in the superior cervical ganglia. The aim of this study is to characterize the  $\beta$ -adrenergic receptors in the rat Harderian gland. The characteristics of  $\beta$ -adrenergic receptors were determined in crude membrane preparations from rat Harderian gland, using [<sup>125</sup>I]iodocyanopindolol ([<sup>125</sup>I]CYP) as radioligand. The binding of the ligand to the receptor is rapid, reversible, saturable, specific and dependent on time, temperature and membrane concentration. At 30°C, stoichiometric data suggest the presence of one binding site with a  $K_d$  value of 0.29 nM and  $B_{max}$  of 32 pmol/L. The interaction shows a high degree of specificity for  $\beta$ -adrenergic agonists and blockers, as suggested by competitive displacement experiments with isoproterenol ( $IC_{50} = 19.1$  nM), propranolol ( $IC_{50} = 28.1$  nM), and norepinephrine ( $IC_{50} = 96.3$  nM). Clonidine, yohimbine, methoxamine, and prazosin are ineffective at concentrations up to 1  $\mu$ M. In the other hand, binding of [<sup>125</sup>I]CYP by Harderian gland membranes exhibits day–night variations. Binding values are low during the daytime and increase progressively late in the evening to reach a maximum at 2200 h (2 h after the onset of dark period), but decreased to the end of the dark period (0600 h). In conclusion, the results presented in this paper show the functional and pharmacological characterization of  $\beta$ -adrenergic receptors in the rat Harderian gland. This neurotransmitter may play a physiological role at this level regulating, at least, processes such as a thyroid hormone metabolism.

**KEY WORDS:** Harderian gland;  $\beta$ -adrenoceptor; [<sup>125</sup>I]iodocyanopindolol; circadian rhythm.

## INTRODUCTION

Harderian glands were discovered by Harder in 1694, and are found in the medial and posterior area to the eyeball. The Harderian glands are large tubuloalveolar, possessing a nictating membrane (Davis, 1929). In the hamster, but not in the rat, Harderian glands exhibit marked sexual differences; the female type possesses a

<sup>1</sup> Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, The University of Seville School of Medicine and Virgen Macarena Hospital, Avda Sanchez Pizjuan 4, 41009-Seville, Spain.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.

single type of secretory cells (type I), while the male type gland exhibits two secretory cell types (type I and type II) which appear in similar percentage (50%) (Hoffman, 1971). Type II cells are exclusively present in the male hamster but disappear after androgen deprivation being replaced by type I cells that express melatonin receptors (Menendez-Pelaez *et al.*, 1993). Characteristically, the Harderian glands of many species contain several indoleamines, melatonin (Menendez-Pelaez *et al.*, 1989), and porphyrins (Margolis, 1971), showing marked sexual differences, with male levels being much lower than those of female. The castration can cause substantial changes in the porphyrin concentrations in the Harderian glands of the male hamster. Likewise, light deprivation for as short a period as 1 week by means of bilateral enucleation led to significant reduction in the porphyrin concentration in the Harderian glands of female hamsters (Van Jaarsveld *et al.*, 1989).

In addition, several rhythms that may be related to the light:dark cycle have been described in the Harderian gland, such as melatonin content (Reiter *et al.*, 1983) and specific melatonin receptors (Lopez-Gonzalez *et al.*, 1991; Calvo *et al.*, 1995). Harderian glands also contain the deiodinating enzyme, type II thyroxine 5'-deiodinase (Guerrero *et al.*, 1987). Presumably, darkness induces increases in the enzyme activity by releasing norepinephrine from the postganglionic nerve endings that innervate the Harderian gland (Osuna *et al.*, 1992). The Harderian glands are innervated by sympathetic fibers originating in the superior cervical ganglia (Huhtala *et al.*, 1977). In rat and other mammalian species studied, Harderian glands not only contain adrenergic and cholinergic nerve fibers, but also a considerable number of VIP immunoreactive nerve fibers localized close to the acini and surrounding blood vessels (Tsukahara and Jacobowitz, 1987). Finally, the Syrian hamster Harderian gland also contains  $\beta$ -adrenoceptors, which exhibit pronounced sexual differences. Both the receptor number and the dissociation constant are higher in females than in males (Pangerl *et al.*, 1989a).

The aim of this study is to characterize the  $\beta$ -adrenergic receptors in the rat Harderian gland. We show that [ $^{125}$ I]iodocyanopindolol, a  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist, is specifically bound by Harderian gland crude membranes, exhibiting day-night variations with maximal binding early in the dark period.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Bacitracin, bovine serum albumin (BSA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N-[2-hydroxypropanesulfonic acid] (HEPES), isoproterenol, propranolol, clonidine, yohimbine, methoxamine, and prazosin were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), N- $\alpha$ -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), and leupeptin were from Boehringer Mannheim GmbH (Germany). [ $^{125}$ I]iodocyanopindolol ([ $^{125}$ I]CYP; 2200 Ci/mmol) was from Amersham (Amersham, UK).

### Animals and Membrane Preparation

Adult male Wistar rats born in our animal facility were used. Animals received food and water *ad libitum* and were exposed to an automatically regulated light:dark (LD) cycle of 14:10; the lights were turned off daily from 2000 through 0600 h. On the day of the experiment, animals were killed by decapitation and Harderian glands were quickly collected, frozen on solid CO<sub>2</sub>, and stored at -80°C until assayed.

For membrane preparation, the glands were homogenized using a Polytron (2 × 1 min) in 10 mM Tris-CHl buffer, pH 7.5, containing 0.25 M sucrose, 0.5 mM EDTA, 0.1 mg/ml bacitracin, 0.01 mg/ml TLCK, 0.01 mg/ml leupeptin, and 0.05 mg/ml PMSF. The homogenate was centrifuged at 16,000 rpm for 30 min at 4°C. The pellet (crude membranes) was washed twice in 20 mM Hepes, pH 7.5, and the final pellet was immediately frozen at -80°C until used. Protein concentration was determined by using BSA as standard (Lowry *et al.*, 1951).

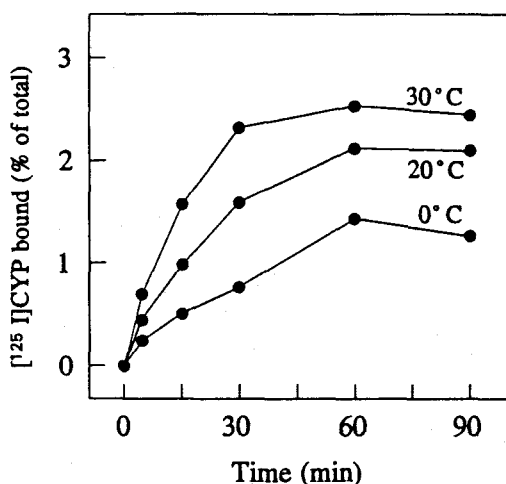
### Binding of [<sup>125</sup>I]CYP to Membranes

For binding reaction, the incubation medium (final volume 0.4 ml) contained 200  $\mu$ l of crude membranes, 100  $\mu$ l of [<sup>125</sup>I]CYP and, when required, 100  $\mu$ l of displacing ligand. For saturation binding studies we used concentrations of radioligand between 3 and 1200 pM. The incubation was stopped by adding 10 mM Tris buffer, pH 7.6, (containing 154 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM ascorbic acid), and centrifuged. Then, the radioactivity of the pellet was counted in a Beckman gamma-counter. Specific binding was defined as the total binding minus the binding measured in the presence of 1  $\mu$ M of propranolol. The equilibrium dissociation constant ( $K_d$ ) and the maximal number of binding sites ( $B_{max}$ ) was calculated from plots according to Scatchard (1949). Data were statistically analyzed using an ANOVA, followed by a Student-Newman-Keuls multiple range T test.

## RESULTS

The specific binding of [<sup>125</sup>I]CYP to rat Harderian gland membranes was a time and temperature-dependent process (Fig. 1). At 30°C; the binding of [<sup>125</sup>I]CYP to membranes was rapid, with maximal values at 30 min and was stable until 90 min. At 0 and 20°C, an apparent equilibrium was achieved between 60 and 90 min, but the maximal binding observed was lesser than that obtained at 30°C. Therefore, it was decided to undertake all subsequent experiments for 30 min at 30°C.

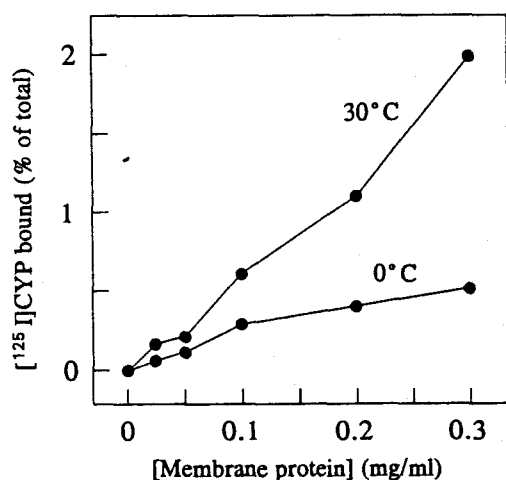
To determine whether the binding of [<sup>125</sup>I]CYP was a process dependent on the membrane protein concentration, the specific binding of [<sup>125</sup>I]CYP was studied in the presence of increasing membrane protein concentrations. Figure 2 shows that binding of [<sup>125</sup>I]CYP was linearly related to membrane protein concentration, at least up to 300  $\mu$ g/ml ( $r = 0.995$ ). Further incubations were performed with 300  $\mu$ g membrane protein/ml, at 30°C for 30 min to provide maximal binding.



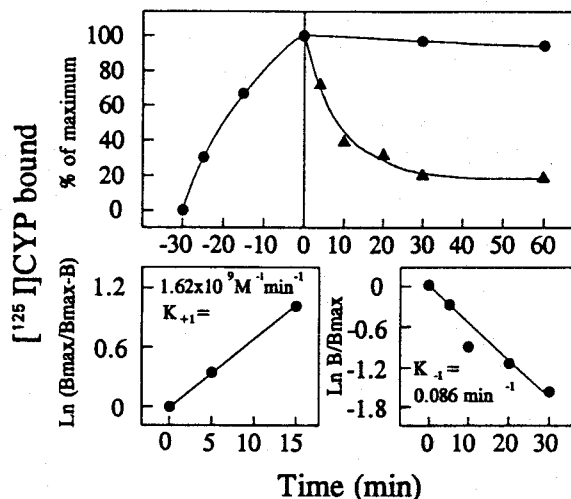
**Fig. 1.** Time-course of specific binding of [ $^{125}\text{I}$ ]CYP by rat Harderian gland as a function of temperature. [ $^{125}\text{I}$ ]CYP (50 pM) was incubated with rat Harderian gland membranes (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) at 0, 20 and 30°C. Specific binding of the tracer was determined at the times indicated. Each point is the mean of triplicates. Two other experiments gave similar results.

Under optimal conditions binding of [ $^{125}\text{I}$ ]CYP to rat Harderian gland membranes increased during the first 30 min and equilibrated after approximately 30–60 min (Fig. 3, top), with  $K_{+1} = 1.62 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Fig. 3, left bottom). Following equilibrium, binding of [ $^{125}\text{I}$ ]CYP to Harderian gland membranes was reversible. Dissociation of the tracer-membrane complex was studied by the addition of 1  $\mu\text{M}$  of propranolol; this test indicated a half-time of dissociation of about 10 min, with  $K_{-1} = 0.086 \text{ min}^{-1}$  (Fig. 3, right bottom). The kinetically derived value of  $K_d = 52.0 \text{ pM}$ , was obtained from the ratio of the rate constants ( $k_{-1}/k_{+1}$ ).

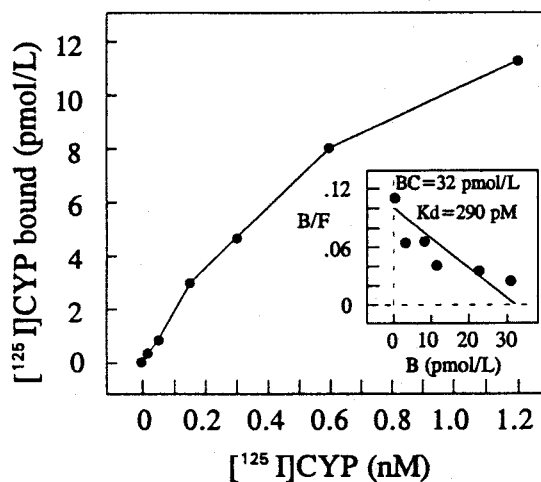
Stoichiometric studies showed that binding of [ $^{125}\text{I}$ ]CYP to rat Harderian gland membranes increased with increasing concentrations of radioligand at 1.2 nM (Fig. 4). Scatchard analysis of the data (Fig. 4, inset) shows binding to a



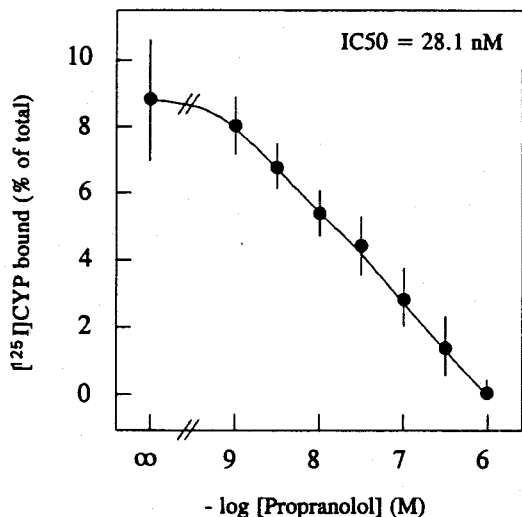
**Fig. 2.** Specific binding of [ $^{125}\text{I}$ ]CYP by rat Harderian gland membranes as function of protein concentration. Increasing concentrations of membrane protein were incubated with [ $^{125}\text{I}$ ]CYP (50 pM) at 0 and 30°C for 30 min. The specific binding was determined and plotted as a function of protein concentration. Each point is the mean of triplicates. Two other separate experiments gave similar results.



**Fig. 3.** Association and dissociation of [<sup>125</sup>I]CYP binding in rat Harderian gland membranes. *Top:* [<sup>125</sup>I]CYP (50 pM) was incubated with crude membranes (300 μg/ml) at 30°C at the times indicated. After 30 min incubation, 10 μM propranolol was added and the specifically bound radioactivity was determined at the appropriated times, and expressed as the percentage of radioactivity at time zero. *Left-bottom:* Pseudo-first order plot of the association data.  $B_{max}$  is the specific binding at equilibrium.  $B$  is the specific binding at the time point measured. *Right-bottom:* First order plot of the dissociation data ( $r = 0.995$ ).  $B_{max}$  is the specific binding when dissociation is initiated.



**Fig. 4.** Saturation isotherm of [<sup>125</sup>I]CYP binding to rat Harderian gland membranes. Points are the means of triplicate determinations, crude membranes were incubated for 30 min at 30°C. *Inset:* Scatchard analysis of binding data indicates a  $K_d$  of 0.29 nM and  $B_{max}$  of 32 pmol/L.



**Fig. 5.** Competitive displacement of [<sup>125</sup>I]CYP binding to rat Harderian gland membranes by propranolol. Membranes (300 μg/ml) were incubated with 50 pM [<sup>125</sup>I]CYP at 30°C for 30 min in the absence or presence of increasing concentration of propranolol. Results are the means ± SE of 4 separate experiments performed in triplicate.

single class of binding sites without cooperative interactions. The  $K_d$  for the single site was 290 pM with a binding capacity of 32 pmol/L. In competition studies, results showed that [<sup>125</sup>I]CYP binding in Harderian gland membranes is highly specific for the  $\beta$ -adrenergic receptors agonists and antagonists. Thus, binding of the tracer was inhibited by increasing concentrations of propranolol (Fig. 5). Half-maximal inhibition ( $IC_{50}$ ) was observed at about 28.1 nM. The specificity of  $\beta$ -adrenoceptors in Harderian gland membranes was also investigated by determining the ability of various compounds to compete with the binding of [<sup>125</sup>I]CYP. The order of potency of these compounds, as expressed by the  $IC_{50}$  value, was as follows: isoproterenol (19.1 nM), propranolol (28.1 nM), and norepinephrine (96.3 nM). Clonidine, yohimbine, methoxamine, and prazosin were ineffective at concentration up to 1 μM (Fig. 6). Thus, binding of [<sup>125</sup>I]CYP to Harderian gland membrane was specific for  $\beta$ -adrenergic agonists or blockers as indicated by the fact that only isoproterenol, propranolol, and norepinephrine were able to inhibit the binding of the tracer to the membranes.

Binding [<sup>125</sup>I]CYP by Harderian gland membranes exhibited day-night variations (Fig. 7). Binding values were low during the daytime and increased progressively late in the evening to reach a maximum at 2200 h; then, binding decreased at the end of the dark period (0600 h).

## DISCUSSION

In the present paper we show that [<sup>125</sup>I]CYP, a  $\beta$ -adrenergic receptor ligand, may interact with rat Harderian gland crude membranes through high-affinity binding sites. Binding of [<sup>125</sup>I]CYP by membranes fulfills all criteria for binding to a receptor site. Thus, binding exhibits properties such as dependence on time and temperature as well as reversibility, saturability, high affinity, and specificity. The  $K_d$  computed from the kinetic analysis agreed to that derived from the saturation

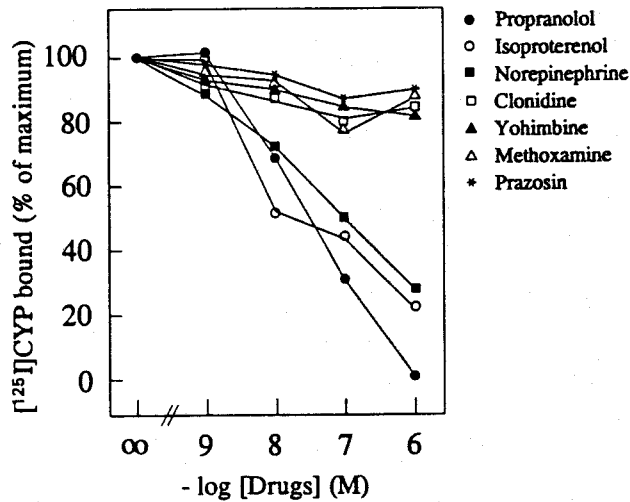


Fig. 6. Competitive inhibition of [<sup>125</sup>I]CYP binding to rat Harderian gland membranes by isoproterenol, propranolol, methoxamine, prazosin, clonidine and yohimbine. Binding is expressed as the percentage of radioactivity specifically bound in the absence of drugs. Each point is the mean of 4 separate experiments performed in triplicate.

study, suggesting that the binding followed mass action principles for a pseudo first order reaction.

Saturation studies were performed using exclusively increasing concentrations of [<sup>125</sup>I]CYP. Interpretation of the data by the Scatchard analysis (Scatchard, 1949) disclosed one binding site for the ligand in Harderian gland membranes. Values of affinity (K<sub>d</sub> = 290 pM) and binding capacity (32 pmol/L)

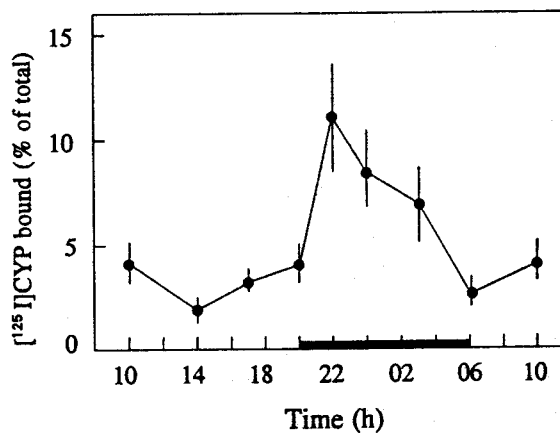


Fig. 7. Day-night variation of [<sup>125</sup>I]CYP binding in rat Harderian gland. On the day of the experiment, animals were killed at the time indicated. The dark phase is indicated by the black bar on the time axis. Results are the means ± SE of 7 animals.

are in the same range of those obtained in the Syrian hamster Harderian gland (Pangerl *et al.*, 1989a), and in the pineal gland of rat (Gonzalez-Brito *et al.*, 1988) and hamster (Pangerl *et al.*, 1989b, 1990); they were also similar to values reported using different ligands in other tissues (Dax *et al.*, 1986; Neve *et al.*, 1986). With respect to specificity, the greater affinity of the  $\beta$ -adrenergic agonists and blockers compared with other adrenergic agonists has been previously demonstrated with different ligands and tissues.

In this study, binding of [ $^{125}$ I]CYP to rat Harderian gland membranes exhibited diurnal variations with peak values early in the dark period, and low values late at night and during the day. Although stoichiometric studies remain to be performed during the day:night cycle, previous results suggest that these changes in the binding of [ $^{125}$ I]CYP to membranes are associated to changes in the binding capacity rather than to changes in the affinity of the receptor (Pangerl *et al.*, 1989a). Our results agree with previous investigations that a diurnal rhythm exists in the binding capacity of [ $^{125}$ I]CYP in the hamster Harderian gland (Pangerl *et al.*, 1989a), and in the pineal gland of the hamster (Pangerl *et al.*, 1989b) or the rat (Gonzalez-Brito *et al.*, 1988).

The physiological role of  $\beta$ -adrenergic receptor in the rat Harderian gland is not well established. However, evidence has been accumulated indicating that adrenergic agonists activate the enzyme, type II thyroxine 5'-deiodinase. This enzyme has been found in the Harderian gland of rat (Guerrero *et al.*, 1987) and hamster (Guerrero *et al.*, 1989) where it is believed to have an important role in maintaining intracellular levels of T3 and to serve as a defense against thyroid hormone deficiency. Its activity is regulated, not only by the thyroid status, but also by both  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agonists (Osuna *et al.*, 1990, 1992; Rubio *et al.*, 1991).

In conclusion, the results presented in this paper show the functional and pharmacological characterization of  $\beta$ -adrenergic receptors in the rat Harderian gland. This neurotransmitter may play a physiological role at this level regulating, at least, processes such as a thyroid hormone metabolism.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants from Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia (PB94-1434) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (93/0210).

### REFERENCES

- Calvo, J. R., Rafii-El-Idrissi, M., Pozo, D. and Guerrero, J. M. (1995) *J. Pineal Res.* **18**:119-126.
- Davis, F. A. (1929) *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **27**:401-441.
- ← Dax, E. M., Partilla, J. S., Jackson, K. L. and Gregerman, R. I. (1986) *J. Receptor Res.* **6**:165-182.
- ← Gonzalez-Brito, A., Jones, D. J., Ademe, R. M. and Reiter, R. J. (1988) *Brain Res.* **438**:108-114.
- ← Guerrero, J. M., Puig-Domingo, M., Vaughan, G. M. and Reiter, R. J. (1987) *Life Sci.* **41**:1179-1185.
- ← Guerrero, J. M., Gonzalez-Brito, A., Santana, C. and Reiter, R. J. (1989) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **190**:186-189.
- Hopman, R. A. (1971) *Am. J. Anat.* **132**:463-478.



- Huhtala, A., Huikurik, T., Palkama, A. and Tervot, T. (1977) *Anat. Res.* **188**:263-272.
- Lopez-Gonzalez, M. A., Calvo, J. R., Robio, A., Goberna, R. and Guerrero, J. M. (1991) *Life Sci.* **48**:1165-1171.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Margolis, M. A. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **145**:373-381.
- Menendez-Pelaez, A., Reiter, R. J., Gonzalez-Brito, A., Santana, C. and Guerrero, J. M. (1989) *Adv. Pineal Res.* **3**:77-81.
- Menendez-Pelaez, A., Lopez-Gonzalez, M. A. and Guerrero, J. M. (1993) *J. Pineal Res.* **14**:34-38.
- Neve, K. A., McGonigle, P. and Molinoff, P. B. (1986) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **238**:46-53.
- Osuna, C., Rubio, A., Goberna, R. and Guerrero, J. M. (1990) *Life Sci.* **46**:1945-1951.
- Osuna, C., Jinenez, J., Reiter, R. J., Rubio, A. and Guerrero, J. M. (1992) *Amer. J. Physiol.* **263**:E884-E889.
- Pangerl, A., Pangerl, B., Buzzell, G., Jones, D. J. and Reiter, R. J. (1989a) *J. Neurosci. Res.* **22**:456-460.
- Pangerl, B., Pangerl, A., Reiter, R. J. and Jones, D. J. (1989b) *Neuroendocrinology.* **49**:570-573.
- Pangerl, B., Pangerl, A. and Reiter, R. J. (1990) *J. Neural Transm [Gen. Sect.]* **81**:17-29.
- Reiter, R. J., Richardson, B. A., Matthews, S. A., Lane, J. and Ferguson, B. N. (1983) *Life Sci.* **32**:1229-1236.
- Rubio, A., Guerrero, J. M., Gonzalez, M. A., Lopez-Gonzalez, M. A. and Osuna, C. (1991) *Life Sci.* **49**:1523-1530.
- Scatchard, G. (1949) *Ann. NY Acad. Sci.* **51**:660-672.
- Tsukahara, S. and Jacobowitz, D. M. (1987) *Histochemistry.* **87**:233-236.
- Van Jaarsveld, A., Molina, C., Hatre, M. and Reiter, R. J. (1989) *Biomedical Res.* **10**:1-8.

# Differential adrenergic regulation of rat pineal cyclic AMP production and N-acetyltransferase activity during postnatal development: involvement of $G_{\alpha S}$ and $G_{\alpha i1-2}$ proteins

A Harmouch, J M Guerrero, D Pozo, M Rafii-El-Idrissi, J R Calvo, R J Reiter<sup>1</sup> and C Osuna

Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, The University of Seville School of Medicine and Virgen Macarena Hospital, Seville, Spain and

<sup>1</sup>Department of Cellular and Structural Biology, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas, USA

(Requests for offprints should be addressed to C Osuna, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, The University of Seville School of Medicine, Avda Sanchez Pizjuan 4, 41009-Seville, Spain)

## Abstract

We have studied why rat pineal N-acetyltransferase (NAT) activity is relatively insensitive to isoproterenol in young rats when compared with adult rats. We report that activation by isoproterenol of pineal cyclic AMP production and NAT activity is higher in adult than in 2-week-old rats. However, the effect of dibutyryl cyclic AMP, which enters the pinealocyte and duplicates the effect of cyclic AMP, on NAT activity was similar at both ages. Moreover, we found that both  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors are highly specific at both ages, since the binding of the specific radioligands used to their receptors could be displaced only by their corresponding agonists and antagonists. However, we observed differences between pineals from young and adult rats when several families of the  $\alpha$  subunit of G-proteins were studied in cell membranes.

ADP-ribosylation and immunoblot studies have shown clear differences in both 42 and 45 kDa forms of the  $G_{\alpha S}$ . Both forms exhibit low values in pineals from 2-week-old animals when compared with 6-week-old. We also show that the later appearance of both  $G_{\alpha S}$  forms is roughly similar to the potent activation of cyclic AMP production and NAT activity in adult rats when compared with young rats. In conclusion, the results presented suggest that the relative lack of sensitivity of rat pineal gland to  $\beta$ -adrenergic receptor agonists early in the postnatal development may be explained by the low levels of membrane  $G_{\alpha S}$ , rather than postreceptor-mediated mechanisms or changes in the characteristics of the  $\beta$ -adrenergic receptors on the pinealocyte membrane.

*Journal of Endocrinology* (1997) 155, 305–312

## Introduction

The pineal glands of all mammals originate from the posterodorsal region of the diencephalic roof and are innervated by sympathetic input from the superior cervical ganglia (Kappers 1960). The sympathetic innervation of the pineal is essential for its function in relation to the light–darkness cycle. Arylalkylamine N-acetyltransferase (NAT) is the enzyme that acetylates serotonin to N-acetylserotonin in the pineal gland, thereby controlling the circadian rhythm of melatonin production (Reiter 1991a). In the adult rat, pineal NAT activity exhibits a nyctohemeral profile, with a progressive increase in its activity after the onset of the dark period (Klein & Weller 1970). Cyclic AMP has been shown to participate in the adrenergic stimulation of not only NAT, but also tryptophan hydroxylase (Ehret *et al.* 1991), which converts tryptophan to 5-hydroxytryptophan, as well as thyroxine type II 5'-deiodinase (Guerrero *et al.* 1988,

Rubio *et al.* 1991a), which converts thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine in the gland.

NAT activity is regulated by neural signals that originate in a circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nuclei (SCN), which receives information about environmental lighting conditions from the eyes (Reiter 1985). Beyond the SCN, the neural signals travel along a neural pathway to the superior cervical ganglia, which transmit the information through postganglionic sympathetic projections to the pineal gland. During the night, norepinephrine (NE) released from sympathetic nerve endings, interacts with  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors on the pinealocyte membrane. In adult rats, NE acts primarily on  $\beta$ -adrenergic receptors, thereby increasing the intracellular concentration of cyclic AMP, which leads to the subsequent activation of NAT activity and melatonin synthesis (Deguchi 1973). Also in adult rats,  $\alpha$ -adrenergic receptors exert a synergistic effect on the stimulation of NAT activity by  $\beta$ -adrenergic receptors (Vanecek *et al.*

1985). Administration of adrenergic receptor agonists (i.e. isoproterenol) induces large increases in otherwise low daytime NAT activity (Deguchi & Axelrod 1972b) and melatonin content (Reiter 1991b) in the rat pineal gland. In contrast, administration of adrenergic receptor antagonists (i.e. propranolol) or depletion of pineal NE by adrenergic denervation of the gland (by superior cervical ganglionectomy) inhibits the normal night-time rise in melatonin synthesis (Deguchi & Axelrod 1972b, Reiter *et al.* 1979). These denervation effects are reversed by administration of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists such as isoproterenol.

Several components of the regulatory system can be found in newborn rats (Lytle *et al.* 1988, Laakso *et al.* 1995). Both  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenergic receptors are present, as are low levels of NAT activity (Ellison *et al.* 1972, Sugden & Klein 1985). In newborn rats NAT can be enhanced by adrenergic stimulation of the gland (Vanecek & Illnerova 1979). Hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) and melatonin are undetectable at the time of birth (Sugden & Klein 1983). Within the first 3–4 postnatal days, sympathetic fibers initially penetrate the pineal parenchyma (Hakanson *et al.* 1967, Machado *et al.* 1968) and pineal melatonin becomes detectable (Tang & Pang 1988). At the end of the first week of age pineal HIOMT activity is measurable (Klein *et al.* 1981, Sugden & Klein 1983) as are day/night differences in NAT activity (Ellison *et al.* 1972, Illnerova 1975). The rhythmic variation of pineal melatonin production and its response to light are observed during the second postnatal week (Tamarkin *et al.* 1980). Maturation of the system continues such that at weaning (when the young are 3 weeks of age), melatonin synthesis and its control resemble those of the adult rat.

We previously reported differences in the regulatory role of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor agonists on the pineal during development (Rubio *et al.* 1991b, Harmouch *et al.* 1994). Results showed that isoproterenol, a  $\beta_1$ -adrenergic receptor agonist, exhibited a weak stimulatory effect on pineal NAT during the first 2 weeks of age when compared with adult rats. The effects of phenylephrine and methoxamine, two  $\alpha_1$ -adrenergic receptor agonists, however, were similar at both ages, suggesting that  $\alpha_1$ -adrenergic receptors may be equally as important as the  $\beta$ -adrenergic receptors in regulating pineal NAT during postnatal development.

In this paper, we show the weak response of isoproterenol in stimulating both NAT activity and cyclic AMP production in 2-week-old rat pineals in culture, when compared with pineals from 6-week-old rats. However, dibutyryl cyclic AMP, which enters the pinealocyte, proved to be highly effective in stimulating NAT activity at both ages. The weak response of isoproterenol appears to be related with a lack of the  $G_s$  protein coupled to the  $\beta_1$ -adrenergic receptor rather than to modifications of the  $\beta_1$ -adrenergic agonist binding to its receptor.

## Materials and Methods

### Chemicals

BGJb medium (Fitton-Jackson modification) and L-glutamine were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). L-ascorbic acid, BSA, penicillin/streptomycin solution, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX), EDTA, bacitracin, trypsin, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-hydroxypropanesulfonic acid) (Hepes), isoproterenol, propranolol, methoxamine, prazosin, dibutyryl cyclic AMP, pertussis toxin (PTx), cholera toxin (CTx), dithiothreitol,  $MgCl_2$ , GTP, ATP, thymidine, phosphocreatine, creatine kinase, nonidet P40 and prazosin were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). [ $^{32}P$ ]NAD<sup>+</sup>, anti- $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$  ( $G_{q11}$ ), anti- $\beta$  common, anti- $G_{\alpha_s}$ , anti- $G_{i1-2}$  and anti- $G_{i3}$  were purchased from New England Nuclear (Du Pont de Nemours, Dreieich, Germany). Falcon organ culture dishes (3037) were from Falcon Plastics (Los Angeles, CA, USA). [ $^{14}C$ ]acetyl CoA (50 mCi/mmol), radioimmunoassay kits for  $^{125}I$ -cyclic AMP,  $^{125}I$ -cyanopindolol ( $^{125}I$ -CYP, 2200 Ci/mmol), anti-rabbit Ig  $^{125}I$ -labeled species-specific F(ab')<sub>2</sub> fragment,  $^{125}I$ -2-[ $\beta$ -(4-hydroxy-phenyl)-ethylaminomethyl]tetralone ( $^{125}I$ -HEAT, 2200 Ci/mmol) were from Amersham International (Amersham, Bucks, UK). Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), N- $\alpha$ -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) and leupeptin were from Boehringer-Mannheim GmbH (Germany). Chemicals and protein markers for SDS-PAGE were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Nitrocellulose membrane was from Hoeffler (CA, USA). Other chemicals were of analytical grade and obtained from commercial sources.

### Animals

Wistar rats of both sexes (2 and 6 weeks of age) were allowed to acclimatize to the animal facilities. Animals received food and water *ad libitum* and were exposed to an automatically regulated light:darkness cycle with lights off from 2000 to 0600 h. Animals were killed at the indicated ages between 1200 and 1600 h, and pineals were collected for either organ culture studies or for binding studies.

### Organ culture

Pineal glands were cultured using a method described by Brammer *et al.* (1981) with some modifications. Two pineals were placed on a filter (HAWP 02500, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) which rested on top of culture medium in a 1 ml well at pH 7.4. The organs were incubated at 37 °C under 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was supplemented with ascorbic acid (0.1 mg/ml), glutamine (0.2 mM), BSA (1 mg/ml), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml). After a pre-incubation of 30 min, pineals were transferred to other

dishes and cultured in the presence of the indicated drugs for 6 h or 20 min for NAT and cyclic AMP studies respectively. Pineals were then collected, frozen on solid CO<sub>2</sub>, and stored at -70 °C until assayed.

#### NAT activity assay

Pineal glands were individually homogenized in 100 µl cold 0.05 M PBS, pH 6.8. They were then immediately used for determination of NAT activity, expressed as pmol N-acetyltryptamine produced/gland per h, using the procedure outlined by Deguchi & Axelrod (1972a) with the modifications of Champney *et al.* (1984).

#### Cyclic AMP assay

After a pre-incubation period of 30 min as previously described, pineals were transferred to other dishes and cultured for 20 min in the presence of the phosphodiesterase inhibitor IBMX (1 mM), and the drugs indicated. Incubation was terminated by homogenizing the glands in 100 µl of PBS. After addition of 50 µl perchloric acid (4%), the homogenate was gently mixed and centrifuged for 10 min at 3000 g; then the cyclic AMP content of the supernatant was determined following a non-acetylation procedure using a commercially available radioimmunoassay kit.

#### Binding studies using <sup>125</sup>I-CYP and <sup>125</sup>I-HEAT

Binding studies were performed (final volume 0.4 ml) in 10 mM Tris buffer, pH 7.6, containing 200 µl of pineal homogenate, 50 pM <sup>125</sup>I-CYP (β-adrenergic receptor ligand) or 50 pM <sup>125</sup>I-HEAT (α<sub>1</sub>-adrenergic receptor ligand) and, when required, α- and β-adrenergic receptor agonists and antagonists. The incubation was stopped by adding 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6 (containing 154 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM ascorbic acid) and then the samples were centrifuged. Radioactivity in the pellet was counted in an LKB gamma counter. Proteins were determined by the microassay procedure using the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### Immunodetection of G-protein subunits

Pineal gland membranes were obtained by sonication in a buffer containing 0.3 mg/ml EDTA, 0.05 mg/ml trypsin I, 0.1 mg/ml bacitracin, 0.01 mg/ml TLCK, 0.01 mg/ml leupeptin, 0.05 mg/ml PMSF, 20 mM Hepes, pH 7.4. The homogenate was centrifuged (4 °C, 45 min, 30 000 g). The resulting pellet was washed twice and resuspended in the appropriate reaction buffer. Pineal membranes (150 µg) were resolved by 12% SDS-PAGE (Laemmli 1970) and then transferred onto nitrocellulose membranes. Electrobots were probed with anti-Gsα, anti-Giα<sub>1-2</sub>,

anti-Giα<sub>0-3</sub>, anti-Gαq<sub>11</sub>, and anti-β common as primary antibodies. They were diluted at 1:1000 in 50 mM Tris-HCl containing 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 80 mM NaCl, 0.2% nonidet P40, 0.02% sodium azide, and 5% dry milk (WB buffer). The immunoreaction was visualized by an autoradiographic method using anti-rabbit Ig, <sup>125</sup>I-labeled species-specific F(ab')<sub>2</sub> fragment (5–20 µCi/µg antibody protein, 200 000 c.p.m./ml in WB buffer).

#### ADP-ribosylation experiments

ADP-ribosylation of membranes was carried out as previously reported (Poza *et al.* 1996) with minor modifications. Thiol preactivated CTx was incubated at 80 µg/ml with pineal membranes (1 mg protein/ml) in 0.25 M phosphate buffer (pH 7.0), containing 5 mM ATP, 50 mM GTP, 1.5 µM α-[<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup>, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and an ATP-regenerating system. ADP-ribosylation of the PTx substrate in rat pineal membrane (1 mg/ml) was performed in Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 10 mM thymidine, 100 µM GTP, 1 mM ATP, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.6 mg/ml creatine kinase, 4.5 mg/ml phosphocreatine and 0.7 µM α-[<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup> with or without 20 µg/ml thiol-preactivated PTx. After 45 min at 30 °C, both CTx- and PTx-catalyzed ADP-ribosylation reactions were stopped by the addition of ice-cold 10% (w/v) trichloroacetic acid. Protein pellets were washed with acetone and solubilized on SDS-gel loading buffer for SDS-PAGE.

#### Statistical analysis

Results are expressed as means ± standard errors (S.E.). Data were statistically analyzed using an ANOVA followed by a Student-Newman-Keul multiple range test.

## Results

#### NAT and cyclic AMP studies

In the first experiment, we compared the effect of isoproterenol and methoxamine on NAT activity in pineal glands of 2- and 6-week-old rats. As shown in Fig. 1, isoproterenol behaved as a potent activator of the enzyme in pineals obtained from 6-week-old rats, while its stimulatory effect on pineals from 2-week-old animals was much less. Methoxamine also stimulated significantly NAT activity in pineals from both 2- and 6-week-old rats. However, unlike isoproterenol, the effect was similar at both ages. The effect of methoxamine in activating NAT activity was similar to that observed with isoproterenol in 2-week-old rats. Thus, in young rats, both drugs exhibited the same low potency, while in adults rats, isoproterenol was six times more potent than methoxamine in stimulating NAT activity. Similar results were obtained when

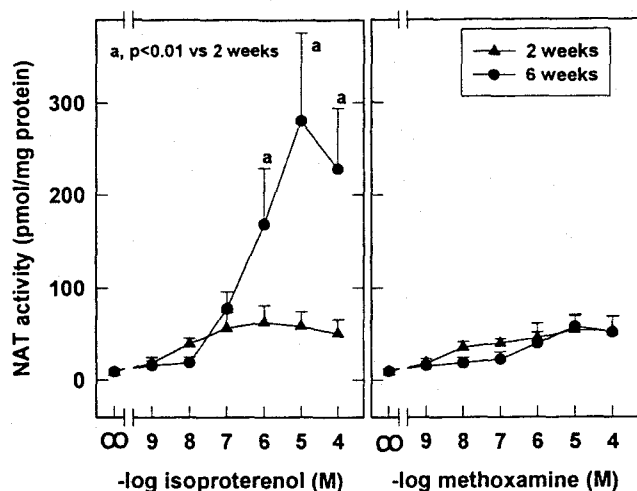


Figure 1 Effect of isoproterenol and methoxamine on rat pineal NAT activity at different ages. After 30 min preincubation, pineals were incubated for 6 h in the presence of increasing concentrations of the drugs. Data are the means ± s.e. of six pineals.

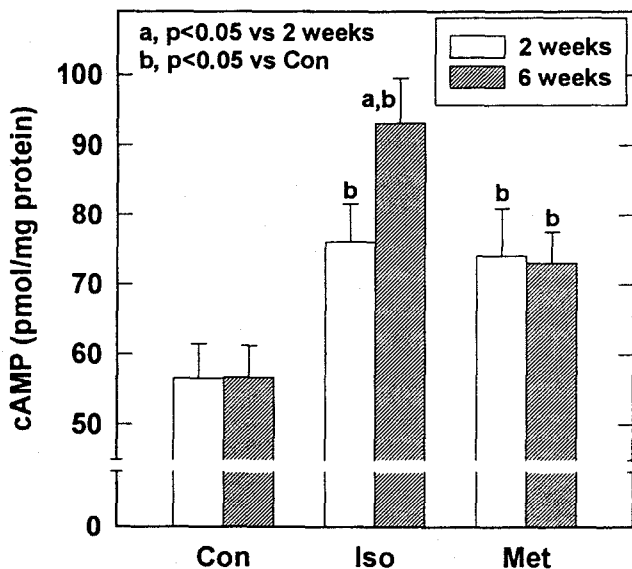


Figure 2 Effect of isoproterenol (Iso) and methoxamine (Met) on rat pineal cyclic AMP production. After 30 min preincubation, pineals were incubated for 20 min in the absence (Con) or in the presence of the drugs (10 μM). Data are the means ± s.e. of 15 pineals.

cyclic AMP production was studied. Figure 2 shows that isoproterenol is a more potent activator of cyclic AMP production in 6-week-old than in 2-week-old rat pineals. The effect of methoxamine, again, was similar at both ages, and in the same range as that of isoproterenol in young rats.

The results indicate that, in young animals, the β-adrenergic mechanism for activating rat pineal NAT is impaired when compared with that in adult rats. Since

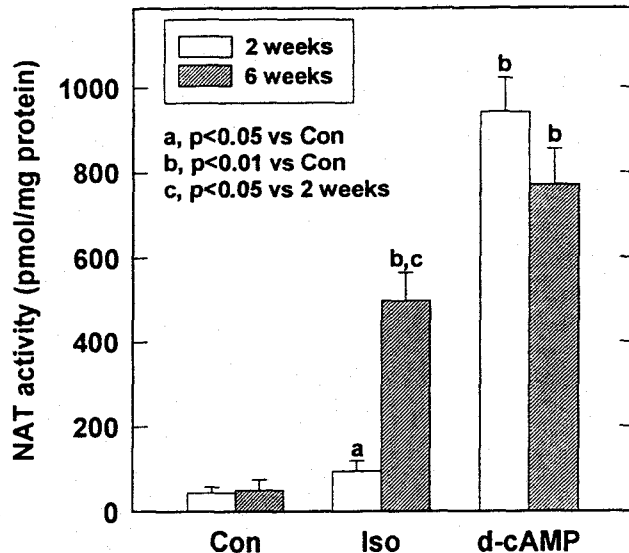
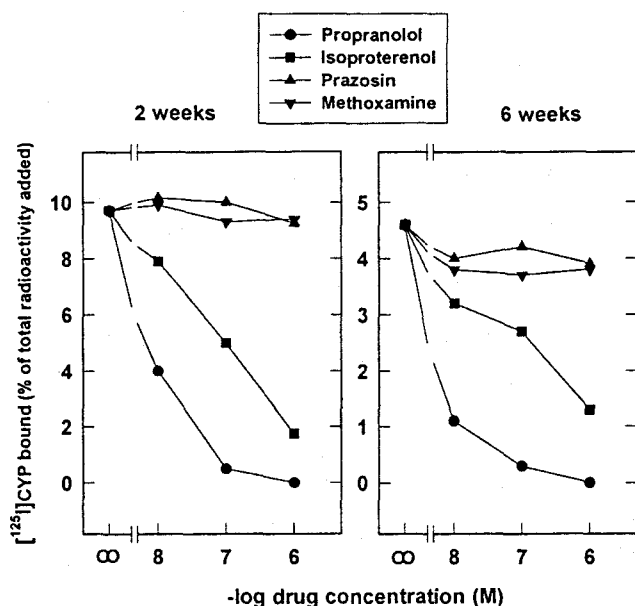


Figure 3 NAT activity in pineal glands incubated in the absence (Con) or in the presence of 10 μM isoproterenol (Iso) and 1 mM of dibutyryl cyclic AMP (d-cAMP). Data are the means ± s.e. of 24 pineals.

cyclic AMP production is also diminished in young rats, the probable cause of this impairment seems to be related to the receptor/effector system in the membrane of the pinealocyte. This was confirmed when pineals were incubated with dibutyryl cyclic AMP, which enters the pinealocyte and activates NAT without the mediation of the membrane receptor/effector system. As shown in Fig. 3, pineals from adult animals were more sensitive to the effect of isoproterenol than were pineals from young animals. Dibutyryl cyclic AMP, however, behaved as a potent activator of pineal NAT in glands of both young and adult rats. This result confirms the impairment of the β-adrenergic agonist mechanism at the membrane level in young rats.

<sup>125</sup>I-CYP and <sup>125</sup>I-HEAT binding studies

In order to define whether β<sub>1</sub>- and α<sub>1</sub>-adrenergic receptors were involved in the impairment of pineal NAT activation by isoproterenol in young rats, rat pineal membranes were incubated with specific radioligands for these two adrenergic receptors. Thus, pineal membranes from 2- and 6-week-old animals were incubated with <sup>125</sup>I-CYP, a high affinity β-adrenergic receptor ligand (Engel *et al.* 1981), or <sup>125</sup>I-HEAT, a highly specific α<sub>1</sub>-adrenergic receptor ligand (Sugden & Klein 1984). Fig. 4 shows that binding of <sup>125</sup>I-CYP to pineal membranes can be clearly measured in both young and adult rats. Moreover, pharmacological studies showed that, at both ages, β<sub>1</sub>-adrenergic receptors are specific for the radioligand. <sup>125</sup>I-CYP binding was displaced by isoproterenol and



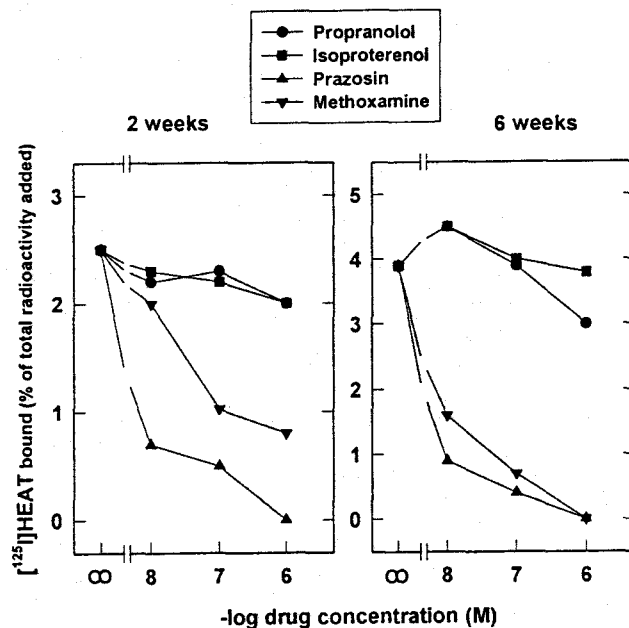
**Figure 4** Competitive inhibition of <sup>125</sup>I-CYP binding by rat pineal gland membranes by increasing concentrations of isoproterenol, propranolol, methoxamine, and prazosin. Binding is expressed as the percentage of radioactivity specifically bound in the absence of drugs. Each point is the mean of four separate experiments performed in triplicate.

propranolol, a  $\beta$ -adrenergic receptor blocker, while methoxamine or prazosin, an  $\alpha_1$ -adrenergic receptor blocker, was totally ineffective.

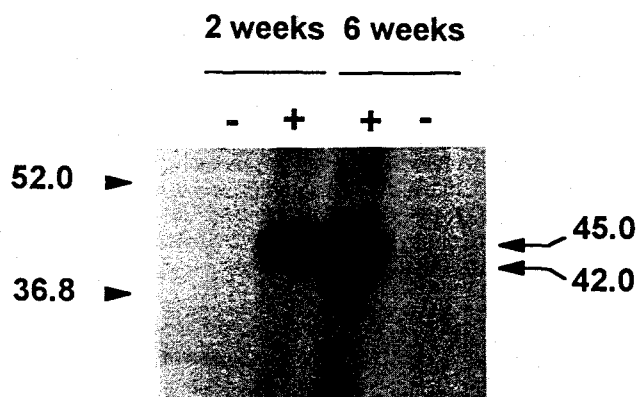
Studies using <sup>125</sup>I-HEAT showed similar results (Fig. 5). Here, binding of the radioligand by pineal membranes was similar in both adult and in young rats. Pharmacological studies also showed the specificity of this binding. At both ages, binding of <sup>125</sup>I-HEAT by pineal membranes was displaced by methoxamine and prazosin, but not by isoproterenol or propranolol. Binding studies indicated that both  $\alpha_1$ - and  $\beta_1$ -adrenergic receptors are present in pineal membranes from both 2- and 6-week-old animals. Binding of both radioligands was similar and completely specific at both ages. Therefore, the impairment of NAT activation by isoproterenol in young animals was seemingly not due to differences in the  $\beta_1$ -adrenergic receptors.

#### ADP-ribosylation experiments

While attempting to identify the postreceptor mechanisms involved in the differential sensitivity of the rat pineal gland during the postnatal development, experiments were performed to study the presence of G-proteins in the membrane of the pinealocyte. Membranes were incubated with CTx or PTx in the presence of  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup> to induce the ADP-ribosylation of G<sub>s</sub>- or G<sub>i</sub>-proteins respectively. As shown in Fig. 6, CTx ADP-ribosylated 45 and 42 kDa proteins in pineal membranes, corresponding to the two forms of G<sub>s $\alpha$</sub> -proteins. However, ADP-

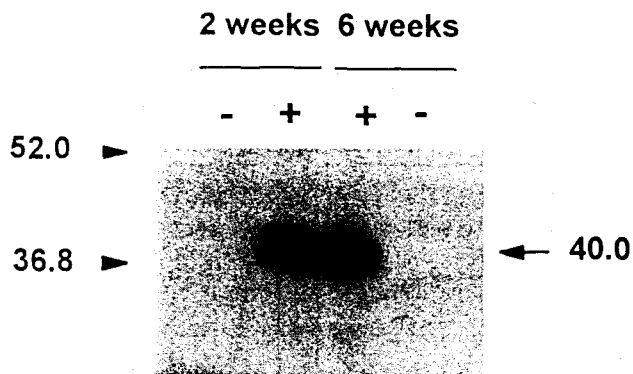


**Figure 5** Competitive inhibition of <sup>125</sup>I-HEAT binding by rat pineal gland membranes by increasing concentrations of isoproterenol, propranolol, methoxamine, and prazosin. Binding is expressed as the percentage of radioactivity specifically bound in the absence of drugs. Each point is the mean of four separate experiments performed in triplicate.

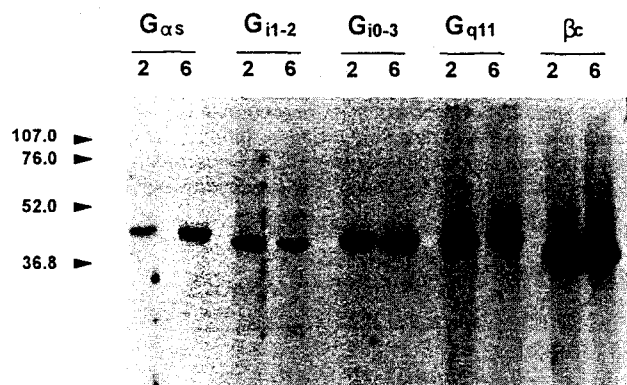


**Figure 6** Development postnatally of CTx-catalyzed ADP-ribosylation in rat pineal membranes. Pineal membranes from 2- and 6-week-old animals were incubated with  $1.5 \mu\text{M}$  [<sup>32</sup>P]NAD in the presence (+) or absence (-) of CTx as described in the Materials and Methods section. Molecular masses (kDa) are indicated. This experiment is representative of three others.

ribosylated material was quantitatively higher in pineal membranes from 6-week-old than from 2-week-old animals. When membranes were incubated with PTx (Fig. 7), a single 40 kDa band of similar intensity for young and adult rats was obtained. The presence of G<sub>s $\alpha$</sub> -proteins is necessary for the activation of adenylate cyclase by a  $\beta$ -adrenergic mediated mechanism. Therefore, the relatively low presence of these proteins in the pineal



**Figure 7** Development postnatally of PTx-catalyzed ADP-ribosylation in rat pineal membranes. Pineal membranes from 2- and 6-week-old animals were incubated with  $0.7 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ]NAD in the presence (+) or absence (-) of PTx as described in the Materials and Methods section. Molecular masses (kDa) are indicated. This experiment is representative of three others.



**Figure 8** Immunodetection of different G-protein subunits in pineal membranes of the developing rat (2- and 6-week-old). Membranes from rat pineal were separated by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose and immunoblotted with the specific antisera indicated. Molecular masses (kDa) are indicated. This experiment is representative of three others.

membranes from 2-week-old animals likely explains the low sensitivity of the gland to isoproterenol at that age.

#### Immunoblot analyses of $G_{\alpha}$ -subunits

Results were confirmed when immunoblots for different  $G_{\alpha}$ -subunits and  $G_{\beta}$  common were performed (Fig. 8). Analysis of  $G_{\alpha s}$  revealed that there was a marked difference between the levels of this constituent in pineals from 2- and 6-week-old rats. Both the 45 and 42 kDa proteins were relatively low in young rats, and increased at week 6. These differences were statistically confirmed by densitometry studies ( $P < 0.005$ ). On the contrary, the  $G_{\beta 1-2}$  subunit was higher in young compared with adults ( $P < 0.05$ ). Other proteins such as  $G_{\beta 3}$ ,  $G_{\gamma 11}$ , or  $G_{\beta}$  common exhibited similar bands at both ages. The results again suggest that the relative lack of sensitivity of

the pineal gland to isoproterenol early in the postnatal development may be explained by low levels of  $G_{\alpha s}$ .

#### Discussion

In this paper we studied why rat pineal NAT is relatively insensitive to isoproterenol in young rats compared with adult rats. We found that activation by isoproterenol of pineal cyclic AMP production and NAT activity is higher in adult than in 2-week-old rats. However, the effect of dibutyryl cyclic AMP, which enters the pinealocyte and duplicates the effect of cyclic AMP, on NAT activity was similar at both ages. Therefore, the lack of sensitivity of the pineal gland to isoproterenol was likely due to a membrane-related mechanism.

In previous *in vivo* and *in vitro* studies we reported that both  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor agonists stimulated pineal NAT and other enzymes, i.e. thyroxine 5'-deiodinase, early during development (Rubio *et al.* 1991a,b, 1993, Harmouch *et al.* 1994). In adult rats, isoproterenol is well known to be more effective than phenylephrine in stimulating NAT activity, but phenylephrine has a potentiating effect on the isoproterenol response (Klein *et al.* 1983). Moreover, phenylephrine, another  $\alpha_1$ -adrenergic receptor agonist, stimulated pineal NAT activity during both the day and at night in 2-week-old rats, while exhibiting no effect in adults. Methoxamine also activated NAT activity in young, but not in adult rats. On the other hand, the activation of pineal NAT activity in 2-week-old rats induced by the  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol was prevented by the  $\beta$ -adrenergic blocker propranolol, but not by prazosin. Nevertheless, the activation of pineal NAT induced by the  $\alpha$ -adrenergic agonist phenylephrine was prevented not only by the  $\alpha$ -adrenergic blocker prazosin, but also by propranolol (Rubio *et al.* 1993). These results suggested that the adrenergic receptor agonists acted in a non-specific manner by binding to relatively immature receptors (Rowe & Parr 1981). In the current paper, we studied the specificity of pineal  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in 2- and 6-week-old rats using highly specific radioligands for these receptors. We show herein that both  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors are highly specific at both ages, since the binding of the radioligand to their receptors could be displaced only by their corresponding agonists and antagonists. Therefore, their specificities or other binding characteristics cannot explain the relatively high sensitivity of rat pineal NAT to methoxamine and the low sensitivity to isoproterenol in young rats.

The current findings reveal differences between pineals from young and adult rats when several families of  $\alpha$  subunits of G-proteins were studied in pineal cell membranes. ADP-ribosylation and immunoblot studies showed clear differences in both 42 and 45 kDa forms of the  $G_{\alpha s}$ . Both forms exhibited low values in pineals from

2-week-old animals relative to levels in adult rats. This agrees generally with other studies indicating low values of the 42 kDa form early during postnatal development with no change in the 45 kDa form (Babila *et al.* 1992). In the present study, the later appearance of both  $G_{sa}$  forms is roughly similar to the time course of the potent activation of cyclic AMP production and NAT activity in adult rats when compared with young rats. This raises the possibility that there might be a functional relationship between the  $G_{sa}$  and the pineal response to isoproterenol.

Additional differences were found when  $G_{ia}$ -proteins,  $G_{qa11}$  or  $G_{\beta}$  common were analyzed.  $G_{ia}$  was studied using two antisera which detect  $G_{ia1-2}$  and  $G_{ia0-3}$ , respectively. While  $G_{ia1-2}$  was, unlike  $G_{sa}$ , lower in adult rats than in young rats, no differences were found in  $G_{ia0-3}$ . Although additional experiments are required, the low levels of  $G_{ia1-2}$  in pineals from adult rats and the capability of this protein to negatively regulate adenylate cyclase activity, might also participate in the increase in the sensitivity of the pineal gland to isoproterenol in adulthood.

$G_{qa11}$  belongs to the  $G_{qa}$  family and has been shown to activate phospholipase C (Lee *et al.* 1992, Hepler *et al.* 1993) in a manner that is insensitive to PTx. Members of this family couple to many types of receptors including muscarinic cholinergic, thromboxane  $A_2$ , bradykinin, angiotensin II, and  $\alpha_1$ -adrenergic (Mochizuki *et al.* 1995). We found no changes in  $G_{qa11}$  at the ages studied. Similar results were observed when  $G_{\beta}$  common was studied. This  $\beta$  subunit, which is common to the different families of G-proteins, did not exhibit changes during postnatal development in the pineal gland. Therefore, both  $G_{qa11}$  and  $G_{aq11}$  do not appear to be involved in the changes in the sensitivity of the rat pineal gland to isoproterenol during postnatal development.

In conclusion, the results presented suggest that the relative lack of sensitivity of rat pineal gland to  $\beta$ -adrenergic receptor agonists early in the postnatal development may be explained by the low levels of membrane  $G_{sa}$ , rather than to postreceptor-mediated mechanisms or changes in the characteristics of the  $\beta$ -adrenergic receptors on the pinealocyte membrane.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Direccin General de Investigacin Cientfica y Tcnica (PB 94-1425, PB 94-1434, and PM95-0159).

## References

- Babila T, Schaad NC & Klein DC 1992 Rat pineal  $G_{sa}$ ,  $G_{ia}$  and  $G_{oa}$ : relative abundance and development. *Brain Research* **572** 232-235.
- Brammer M, Binkley S, Enrico J & Duffy M 1981 The rise and fall of N-acetyltransferase *in vitro*: the influence of age. *Developmental Biology* **86** 256-258.
- Champney TH, Holtorf AP, Steger RW & Reiter RJ 1984 Concurrent determination of enzymatic activities and substrate concentrations in the melatonin synthetic pathway within the same pineal. *Journal of Neuroscience Research* **11** 59-66.
- Deguchi T 1973 Role of  $\beta$ -adrenergic receptors in the elevation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and incubation of serotonin N-acetyltransferase in rat pineal gland. *Molecular Pharmacology* **9** 184-187.
- Deguchi J & Axelrod J 1972a Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in the rat pineal gland. *Analytical Biochemistry* **50** 174-179.
- Deguchi J & Axelrod J 1972b Induction and superinduction of serotonin N-acetyltransferase by adrenergic drugs and denervation in rat pineal organ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **69** 2208-2211.
- Ehret M, Pevet P & Maitre M 1991 Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *Journal of Neurochemistry* **57** 1516-1521.
- Ellison H, Weller JL & Klein DC 1972 Development of a circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase. *Journal of Neurochemistry* **19** 1335-1341.
- Engel G, Hoyer D, Berthold R & Wagner H 1981 ( $\pm$ )(1)[ $^{125}$ I]iodo-cyanopindolol, a new ligand for beta-adrenoceptor: identification and quantitation of subclasses of  $\beta$ -adrenoceptor in guinea pig. *Archives of Pharmacology* **317** 277-285.
- Guerrero JM, Puig-Domingo M & Reiter RJ 1988 Thyroxine 5'-deiodinase activity in pineal gland and frontal cortex: Nighttime increase and the effect of either continuous light exposure or superior cervical ganglionectomy. *Endocrinology* **122** 236-241.
- Hakanson R, Lombard des Gouttes MN & Owman C 1967 Activities of tryptophanhydroxylase, dopa decarboxylase, and monoamine oxidase as correlated with the appearance of monoamines in developing rat pineal gland. *Life Sciences* **6** 2577-2585.
- Harmouch A, Guerrero JM & Osuna C 1994 Different sensitivity of rat pineal N-acetyltransferase to  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor agonists during development: *in vitro* studies. *Neuroscience Letters* **182** 303-305.
- Hepler JR, Kozasa T, Smrcka AV, Simons MI, Rhee SG, Stenveiss PC & Gilman AG 1993 Purification from Sf9 cells and characterization of combinant  $G_{qa}$  and  $G_{11a}$ . *Journal of Biological Chemistry* **268** 14367-14375.
- Illnerova H 1975 The effect of constant light and chemical sympathectomy on the development of serotonin N-acetyltransferase and monoamine oxidase activities in the rat epiphyses. *Physiol Bohemoslov* **24** 493-500.
- Kappers JA 1960 Innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Anatomical Record* **136** 220-221.
- Klein DC & Weller JL 1970 Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* **169** 1093-1095.
- Klein DC, Namboodiri MAA & Auerbach DA 1981 The melatonin rhythm generating system: Development aspects. *Life Sciences* **28** 1975-1986.
- Klein DC, Sudgen D & Weller JL 1983 Postsynaptic  $\alpha$ -adrenergic receptor potentiated the  $\beta$ -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **80** 599-603.
- Laakso HL, Hötönen T & Alila A 1995 Daytime dark exposure increases pineal melatonin in rat pups. *Journal of Pineal Research* **19** 22-30.
- Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage  $T_4$ . *Nature* **227** 680-688.
- Lee CH, Park D, Wu P, Rhee SG & Simon MI 1992 Members of the  $G_{qa}$  subunit gene family activate phospholipase C $\beta$  isozymes. *Journal of Biological Chemistry* **267** 16044-16047.
- Lytle LD, Hook KA & Torres G 1988 Maturational changes in rat pineal and neuronal mechanisms controlling its function. *Pineal Research Review* **6** 172-199.



- Machado CRS, Wragg LE & Machado ABM 1968 A histochemical study of sympathetic innervation and 5-hydroxytryptamine in the developing pineal body of the rat. *Brain Research* **8** 310–318.
- Mochizuki N, Urasawa K, Sanchez A & Insel PA 1995 Developmental regulation of the  $\alpha$ -subunit of  $G_q/G_{11}$  as determined by quantitative immunoblot analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **210** 246–252.
- Pozo D, Segura JJ, Carrero I, Guijarro L, Prieto JC & Calvo JR 1996 Characterization of adenylyl cyclase stimulated by VIP in rat and mouse peritoneal macrophage membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1312** 249–254.
- Reiter RJ 1985 Action spectra, dose–response relationships, and temporal aspects of light's effects on the pineal gland. *Annals of the New York Academy of Sciences* **453** 215–230.
- Reiter RJ 1991a Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews* **12** 151–179.
- Reiter RJ 1991b Melatonin: The chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology* **79** C153–C158.
- Reiter RJ, Rudeen PK, Banks AF & Rollag MD 1979 Acute effects of unilateral or bilateral superior cervical ganglionectomy on rat pineal N-acetyltransferase activity and melatonin content. *Experientia* **35** 691–692.
- Rowe V & Parr J 1981 Developmental changes in the stimulation of serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin synthesis in the rat pineal in monolayer culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **218** 97–102.
- Rubio A, Osuna C & Guerrero JM 1991a  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenergic mechanisms are involved in regulation of rat pineal type II thyroxine 5'-deiodinase activity during development. *Endocrinology* **128** 1661–1667.
- Rubio A, Osuna C, Jimenez J, Molinero P & Guerrero JM 1991b. *In vivo* activation of pineal N-acetyltransferase but not type II thyroxine 5'-deiodinase by phenylephrine in young rats. *Neuroscience Letters* **127** 13–15.
- Rubio A, Guerrero JM, Reiter RJ & Osuna C 1993 Involvement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase activity during development. *Endocrinology* **132** 393–398.
- Sugden D & Klein DC 1983 Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in neonatal and adult rats. *Journal of Neurochemistry* **40** 1647–1653.
- Sugden D & Klein DC 1984 Rat pineal  $\alpha_1$ -adrenoceptor: identification and characterization using [ $^{125}$ I]-2-[ $\beta$ (4-hydroxyphenyl)-ethylaminomethyl]tetralone. *Endocrinology* **114** 435–440.
- Sugden D & Klein DC 1985 Development of the rat pineal alpha1-adrenoceptor. *Brain Research* **325** 345–348.
- Tamarkin L, Reppert SM, Orloff DJ, Klein DC, Yellon SM & Goldman BD 1980 Ontogeny of the pineal melatonin rhythm in the Syrian (*Mesocricetus auratus*) and Siberian (*Phodopus sungorus*) hamster and in the rat. *Endocrinology* **107** 1061–1063.
- Tang PL & Pang SF 1988 The ontogeny of pineal and serum melatonin in male rats at mid-light and mid-dark. *Journal of Neural Transmission* **72** 43–53.
- Vanecek J & Illnerova H 1979 The regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity in newborn rats. *Developmental Biology* **68** 287–291.
- Vanecek J, Sugden D, Weller JL & 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.

Received 31 December 1996

Accepted 27 May 1997


Ahmed Harmouch

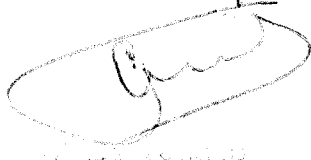
Regulación adrenérgica diferencial de  
la actividad N-Acetiltransferasa en glándula  
pituitaria de rata durante el desarrollo: Estudios "in vitro"  
APTO CON LAUDE

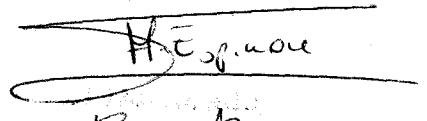
14

Mayo

77

  
1781 Harmouch

  
J. Martínez

  
H. Espinosa



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672262