

R. 18.718

TD 491

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 13 número 186 del libro
correspondiente. **22 SET. 1999**

Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis,

Ilham Bettahi



**ACCIONES DE LA MELATONINA EN
HIPOTÁLAMO
DE RATA MEDIADAS A TRAVÉS
DE LA INHIBICIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASA**

**TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
D^a ILHAM BETTAHI
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TD

Sevilla, 1999

D^a CARMEN OSUNA FERNÁNDEZ y **D. JUAN MIGUEL GUERRERO MONTÁVEZ**, Profesora y catedrático titular respectivamente del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN QUE: **D^a ILHAM BETTAHI**, Licenciada con Grado en Biología General, ha realizado bajo su conjunta dirección y en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla el trabajo titulado **“Acciones de la melatonina en hipotálamo de rata mediados a través de la inhibición de la óxido nítrico sintasa”**. Reuniendo la misma las condiciones necesarias para optar al grado de doctora.

Sevilla, 26 de julio de 1999

Vº Bº de los Directores

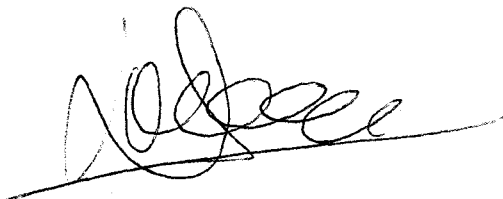
La interesada

D^a Carmen Osuna Fernández

Ilham Bettahi



D Juan Miguel Guerrero Montávez



A mi familia y a mis amigos

A mi madre

AGRADECIMENTOS

Es para mí una viva satisfacción expresar mi agradecimiento a mis Directores de Tesis, los profesores Carmen Osuna y Juan Miguel Guerrero, por sus inestimables sugerencias, ayuda y estímulo constante a lo largo de este trabajo; me han llevado de la mano por el camino de la investigación, para mí hasta entonces desconocido, y han sembrado en mí la inquietud para seguir progresando en él.

Agradezco también a los profesores Patrocino Molinero Hueso y Juan Ramón Calvo sus apoyos durante la realización del trabajo.

A los miembros del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular especialmente a mis compañeros y amigos doctorandos que siempre me han prestado su colaboración y apoyo durante la realización del trabajo.

Por último y muy especialmente a mi madre por su ayuda moral y económica, ella ha soportado con estoicismo los muchos años que he dedicado a este trabajo. Tengo la seguridad de que sin la ayuda de mi madre y de mis hermanos me hubiera sido muy difícil venir aquí a estudiar y a realizar esta ardua tarea.

INTRODUCCIÓN.....	1
1- GLANDULA PINEAL.....	2
1.1- Estructura y anatomía de la glándula pineal.....	2
1.2- Biosíntesis, secreción y metabolismo de hormonas pineales.....	4
1.3- Melatonina.....	4
1.4- Factores endógenos y ambientales que modulan.....	9
la secreción de melatonina.	
<i>a-Iluminación ambiental.....</i>	<i>9</i>
<i>b-Estación.....</i>	<i>9</i>
<i>c-Edad.....</i>	<i>9</i>
1.5- Funciones de la glándula pineal.....	10
<i>a-Fotoperíodo y sistema circadiana.....</i>	<i>10</i>
<i>b-Reproducción estacional.....</i>	<i>10</i>
1.6- Receptores de melatonina.....	11
1.7- Caracterización de receptores.....	13
1.8- Receptor nuclear.....	14
1.9- Transducción de señalización de la melatonina.....	16
1.10- Unión de melatonina a proteínas reguladoras citoplasmáticas.....	17
1.11- Radicales libres.....	17
<i>a- Radicales libres de oxígeno.....</i>	<i>17</i>
<i>b- Especies de oxígeno.....</i>	<i>18</i>
<i>c- Producción de radicales libres.....</i>	<i>19</i>
<i>d- Protección contra radicales libres.....</i>	<i>20</i>
<i>e- Toxicidad de radicales libres.....</i>	<i>21</i>
<i>f- Melatonina como antioxidante.....</i>	<i>22</i>
1.12- Sistema inmune y melatonina.....	24
2- GLANDULA HIPOTALAMICA.....	28
2.1- Fisiología del hipotálamo.....	28
2.2- Funciones endocrinas.....	31
2.2.1- Hormonas liberadora de LH (LHRH).....	32
2.2.2- Regulación de la secreción y liberación de LHRH.....	35
2.3- Funciones vegetativas.....	36
2.4- Óxido nítrico.....	37
2.4.1- Metabolismo del NO.....	38
2.4.2- Regulación de la síntesis del óxido nítrico.....	41
2.4.3- ON como molécula efectora.....	41
2.4.4- ON como molécula mensajera.....	43
2.4.5- Regulación del flujo sanguíneo cerebral.....	46
2.4.6- Acción neurodegenerativa.....	47
2.4.7- Inervación autonómica del músculo liso.....	48



2.5- prostaglandinas.....	49
2.5.1- Estructura química y biosíntesis de las prostaglandinas.....	50
2.5.2- Biosíntesis de las prostaglandinas.....	51
a- <i>Vía de la ciclooxigenasa</i>	51
b- <i>Vía de la lipooxigenasa</i>	52
2.5.3- las prostaglandinas y el AMPc.....	52
2.5.4- Efectos de las prostaglandinas.....	54
sobre las funciones fisiológicas.	
a- <i>Sistema nervioso y cerebro</i>	54
b- <i>Sistema respiratorio</i>	54
c- <i>Sistema gastrointestinal</i>	54
d- <i>Sistema reproductor</i>	55
e- <i>Sistema cardiovascular</i>	55
f- <i>Sistema hematológico</i>	55
g- <i>Riñon</i>	55
OBJECTIVOS.....	56
MATERIAL Y MÉTODOS.....	58
1- Animales de experimentación.....	59
2- Determinación de la actividad enzimática de la NOS.....	60
2.1- Fundamento del análisis.....	60
2.2- Reactivos.....	60
a- <i>Tampón de homogenización</i>	60
b- <i>Tampón de ensayo de la actividad de la NOS</i>	61
c- <i>Tampón de ensayo de la actividad de la NOS</i>	61
<i>usando [EGTA].</i>	
d- <i>Tampón para detener la reacción (tampón de parada)</i>	61
e- <i>NADPH</i>	61
f- <i>Preparación de las columnas</i>	61
<i>cromatográficas (columna de Dowex).</i>	
2.3- Procedimiento.....	62
2.4- Cuantificación.....	62
3- Determinación de proteínas.....	64
3.1- Fundamento del análisis.....	64
3.2- Rectivos.....	64
a- <i>Solución A</i>	64
b- <i>Solución B</i>	64
c- <i>Solución de Folin-C</i>	64
d- <i>Proteína estandar</i>	64
3.3- Procedimiento.....	65
3.4- Cuantificación.....	65
4- Cultivo de la glandula hipotálamica.....	66
4.1- Extracción del hipotalámo.....	66
4.2- Cultivo del hipotálamo medio basal.....	66

4.3- Procedimiento general del cultivo.....	66
5- Determinación de la prostaglandina E₂.....	68
5.1- Fundamento del análisis.....	68
5.2- Reactivos.....	68
5.3- Procedimiento.....	68
5.4- Determinación de PGE ₂ por ELISA.....	68
5.5- Análisis de los resultados.....	69
5.6- Cuantificación.....	69
6- Determinación del AMPc.....	70
6.1- fundamento del análisis.....	70
6.2- Reactivos.....	70
6.3- Procedimiento.....	71
6.4- Análisis de los resultados.....	71
6.5- Cuantificación.....	72
7- Determinación de LHRH.....	73
7.1- Fundamento del análisis.....	73
7.2- Reactivos.....	73
7.3- Procedimiento.....	74
7.4- Análisis de los resultados.....	74
7.5- Cuantificación.....	75
RESULTADOS.....	76
1- Estudios del efecto de melatonina sobre	77
la actividad NOS en el hipotálamo de rata	
1.1- Estudios in vitro.....	77
1.2 - Estudios en vivo.....	78
2- Efecto de la melatonina sobre la producción de	87
PGE₂ t AMPc inducida por norepinefrina en el hipotálamo de rata	
2.1- Efecto de la norepinefrina y melatonina	87
sobre la producción de PGE ₂ y AMPc.	
2.2- Efecto de concentraciones crecientes	87
de melatonina sobre la producción de PGE ₂ y AMPc	
2.3- Efecto de la norepinefrina, melatonina	88
y nitroprusiato solos o combinados sobre	
la producción de PGE ₂ en el hipotálamo de rata	
2.4- Efecto de la norepinefrina melatonina.....	88
y nitroprusiato solos o combinados sobre	
la producción de AMPc en el hipotálamo de rata	
3- Efecto de la melatonina, CGP 52608 y S 20098.....	95
sobre la liberación de LHRH inducida	
por norepinefrina en el hipotálamo de rata	
3.1- Efecto de la melatonina sobre la liberación	95
de LHRH inducida por norepinefrina	
3.2- Efecto de la melatonina a concentraciones	95
crecientes sobre la liberación de LHRH	
inducida por norepinefrina en el hipotálamo de rata	

3.3- Efecto de la melatonina, CGP 5260895 y S 20098 sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina	
3.4- Efecto inhibitor de la melatonina,.....96 CGP 52608 y S 20098 sobre la producción de PGE ₂ inducida por norepinefrina	
3.5- Efecto de la melatonina, CGP 5260896 y S 20098 sobre la actividad NOS en el hipotálamo de rata	
DISCUSIÓN102	
1- Melatonina.....103	
2- Óxido nítrico.....103	
3- Hormona reguladora de la hormona luteinizante.....104	
4- Efecto de la melatonina sobre el hipotálamo.....105	
CONCLUSIONES113	
BIBLIOGRAFÍA115	

ABREVIATURAS

AADA	:	L-aminoácido aramático decarboxilasa
Ac	:	anticuerpo
ACTH	:	hormona corticotropa
ADH	:	hormona antidiurética
ADNc	:	ADN copia
AMPA	:	alfa-amino-hidroxi-metil-isoxazol propionato
AMPc	:	adenosil monofosfato cíclico
ARNm	:	ácido ribonucléico mensajero
ATP	:	adenosil trifosfato
BH ₄	:	tetrahidrobiopterina
BSA	:	albumina serica bovina
CaM	:	calmodulina
CAT	:	catalasa
CRF	:	Factor liberador de corticotrofina
CRF	:	factor liberador de corticotrofina
EDRF	:	factor relajante derivado del endotelio
EGTA	:	ácido etilén glicol aminoetil éter tetraacético
ELISA	:	ensayo radioinmunoenzimatico
FAD	:	flavina adenosina dinúcleotido
FSH	:	hormona estimuladora de los folículos
FSH	:	hormona estimuladora de los folículos
GABA	:	ácido γ -aminobutirico
GCS	:	ganglio cervical superior
GH	:	hormona gonadotrofica
GMPc	:	guanosil monofosfato cíclasa
GPx	:	glutación peroxidasa
GSH	:	glutación reducido
GSSG	:	glutación oxidado
GTP	:	guanosil trifosfato
H ₂ O ₂	:	peróxido de hidrógeno
HCl	:	ácido cloridrico
HEPES	:	ácido hidroxietil-1-piperazín etanosulfónico
HIOMT	:	hidroxinidol-O-metiltransferasa
IFN- γ	:	interferón
Il	:	interleukina
Kd	:	constante de equilibrio
LH	:	hormona luteinisante
LHRH	:	hormona reguladora de hormona
leuteinizante		
MDA	:	malonil aldehido
MEL	:	melatonina
MLT	:	melatonin
NA	:	mononucleotido fosfato
		noradrenalina

NADPH	:	nicotinamida adenina
NAT	:	N-acetiltransferasa
NMAD	:	N-metil-D-aspartado
NO	:	óxido nítrico
NOS	:	óxido nítrico síntasa
NP-Y	:	neuropéptido Y
NSQ	:	núcleo supraquismático
O ₂	:	oxígeno
OH·	:	radical hidroxilo
O ₂ ⁻	:	anión superóxido
PD	:	pars distalis
PIF	:	factor inhibidor de prolactina
PKA	:	protein kinasa A
PKC	:	protein kinasa C
PLC	:	fosofolipasa C
PRL	:	prolactina
PT	:	pars tuberalis
RIA	:	radioinmunoensayo
RO·	:	radicales aloxi
ROO·	:	peroxi
ROOH	:	hidroperóxido
RZR	:	receptor Z retinoico
SNC	:	sistema nervioso central
SOD	:	superóxido dismutasa
TBA-RP	:	ácido tiobarbitúrico
TPH	:	triptofano hidroxilasa
TRH	:	hormona hipotalámica liberadora de hormona hipofisaria
TRH	:	hormona reguladora del tiroides
TSH	:	hormona estimulante del tiroides
VIP	:	polipéptido intestinal vasoactivo

INTRODUCCIÓN



1- GLANDULA PINEAL

1.1- Estructura y anatomía de la glándula pineal

Escondida en el cerebro, excluida del tercer ventrículo en la porción postero-superior del diencéfalo y libre de todo contacto con el líquido cefalorraquídeo, la glándula pineal o cuerpo pineal (epifisis cerebri o corpus conarium) ha sido una formación enigmática que ha llamado poderosamente la atención de filósofos, anatomistas, fisiólogos, endocrinólogos y clínicos. Considerada por los clásicos de la medicina greco-romana como una estructura capaz de materializar y vehicular “el flujo del pensamiento” desde el cuarto ventrículo, pasa a ser con René Descartes, el lugar de asiento de sus “res cogitans” (pensamiento, psiques) con su “res extensa” (materia) (Descartes, 1662).

Durante todo el siglo XVIII permanece en el olvido hasta el nacimiento de la presente centuria y han bastado unas décadas, especialmente la última, en la que el desarrollo del conocimiento en el plano de la anatomía macro y microscópica, de la bioquímica, de la fisiología experimental y de la patología han suministrado suficientes datos para que esta extraña estructura comience a tener para nosotros un significado funcional claro de calidad endocrina (Kernohan y cols, 1962; Kitay y cols, 1954; Thieblot y cols, 1955; Tirausse y cols, 1967).

Desde los estudios de Le Gross Clarck (1940), Hartman (1957) y Kappers (1965), se ha demostrado que los ganglios cervicales son los principales inervadores cerebrales de la glándula pineal, bien directa o indirectamente.

Wurtman y cols (1958), determinaron las características más representativas de la morfología pineal en ciertas especies, como la lamprea, rana, pez óseo, lagarto, rata y hombre. Desde los trabajos de los años 60 y 70, la glándula pineal está considerada como un transmisor neuroendocrino. En este sentido se han multiplicado las publicaciones sobre aspectos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos de esta glándula, durante los últimos años. (Bloom, 1973; Reiter, 1981,1991).

Se encuentra en la malla conectiva de la glándula pineal: células gliales y un tipo celular especial denominado pinealocito, pineocito o célula epifisaria (Del

Río Ortega, 1932; Schremenberg y cols, 1965), el cual constituye el elemento con actividad secretora (Bargmann y cols, 1943; Quay, 1965; De Roberts, 1961; Pellegrino De Iraldi, 1963).

Filogenéticamente los pinealocitos proceden de las células fotorreceptoras presentes en la pineal de peces y anfibios, elementos puramente sensoriales en los que la actividad circadiana se origina en un marcapasos intracelular, sincronizándose con el ciclo nictameral por la acción directa de la luz sobre su polo receptor. La célula pineal fue perdiendo la función sensorial durante el curso de la evolución y desarrollando progresivamente la actividad secretora. De esta manera se convirtió en un fotorreceptor modificado y rudimentario en las aves, en que la actividad rítmica está generada en un marcapasos endógeno situado en el sistema nervioso central (SNC) (Fig1-1).

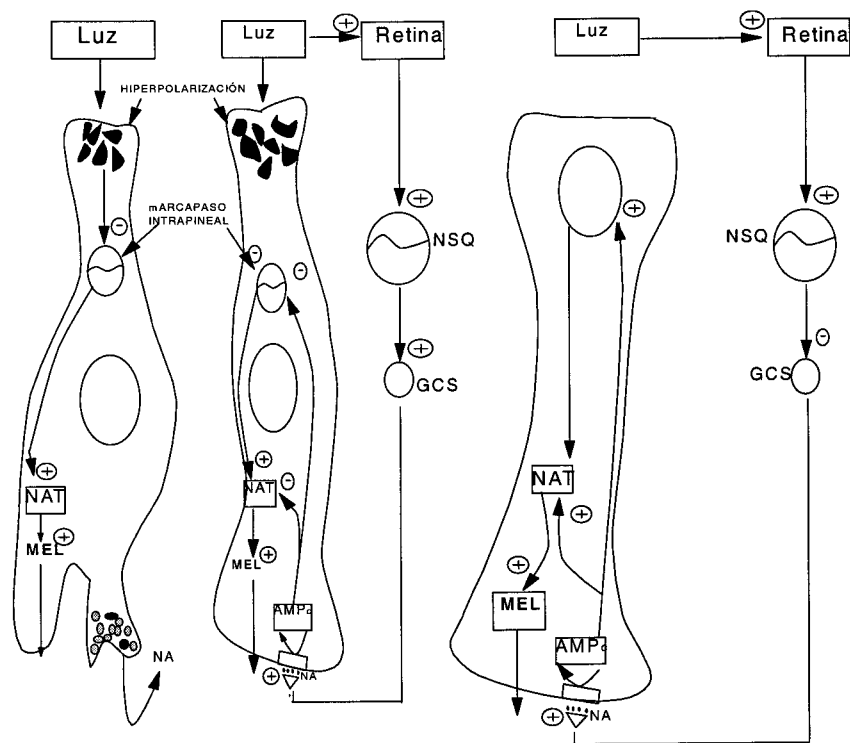


Fig 1-1: Regulación fotoperiódica de la actividad de las células pineales en diferentes especies. A: en los peces, anfibios y algunos reptiles, B: en los aves Y C: en los mamíferos. NAT: N-acetiltransferasa; NSQ: núcleo supraquiasmático; NA: Noradrenalina; MEL: melatonina; GCS: ganglio cervical superior; AMP_c: AMP ciclico.

En los mamíferos, el pinealocito ha perdido completamente su carácter sensorial, mostrándose ya como una célula endocrina típica. Se han descrito varios tipos de compuestos que parecen tener actividad hormonal, y que se han obtenido de extractos pineales (Reiter y cols., 1977) entre ellos indolaminas del tipo de melatonina como serotonina, 5-hidroxi-indol-acético, 5-metoxi-triptamina, 5-metoxitriptofol, etc.

1.2- Biosíntesis, secreción y metabolismo de hormonas pineales

En la glándula pineal de los mamíferos se han descrito muchas sustancias y de estructura química muy variada incluyendo a la arginina-vasotoxina, vasopresina y la oxitocina, así como sus respectivas neurofisinas, miembros de la familia proopiomelanocortina, componentes del sistema renina-angiotensina y diversos neuropéptidos como la hormona reguladora del tiroides (TRH), la hormona reguladora de hormona leutenizante (LHRH), somatostatina, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) o neuropéptido Y (NP-Y).

En cualquier caso, las sustancias cuya producción en la pineal ha sido concluyentemente demostrada son indolaminas, sintetizadas a partir del triptófano circulante, de las que la N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) constituye el compuesto más aceptado como secreción hormonal.

1.3- Melatonina

Es el compuesto característico y definitorio de la pineal y de otros órganos que también la producen aunque en menor medida, entre ellos la retina (Leino y Airaksinen, 1985; Wiechmann, 1986; Pang y Allen, 1986), la glándula harderiana intra-orbital (Bubenik y cols, 1976a), las glándulas lacrimales extraorbitales (Mhatre y cols, 1988), el tracto gastro intestinal (Quay y cols, 1976), el sistema nervioso central (Bubenik y cols, 1974) y los hematíes (Rosengarten y cols, 1972). Químicamente es la N-acetil-5-metoxitriptamina. Fue aislada primeramente por Lerner (1957), de la pineal de la rana y del buey. Posteriormente, Wurtman y cols (1964) la han identificado en el pinealoma humano.

La síntesis de melatonina comienza con la captación del aminoácido triptófano circulante (Shein y cols, 1967; Wurtman y cols, 1968), probablemente

mediante un mecanismo de transporte activo bajo control adrenérgico (Redburn y cols, 1989). Una vez en el pinealocito, el triptófano es hidroxilado en posición 5 por acción de la triptófano hidroxilasa (TPH, E.C.1.14.16.4). Los estudios sobre los mecanismos que regulan la actividad TPH son escasos debido a la gran labilidad e inestabilidad de la enzima. Se ha descrito que la actividad TPH se puede regular por factores ambientales, como el fotoperíodo, y por mecanismos de fosforilación. La regulación por la luz de la actividad TPH de la glándula pineal ha sido ampliamente estudiada, encontrándose en todas las especies un ritmo diario de actividad con sus mayores valores durante la fase oscura del fotociclo (Shibuya y cols, 1978; Sitaran y cols, 1978; Erhet y cols, 1991; Klein y cols, 1970; Wilkinson y cols, 1977). Esta enzima produce el 5-hidroxitriptófano, el cual es convertido en 5-hidroxitriptamina (serotonina) por acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADA, E.C. 4.1.28). La concentración de serotonina presenta variaciones circadianas en la mayoría de las especies, con niveles más elevados durante las horas de luz y menores durante las horas de oscuridad, probablemente como resultado de cambios en su tasa de metabolización.

La reacción de transferencia del grupo acetilo procedente del acetil-CoA a la serotonina es llevada a cabo por el enzima N-acetiltransferasa o NAT, enzima activada por el aumento de AMPc (Klein, 1978) (E.C.2.3.1.87; arilalkilamina acetil-CoA. N-acetiltransferasa). En la mayor parte de los mamíferos, la activación nocturna de la NAT se produce por un aumento en la actividad de los terminales postganglionares simpáticos. La noradrenalina liberada interacciona con receptores beta-1 en la membrana del pinealocito (Vanecek y cols, 1985) y causa la activación de la adenilato ciclasa a través de una proteína reguladora G, con lo que aumenta la producción intracelular de AMP_c y se produce la inducción o activación de la NAT, acelerándose la conversión de serotonina en N-acetilserotonina. Aunque los mecanismos moleculares implicados no son aún bien conocidos, se piensa que el AMPc activa una proteincinasa dependiente del mismo e inicia la transcripción de un mRNA que, probablemente, codifica la síntesis de nuevas moléculas de NAT o, alternativamente, la producción de una proteína activadora de NAT. Adicionalmente, la noradrenalina interacciona con receptores alfa-1 (Sugden y Klein, 1984; Rubio y cols, 1991, 1993), estimulando

la entrada de calcio (Ca^{2+}) al pinealocito (Sugden y cols, 1987) y la producción de diacilglicerol a partir de la hidrólisis del fosfatidilinositol, lo que lleva a la translocación y activación de una proteincinasa C (PC). Probablemente esta última estimula la fosforilación rápida de algún componente del sistema, potenciando la acción beta-adrenérgica. Además de estos mecanismos adrenérgicos, en la pineal de diversas especies se ha demostrado la presencia de ciertos neuropéptidos, como el VIP (Chik y cols, 1988; Kaku y cols, 1983) y el NPY, que podrían ser coliberados con la noradrenalina de los terminales simpáticos y contribuir a una modulación de la estimulación adrenérgica (Fig 1-2).

NAT es la enzima reguladora de la vía biosintética de la melatonina y está localizada en el citoplasma (Weissbach, 1961) constituyendo el paso limitante en la síntesis de melatonina; presenta un marcado ritmo circadiano en todas las especies estudiadas, con niveles máximos de actividad durante las horas de oscuridad (Klein y cols, 1970; Hammy y cols, 1980; Besharse y cols, 1983; Olces y cols, 1989). Finalmente, la N-acetilserotonina es convertida en melatonina por acción de la hidroxinidol-O-metiltransferasa (HIOMT; E.C.2.1.1.14, S-adenosil-1-metionina: N-acetilserotonina-O-metiltransferasa) (Axelrod, 1965; Illnerova, 1983; Klein, 1971; Voisin, 1984), enzima que se encuentra en unos pocos órganos, además de la glándula pineal, como la retina, los eritrocitos, la glandula harderiano de los roedores y el epitelio intestinal. Es un enzima citosólico perteneciente a la familia de las metiltransferasas, que transfiere un grupo metilo del cofactor S-adenosil-metionina a una molécula aceptora (Zawilska y Nowak, 1992). La HIOMT está influenciada en su actividad por el medio ambiente y por la presencia de catecolaminas (Axelrod, 1968). Su actividad se puede modificar por compuestos que contengan grupos disulfuros, al igual que la NAT, como puromicina y actinomicina D (Wurtman y Axelrod, 1968; Sugden y Klein, 1984). La HIOMT no parece jugar un papel importante en la regulación del ritmo de melatonina, sin embargo, controla su nivel máximo de producción cuando la NAT se encuentra activada (Ebadi, 1984; Sugden, 1989) (Fig 1-3).

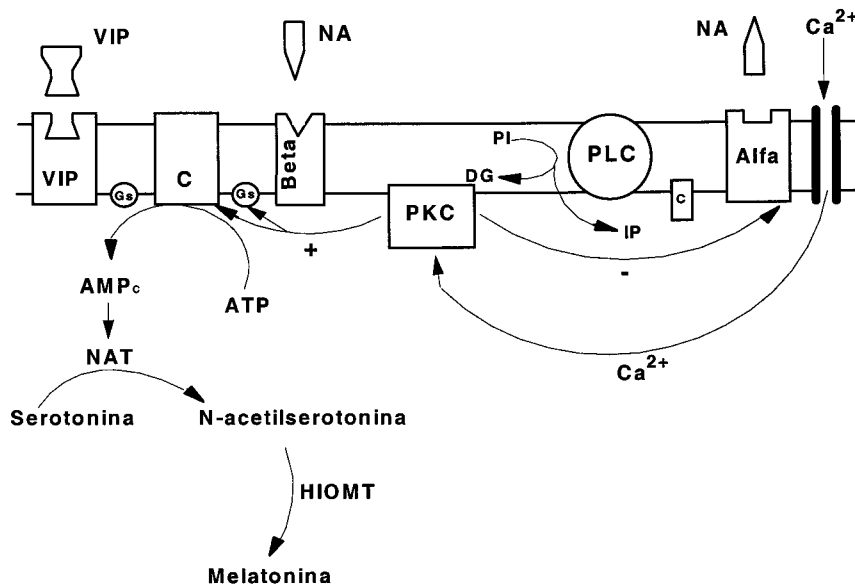


Fig 1-2: Mecanismo de transducción implicados en la síntesis de melatonina en el pinealocito. C, adenilato ciclasa; DG, diacilglicerol; GS, protein-G estimuladora; IP, inositol fosfato; PLC, proteinlipasa-C; PKC, proteinkinasa dependiente de AMPc; PKC, proteinkinasa-C; R_α, α₁-adrenoceptor; R_{β1}, β₁-adrenoceptor; R-VIP, receptor de VIP.

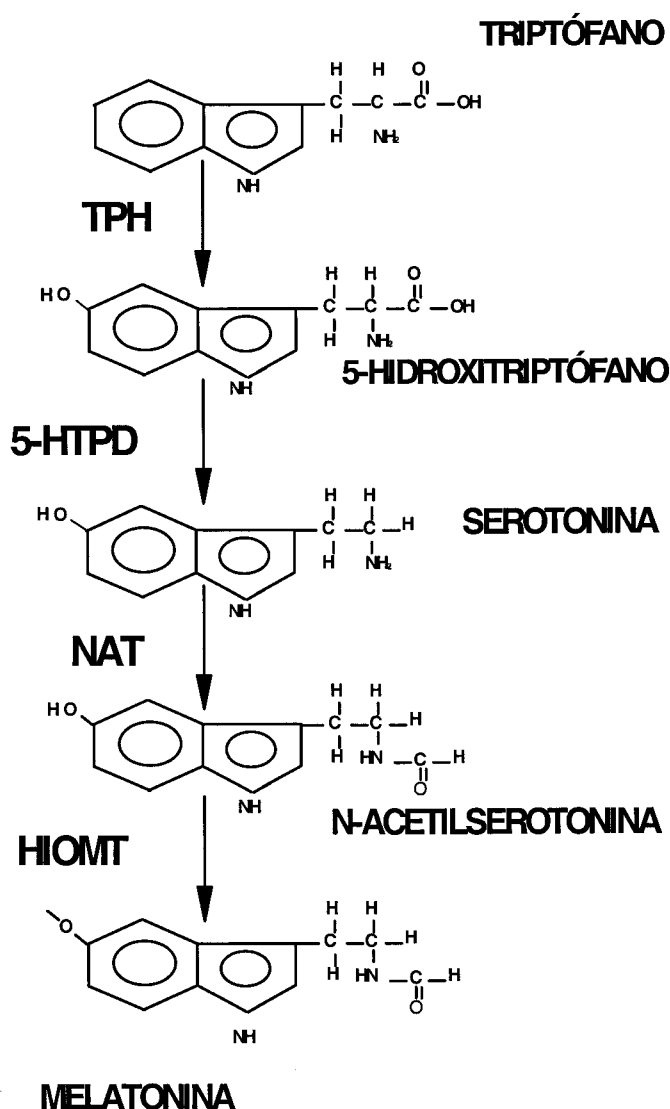


Fig 1-3: Ruta de síntesis de melatonina en el pinealocito.

Una vez que se produce la melatonina, ésta abandona rápidamente la glándula, principalmente hacia la circulación sistémica y hacia otros fluidos biológicos, como el líquido cefalorraquídeo (Reiter, 1986). Una vez en la sangre, la melatonina se une a la albúmina en un 60-70% y el resto circula libremente (Pardrige y cols, 1980). Su vida media en sangre es corta (10-40 min) siendo aún menor en el sistema nervioso central. La mayor parte de la melatonina circulante es inactiva mediante conversión hepática a 6-hidroximelatonina, la cual es excretada en la orina en forma de compuestos sulfatados (75 %) o glucurónidos (5 %).

1.4- Factores endógenos y ambientales que modulan la secreción de melatonina

a-Iluminación ambiental

Existen ligeras diferencias en el patrón de secreción nocturna de melatonina entre las distintas especies. En la rata, este ritmo desaparece si se somete a los animales a iluminación continua, gangliectomía cervical superior o destrucción del NSQ, y se hace independiente del control fotoperiódico si se los somete a enucleación bilateral o se les mantiene en oscuridad continua.

En el hombre, existen marcadas diferencias inter-individuales en la amplitud, fase y cantidad total de melatonina secretada pero una gran constancia en el patrón de cada individuo.

En sujetos ciegos, que carecen por tanto del efecto sincronizado de la luz, el ritmo de melatonina se presenta con un periodo algo mayor de 24 horas.

En individuos normales, el ritmo de melatonina puede ser readaptado a un nuevo ciclo luz-oscuridad si se invierte la fase de iluminación, si bien se necesitan varios días para que el pico de melatonina se asocie de nuevo con la fase oscura. Es posible que ese periodo de readaptación sea el responsable, en parte, de las manifestaciones que se producen al trasladarse de latitud en un vuelo transoceánico (Síndrome de “jet lag”)(Arendt y cols, 1987).

b- Estación

En roedores y rumiantes el alargamiento en la duración de la noche debido a la estación va acompañado de periodos más largos de melatonina elevada. En el caso del hombre y otras especies, los estudios son escasos, pero también se ha descrito un ritmo circanual en los niveles plasmáticos de melatonina, con valores más altos durante los meses de invierno y verano e inferiores durante la primavera y otoño (Herbert y cols, 1978; Hoffmann, 1965; Reiter, 1973; Robinson y cols, 1988; Yeates, 1949).

c- Edad

La secreción nocturna de melatonina presenta importantes cambios a lo largo de la vida, tanto en el hombre como en los animales experimentales estudiados. En la especie humana, los niveles nocturnos de melatonina en plasma

aumentan desde el nacimiento hasta la pubertad, probablemente como resultado de la maduración de los mecanismos neuronales que controlan la actividad pineal, para descender en dos fases: una gradual desde la adolescencia a la edad adulta, en que se estabiliza, y otra en la edad avanzada, en que la concentración plasmática de melatonina es muy reducida. Aunque no ha sido posible determinar la causa directa de estas variaciones, se ha especulado con la posibilidad de que las dos fases de descenso estén relacionadas con la pubertad y el envejecimiento respectivamente.

1.5- Funciones de la glándula pineal

a- Fotoperíodo y sistema circadiano

En peces, anfibios y reptiles la pineal actúa como un transductor foto y termo-neuroendocrino, adecuando los ritmos internos a los ambientales. En roedores, la melatonina ejerce una función sincronizadora, actuando sobre diversos osciladores endógenos, y quizá, directamente sobre el NSQ. En primates y humanos los conocimientos son escasos, pero se ha comprobado que la administración de melatonina exógena es capaz de sincronizar el ciclo sueño-vigilia en sujetos ciegos, así como aminorar los síntomas originados tras los vuelos transoceánicos. Por otra parte, se ha sugerido que la melatonina circulante en la leche materna, serviría como una señal química por medio de la cual se sincronizaría el reloj biológico endógeno, antes de que se desarrollen los mecanismos cronobiológicos individuales (Illnerova y cols, 1993; Yellon y cols, 1987).

b- Reproducción estacional

En diversas especies, tanto in vivo como in vitro, la administración de melatonina es capaz de afectar al eje gonadal a todos sus niveles, incluyendo la liberación hipotálmica de GnRH (Bittman y cols, 1985). La respuesta de los gonadotrofos hipofisarios, la secreción de gonadotropinas y prolactina, la síntesis de esteroides gonadales o la respuesta de los órganos diana periféricos. Aunque los efectos más comúnmente observados son de carácter inhibitor, en realidad dependen en gran medida de la especie, así como de la hora y pauta de administración.

Muchos mamíferos han desarrollado mecanismos biológicos generadores de ciclos anuales de fertilidad e infertilidad. Este sistema de reproducción garantiza que el nacimiento de los individuos se produzca en aquella época del año en que la disponibilidad de alimento y las condiciones ambientales son óptimas para la supervivencia. Los mamíferos estacionales se han clasificado en reproductores de días largos (como el hámster o el hurón) y reproductores de días cortos (como el ciervo y la oveja) (Reiter, 1973; Yeates, 1949), dependiendo de que sus gónadas sean activadas por el aumento o la disminución de la duración de un fotoperiodo (Bittman y cols, 1985). En estas especies la pinealectomía bloquea los efectos de la luz sobre la función gonadal (Herbert y cols, 1978; Hoffman y cols, 1965; Kennaway y cols, 1987).

Estudios empleando la microimplantación o microinyección de melatonina a diversas zona del cerebro sugieren que la melatonina actúa sobre el hipotálamo, probablemente en la zona supraquiasmática y/o medio basal del mismo (Badura y cols, 1992; Glass y cols, 1981; Glass y cols, 1982; Lincoln y cols, 1995; Lincoln y cols, 1995; Maywood y cols, 1995).

1.6- RECEPTORES DE MELATONINA

Los efectos de la melatonina están mediados por la alta afinidad específica de sus receptores. Estos receptores se han identificado y caracterizado en un gran número de tejidos *in vitro* por autoradiografía, y por ensayos convencionales usando [¹²⁵I]iodomelatonina como ligando aunque el modelo de su distribución varía de unas especies a otras. (Dubocovich y cols, 1987; Morgan y cols, 1994; Vanecek y cols, 1987; Weaver y cols, 1988; Williams y cols, 1988).

En mamíferos se ha demostrado una distribución muy discreta de los receptores de melatonina mientras que en vertebrados no mamíferos, dicho receptores son mucho más abundantes (Badura y cols, 1992; Rivkees y cols, 1989; Vanecek y cols, 1987). Específicamente, en la mayoría de las especies de mamíferos el receptor de melatonina de alta afinidad está presente en pars tuberalis (PT) de la pituitaria (Williams y cols, 1988) y en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Vanecek, 1988; Weaver y cols, 1989; Williams y cols, 1988). La unión específica se encuentra frecuentemente en la zona proóptica medial, hipotálamo anterior, el núcleo dorso medial y ventromedial del

hipotálamo, la parte anterior de la pars distalis (PD) de la pituitaria paraventricular y anteroventricular del núcleo talámico, el hipocampo (Lindroos y cols, 1993; Vanecek y cols, 1989), la corteza cerebral (Deveson y cols, 1992; Ducan y cols, 1989; Helliwell y cols, 1992; Siuciak y cols, 1990; Stankov y cols, 1991; Weaver y cols, 1989; Williams, 1989; Williams y cols, 1989), la zona postretina y retina (Bittman y cols, 1990; Blazynski y cols, 1991).

Se ha detectado una relativa abundancia de interacción de [¹²⁵I]iodomelatonina en el cerebro humano. La interacción específica está presente no solamente en el SNC sino también en el cerebelo, especialmente en la zona externa de la capa molecular, y mitad del cerebro, pons y la corteza cerebral (Reppert y cols, 1988; Yuan y cols, 1991). La presencia de la interacción de [¹²⁵I]iodomelatonina saturable está descrita también en las arterias del polígono de Willis, arteria caudal y en el bazo de varios mamíferos (Niles, 1989; Viswanathan, 1990; Yu y cols, 1991).

La distribución más abundante de receptores de melatonina se descubrió en los vertebrados inferiores, especialmente en la estructura visual, auditiva y en el sistema limbico (Brooks y cols, 1992; Cassone y cols, 1995; Cozzi y cols, 1993; Ekstrom y cols, 1992; Martinoli y cols, 1991; Rivkees y cols, 1989; Wiechmann y cols, 1991, 1994).

En muchos pájaros, reptiles, anfibios y peces la interacción de [¹²⁵I]iodomelatonina se encontró en la retina, hipotálamo, el tálamo y núcleo mesencefálico y lobulo paraolfatorio.

La interacción más clara, se observó en el sistema auditivo del pollo y el cerebro de carpa (Cassone y cols, 1995; Ekstrom y cols, 1992; Martinoli y cols, 1991). Las células que contienen el receptor de melatonina son desconocidas en la mayoría de los casos. Los resultados sugieren que el receptor de melatonina no se localiza en las células retinoreceptoras en la parte ventrolateral de núcleo, pero puede ubicarse sobre las células vasopresinérgicas del SNC medio basal (Shibata y cols, 1992).

En la retina, la unión específica de melatonina se ha encontrado en el interior de la capa plexiforme (Blazynski y cols, 1991; Laitinen y cols, 1990; Wiechmann y cols, 1991, 1994) que contiene importantes conexiones sinápticas (entre células amacrinas y células ganglionares). Además, los receptores de

melatonina pueden estar localizados en las células neuronales. Esta hipótesis está apoyada por el efecto inhibitor de melatonina sobre la producción AMPc inducida por la forskolina en un cultivo glial de fotorreceptores y neuronas procedentes de la retina de pollo (Iuvone y cols, 1994). Otros resultados indirectos sugieren la localización de receptores también en otros tejidos; por ejemplo, la melatonina inhibe la liberación de LH y FSH estimulada por GnRH en el cultivo de células pituitarias (Martin y cols, 1976; Martin y cols, 1982; Vanecek y cols, 1992), por lo que es probable que el receptor esté presente en el gonadotrofo. También se ha demostrado la presencia de receptores de melatonina en los melanóforos por clonación de este receptor (Ebisawa y cols, 1994).

1.7- CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES

Los estudios indican que el receptor de melatonina está en la membrana asociado y acoplado a las proteínas G (Laitinen y cols, 1990; Laitinen y cols, 1990; Morgan y cols, 1989; Rivkees y cols, 1989). La constante de disociación (Kd) del receptor está en el rango de 20-200 pM. Los receptores no acoplados a las proteínas G, tienen una afinidad menor y pueden ser inducidos por GTP o su análogo no hidrolizable, aunque pueden considerarse también como resultado de un proceso normal de señalización afectados por las condiciones del ensayo: congelación de los tejidos o algo espontáneo (Chong y cols, 1991; Dubocovich, 1991; Morgan y cols, 1989; Rivkees y cols, 1989; Sugden y cols, 1991). En células naturales, se ha descrito un subtipo farmacológico del receptor de melatonina denominado ML-1 (Dubocovich, 1991, 1995).

Las diversas indolaminas que se unen al receptor de melatonina pueden ordenarse según su grado de afinidad al mismo. Podemos considerar así la siguiente relación: 2-iodomelatonina > 6-cloromelatonina > 6-chloromelatonina > melatonina > 6-hidroximelatonina > 6-metoximelatonina > N-acetiltriptamina > 5-metoxitriptamina >> 5-hidroxitriptamina (Dubocovich, 1988; Sugden y cols, 1991).

Recientemente se ha aislado el ADNc de receptores de melatonina de melanóforos dérmicos de *Xenopus* (Ebisawa, 1994). Este ADNc codifica una proteína de 420 aminoácidos, con peso molecular estimado de 47424 Da. Esta proteína contiene 7 segmentos hidrófobos que representan probablemente las

zonas transmembrana. El receptor de melatonina pertenece a un grupo de la gran superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G.

Se han detectado 3 subtipos de receptores: Mel_{1a} expresado en el cerebro de pájaros y mamíferos, Mel_{1b} expresado principalmente en la retina de los mamíferos y Mel_{1c} encontrado en el melanóforos, cerebro y retina de anfibios y también en el cerebro de peces y pájaros (Reppert y cols, 1995; Reppert y cols, 1996; Reiter, 1974).

Los subtipos Mel_{1b} y Mel_{1c}, tienen una kd situada entre 20-40 pM y son farmacológicamente indistinguibles. El subtipo Mel_{1b} tiene una kd más alta (160 pM) y una afinidad más alta para los agonistas de melatonina como por ejemplo; Luzindol o 4-fenil 2-cloroacetamido-tetralina (Dubocovich y cols, 1997). Se ha demostrado que el receptor de melatonina MEL1a representa a una proteína responsable del ritmo circadiano y los efectos estacionales de la melatonina en el hámster (Weaver y cols, 1996; Goldman y cols, 1984; Hoffman, 1973). El receptor Mel_{1a} es el único receptor que se ha detectado en el núcleo supraquiasmático del hombre utilizando métodos de hibridación in situ (Weaver y cols, 1996).

1.8- RECEPTOR NUCLEAR

El hecho de que la melatonina sea una molécula lipófila hace que pueda difundir a cualquier compartimento intracelular. El primer indicio de una posible interacción de la melatonina con el material nuclear fue encontrado, con ayuda de estudios de fraccionamiento celular (Menéndez-Pelez y cols, 1993; Reiter, 1993). Se han identificado sitios de unión específicos y de alta afinidad para la 2[¹²⁵I]-iodomelatonina en núcleos de hígado de rata purificados según el método de (Blum y cols, 1987; Acuña Catroviejo y cols, 1987), en linfocitos humanos y de rata (García-Mauriño y cols, 1997) y en timocitos (Rafii-el-Idrissi y cols, 1995).

Recientes estudios han demostrado la presencia de una familia de receptores nucleares huérfanos RZR/ROR que parecen unir melatonina con alta afinidad y especificidad. El receptor RZRβ se encuentra especialmente en el SNC, exactamente en la glándula pineal, hipotálamo y tálamo (Becker-André y cols, 1994). El receptor RZRα se encuentra en el sistema inmune (Becker-André y cols,

1993) y las tres variantes del receptor retinoide huérfano (ROR) α_1 , α_2 y α_3 forman una subfamilia dentro de la superfamilia de los receptores hormonales nucleares. Concretamente, en linfocitos B, los receptores RZR α o ROR α_1 participan en la regulación de la expresión de la enzima 5-lipo-oxigenasa que cataliza la transformación del ácido araquidónico (Steinilber y cols, 1995).

La identificación de un ligando sintético del receptor RZR, una tiazolidin diona denominada CGP-52608 (1-[3-alil-4-oxo-tiazolidin-2-iliden]4-metil-tioseni-carbazona) (Fig 1-4), justifican que RZR α y ROR α_1 sean receptores nucleares para la melatonina (Wiesenberg y cols, 1995), este compuesto es un análogo funcional de melatonina y su receptor nuclear. Se ha identificado también un ligando sintético específico que se une al receptor de membrana, el S20098 (N-[2-(7-metoxi-1-naftil)etil]acetamida.(Fig 1-5).

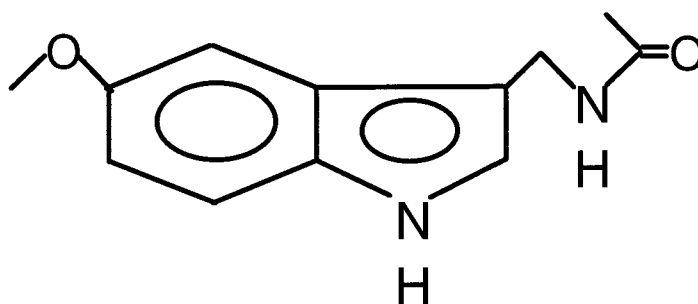


Fig 1-4: CGP52608:1-[3-(7-metoxi-1-naftil)etil] - 4-metil-tiosemi-carbazona.

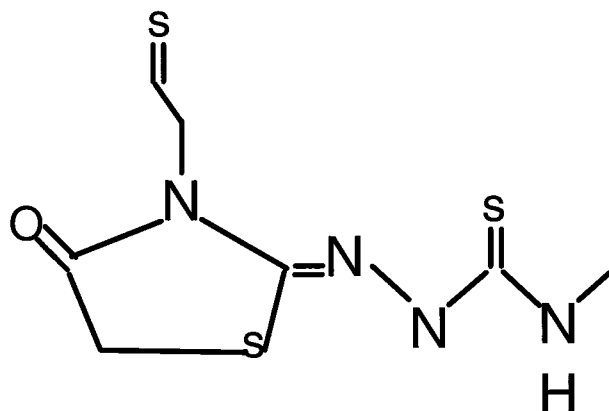


Fig 1-6: S20098: N-[2-(7-metoxi-1-naftil)etil]acetamida.

1.9- TRANSDUCCIÓN DE SEÑALIZACIÓN DE LA MELATONINA.

En varios tejidos estudiados, existen varios aspectos que se repiten como constantes, del efecto de la melatonina que son mediados por sus receptores de alta afinidad acoplados a proteína G.

En muchos tejidos la melatonina disminuye la concentración de AMPc (Carlson y cols, 1989; Morgan y cols, 1989; Vanecek y cols, 1989) y también tiene un efecto sobre otros segundos mensajeros tales como calcio intracelular $[Ca^{+}]_i$, GMP_c, diacilglicerol, proteínaquinasa C y ácido araquidónico. Estos efectos que se han descrito en las células de la pituitaria y SNC de neonatos de rata y en otros tejidos (Mcarthur y cols, 1997; Vanecek y cols, 1992; Vanecek y cols, 1989; Vanecek y cols, 1990).

La mayoría de los efectos de la melatonina son inhibidores y requieren estímulos previos, ya que con los niveles basales no se suelen ver efectos. Sin embargo, la melatonina aumenta la actividad de la proteína kinasa C induce la expresión de c-Fos en el SNC y hiperpolariza el potencial de la membrana en las células pituitarias en ratas recién nacidas. (Kilduff y cols, 1992; Mcarthur y cols, 1997; Vanecek y cols, 1992).

La melatonina afecta a varios segundos mensajeros. Dado que existen 3 subtipos de receptores de melatonina cuya estructura molecular está reconocida (Reppert y cols, 1996), es posible que cada uno de estos subtipos se acoplen un efector diferente o que un subtipo de receptor pueda acoplarse, por medio de diferentes proteínas, a diferentes efectores.

Está demostrado que en la célula de pituitaria (PT) de oveja, la melatonina inhibe la acumulación de AMPc inducida por forskolina (Morgan y cols, 1990) mediante una proteína sensible o insensible a toxina pertusica (PTX). Aunque la mayoría de los efectos descritos de melatonina sobre los segundos mensajeros son sensibles a PTX, la señal podría todavía ser transducida por diferentes proteínas G.

Existe 5 proteínas distintas de la familia Gi/Go acoplada a seis diferentes sistemas efectores (adenil ciclasa-fosfolipasa C – canal potasico-canal de calcio-canal sensible a amiloride y canal potasico –ATP) que han demostrado ser sensibles a PTX (Birnbaumer y cols, 1990). Existe otra posibilidad para que el

receptor de melatonina se acopla a otra efector ejemplo adenil ciclasa por medio de subunidad α de la proteína G_i y fosfolipasa C por medio de subunidad $\beta\gamma$ (Murthy y cols, 1996; Zhu y cols, 1996).

1.10- UNION DE MELATONINA A PROTEINAS REGULADORAS CITOPLASMÁTICAS

Además de la existencia de interacciones con receptores de membrana o nucleares específicos, la melatonina puede también modular la actividad de enzimas citoplasmáticos dependientes de Ca^{2+} y calmodulina (CaM).

Benitez-King y cols (1991) demuestran que la melatonina fue capaz de inhibir *in vitro* la fosfodiesterasa, enzima que cataliza la hidrólisis del AMP_c dependiente de calmodulina. También se ha demostrado que la melatonina tiene un efecto sobre la reorganización de microtúbulos del citosqueleto compatibles con los cambios en la actividad intracelular de CaM (Benítez-King, 1990). Estos mismos autores mostraron que la melatonina a concentraciones fisiológicas, contrarresta el efector inhibitor del complejo Ca^{2+} /CaM sobre la polimerización de tubulina (Benítez-King y cols, 1993).

Pozo y cols (1994) justifican que la melatonina también es capaz de inhibir la sintasa del óxido nítrico (NOS) en el cerebro de rata. Esta enzima es dependiente del complejo Ca^{2+} -CaM, especialmente el tipo constitutivo presente en el sistema nervioso central y el endotelio vascular. El mismo autor demuestra que cuando las concentraciones de CaM descienden, la melatonina no tiene efecto (Pozo y cols, 1997).

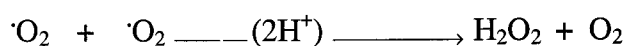
1.11- RADICALES LIBRES

a- Radicales libres de oxígeno.

Normalmente, los electrones están apareados y eléctricamente cargados y giran sobre ellos mismos produciendo un campo magnético denominado "SPIN". Un doble electrón es más estable que 2 electrones aislados porque la pareja de dos electrones con espines opuestos anula sus campos magnéticos.

Un radical libre es una especie química neutra o cargada, un compuesto químico que tiene un electrón desapareado "sólo un electrón" (Buechter, 1988; Halliwell, 1989). Los radicales libres, así, contienen un número impar de

electrones. Este electrón confiere al radical libre una inestabilidad de energía y de cinética. Enérgicamente, los radicales libres eliminan electrones de su estructura para lograr un nivel de estabilidad y pueden perder un electrón se comporta como reductor, como el caso del radical COO^\cdot , o ganar un electrón se comporta como oxidante como OH^\cdot , también el compuesto que presente un radical, se puede comportar como oxidante o reductor. Frecuentemente, el radical libre puede ser auto-oxidante es decir, puede oxidarse a sí mismo por una reacción de dismutación.



En esta reacción uno de los radicales (O_2^\cdot) se oxida y el otro se reduce.

b- Especies de oxígeno.

-Anión superóxido (O_2^\cdot) está producido por la reducción de la molécula de oxígeno monovalente. La molécula de oxígeno (O_2) gana un solo electrón de baja energía y se transforma en un anión superóxido (O_2^\cdot). En presencia de iones H^+ , el anión superóxido se transforma espontáneamente *in vitro* en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El efecto destructivo de O_2^\cdot puede ocurrir indirectamente *in vivo* en presencia de H_2O_2 ; el O_2^\cdot es el precursor del radical hidroxilo (OH^\cdot) producido según la reacción **de Haber y Weiss**.

-Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forma secundariamente a partir del O_2^\cdot o sea producido por una reducción bivalente del oxígeno. H_2O_2 se transforma en un compuesto oxidante poderoso, al añadir un segundo electrón. En presencia de ion ferroso (Fe^{2+}) se descompone en ion OH^\cdot y este radical hidroxilo es capaz de atacar las estructuras orgánicas más estables.

-El radical Hidroxilo (OH^\cdot), este radical se forma a partir del peróxido de hidrógeno en presencia de hierro según la reacción de Fenton, la reactividad del radical libre OH^\cdot es alta en medios biológicos y su reacción con las moléculas vecinas produce radicales secundarios por la pérdida de un átomo de hidrógeno o por transferencia de un electrón solo.

-Radicales Alcoxi (RO \cdot) y peroxi (ROO \cdot). Estos radicales pueden ser generados por la acción de $\cdot\text{O}_2$, OH \cdot sobre las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados. El radical peroxi es conocido por ser menos reactivo y más selectivo que el radical libre OH \cdot , es responsable de reacciones en cadena, el más conocido es el proceso básico de la lipoperoxidación en la membrana de las células

c- Producción de radicales libres.

Dos situaciones distintas pueden dar lugar a la formación de radicales libres dentro del organismo. En primer lugar, una formación específica de radicales libres responde a un control biológico necesario, por ejemplo, la síntesis de prostaglandinas normalmente implica la producción de radicales OH \cdot cuando el ácido araquidónico es transformado en endoperoxido por la ciclooxigenasa. Estos radicales libres, entonces, participan en la cascada del ácido araquidónico, inhibiendo la ciclooxigenasa por feed back negativo y favoreciendo la vía metabólica pro-agregante del tromboxano A₂ sobre la anti-agregante y vasodilatante de la prostaciclina. De modo similar, la fagocitosis también conlleva la formación de radicales libres. Los neutrofilos en reposo consumen una pequeña cantidad de O₂ que aumenta drásticamente cuando se ponen en contacto con un agente antigénico; se crea una invaginación acompañada de un consumo acelerado de oxígeno, hay una activación concomitante de una enzima de membrana (NADPH oxidasa) que cataliza la reducción de oxígeno en anión superóxido ($\cdot\text{O}_2$) y la producción de H₂O₂. Estos dos agentes oxidantes dan lugar a la producción de otra especie química tal como el radical hidroxilo y la liberación de hipoclorito y cloraminas a través de una enzima de los leucocitos (Deby, 1991). La producción de radicales en los dos sistemas anteriores está canalizada hacia la regulación fisiológica en la que están involucrados. En situaciones fisiológicas más comunes, la formación de radicales libres de oxígeno no es una parte integral del proceso regulatorio sino un fenómeno paralelo. Así, la molécula de oxígeno sufre una reducción univalente en todas las reacciones enzimáticas que implican transporte de un electrón, este fenómeno incluye ciertas actividades en la cadena respiratoria mitocondrial, funcionamiento de enzimas oxigenasas, fijación de oxígeno a hemoglobina, e interacciones del oxígeno con moléculas auto-oxidables tal como

catecolamina, riboflavina, melanina o glicoproteína. Los dos productos resultantes, el radical superóxido y peróxido de hidrógeno, en presencia de superóxido dismutasa y hierro producen un radical hidroxilo. Las reacciones oxidantes durante la detoxificación también producen radicales libres gracias al contenido de los peroxisomas; los citocromos P₄₅₀ son proteínas que funcionan como oxidasas, transfiriendo un electrón (producción de radicales), que participan en la biosíntesis de esteroides y en la detoxificación de ciertos compuestos (anestésicos, pesticidas y agentes contaminantes). Finalmente, los radicales libres, se forman también por radiación ionizante (X y radiación γ). Cuando la radiación es atenuada, se elimina un electrón de ciertas moléculas, provoca la radiolisis del agua que se encuentra en los tejidos expuestos (Laborit, 1965). El mismo proceso ocurre cuando una molécula absorbe un fotón de luz ultravioleta cuya energía es más baja que la energía de ionización de la molécula.

d- Protección contra radicales libre.

La formación de radicales libres de oxígeno es inherente al funcionamiento del organismo y representa la paradoja del oxígeno. Por eso la formación de radicales libres de oxígeno debe ser controlada: existen 2 formas de protección contra los radicales libres. El primero está basado en la especificidad de varias enzimas del sistema de defensa, presentes en el lugar de producción de los radicales, manteniéndolos a baja concentración. En este mecanismo están implicados la superóxido dismutasa (SOD) (EC1.151.1), catalasa (CAT) (EC1.11.1.6), descrito por Mc Cordy Fridovich (1969) como el principal mecanismo para combatir la toxicidad del oxígeno descubierto por Low (1901) y la glutatión peroxidasa (GPx) (EC1.11.1.9) identificada por Millo (1957); la actividad de glutatión peroxidasa se basa es su propia reducción por la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH₂) procedente de la vía de pentosa fosfato, o vía oxidativa directa (VOD). La SOD, acelera considerablemente la dismutación del ion superóxido produciendo el peróxido de hidrógeno, previniendo así la coexistencia de estas dos especies y por consiguiente la formación de (OH[•]). Su acción debe estar acoplada a catalasa/peroxidasa para evitar la acumulación de peróxido de hidrógeno. La catalasa cataliza la dismutación de peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno

molecular. La glutatión peroxidasa (GPx) actúa sobre el peróxido de hidrógeno transformándolo en agua y glutatión oxidado (GSSG) en presencia de glutatión reducido (GSH). También reduce el hidroperóxido inestable (ROOH) y los ácido grasos hidroxilados (ROH); estos constituyen la segunda línea de defensa endógena. Este sistema se localiza en el citosol (glutatión, ácido ascórbico) y en la membrana (α -tocoferol, vitamina A). (Deby y Pincemail, 1986; Halliwell, 1988; Dodet, 1991)(Fig 1-6).

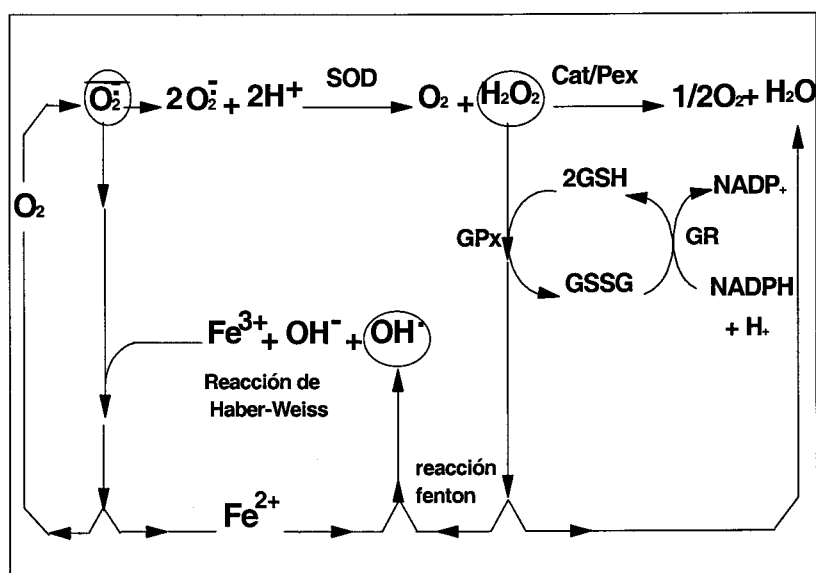


Fig 1-6: Principales enzimas implicadas en el metabolismo de los radicales libres de oxígeno (Reiter et al, 1994). SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, GPX: glutatión peroxidasa, GSH: glutatión (reducido), GSSG: glutatión (oxidado), GR: glutatión reductasa, G&PD: glucosa 6 fosfato dehidrogenasa.

e-Toxicidad de radicales libres.

La neutralización de radicales libres implica otros sistemas celulares como la membrana, ácidos nucleicos y proteínas, cuando los sistemas fisiológicos (enzimas específicos y scavengers) están saturados por una producción excesiva de radicales (Exposición a las radiaciones ionizantes o radiación ultravioleta intensa, intoxicación por ciertas drogas y reacciones inflamatorias intensas) o por una disminución de la actividad enzimática, (sistemas enzimático inmaduros en el

neonato, alimentarios, congénitos o defectos o problemas asociados al envejecimiento). La no protección de las células por los radicales provoca un deterioro considerable en la membrana y el metabolismo celular, que lleva a la muerte de las células. (Laborit y cols, 1991). Brevemente, podemos considerar la lipoperoxidación de la membrana, en ella un ácido graso es deshidrogenado por ataque de un radical libre y da lugar al radical peróxido.

El radical peróxido quita un ion de hidrógeno, durante una segunda fase de propagación, en presencia de otro ácido graso y se convierte en hidroperóxido. Esta sustancia puede participar en la propagación de la peroxidación y da lugar a varios productos (etano, pentano y malonil aldehído (MDA)). MDA puede reaccionar con grupos tioles o aminos de las proteínas y compuestos polimerizados fluorescentes que pueden, ellos mismos reaccionar con lípidos peroxidizantes. Las características de estos pigmentos, llamados lipofusion, han sido utilizados como marcadores histológicos acumulativos para indicar el envejecimiento celular, constituyendo el ensayo de restos malondialdehído el utilizado más extensamente para la determinación de una peroxidación intensa de la membrana (Gutteridge 1975).

f-Melatonina como antioxidante.

La estructura de la melatonina sugiere su propiedad antioxidante (Christen y cols, 1990), características mostradas por Leterrier utilizando 5-hidroxitriptamina in vivo (Leterrier y cols, 1964). Leach y cols (1980) y Kelly y cols (1984) demuestran que el metabolito de melatonina N-acetil-5-metoxiquinurenamina o el análogo de melatonina, indometacina, inhiben la formación de prostaglandinas que produce radicales libres. Además, la indometacina como ácido γ -hidroxibutírico (Pierrefichese y cols, 1992) previene la formación de radicales libres inducido por alloxan en la diabetes. Así mismo, la melatonina tiene un efecto protector sobre la destrucción de células β inducida por alloxan que provoca, además diabetes en los ratones (Pierre fiche y cols, 1993a). Las propiedades antioxidantes de la melatonina, han sido demostradas en un estudios realizados *in vitro* que determinaron la cantidad de lipoperoxidación (productos de membrana) inducida por el ácido tiobarbitúrico (TBA-RP) en homogenados de cerebro de ratones. En este estudio, la melatonina y su principal

metabolito hepático, 6-hidroxi-melatonina, es capaz de evitar la lipoperoxidación de la membrana. Reiter y cols (1993) y Poeggeler y cols (1993) muestran también que la melatonina posee propiedades como antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro* sugiriendo que esta actividad se debe principalmente a que actúa como un secuestrador de radicales libres con la estructura de OH \cdot . Pierrefiche y cols (1993a) han publicado que la melatonina estimula significativamente la actividad de G6PDH hepática y cerebral.

La melatonina parece suministrar el material requerido por la célula (NADPH $_2$) para regenerar el glutatión oxidado por la reductasa (GR). El glutatión reducido es un cofactor requerido para la actividad de la glutatión peroxidasa, la cual transforma el H $_2$ O $_2$ en O $_2$ y H $_2$ O (Fig7). En general, la melatonina podría suministrar a la célula una reducción equivalente a la (NADPH $_2$) adquiriendo gran importancia fisiológica y consecuencias clínicas (Laborit, 1965). Estas propiedades refuerzan el papel de esta hormona como una trampa para especies de radicales libres tal como HO \cdot .

En general, la activación de la vía de las pentosas por la melatonina, conocida ya en animales viejos (Niedermuller, 1986), puede que contribuya a su acción protectora durante el envejecimiento. La melatonina podría orientar el metabolismo de las células hacia una utilización disminuida de oxígeno, mientras que al mismo tiempo prolonga la integridad de enzimas y otros mecanismos de defensas del organismo particularmente en el cerebro. Ceshi y cols (1992) demuestran una actividad antioxidante de la melatonina, actuando sobre los radicales, la proliferación de células y el envejecimiento.

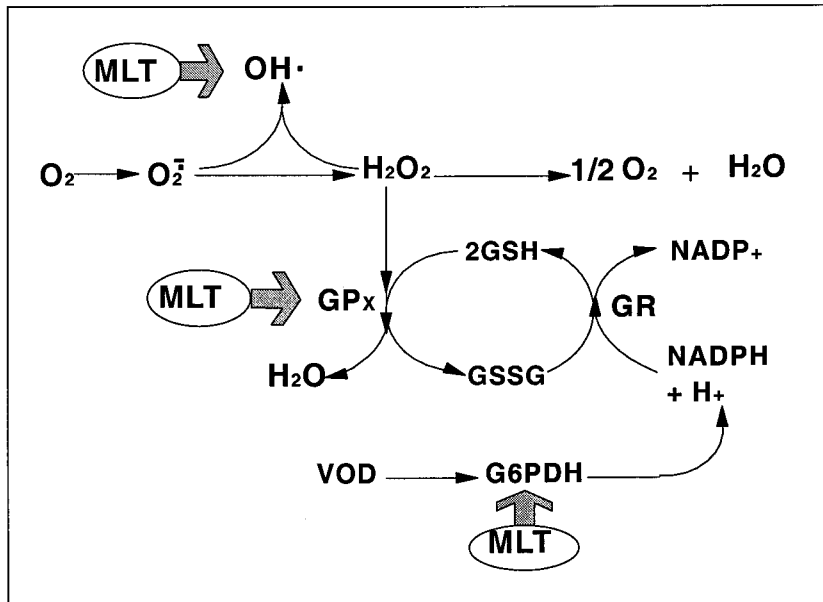


Fig 1-7: Acción de melatonina como secuestrador de radicales libres ($\text{OH}\cdot$) y sobre las enzimas implicadas en el metabolismo de los radicales libres de oxígeno. G6PDH: glucosa 6 fosfato dehidrogenasa, GPx: glutacion peroxidasa. GSSG: glutacion (oxidado). GSH: glutacion (reducido). MLT: melatonina. GR: glutacion reductasa.

1.12- SISTEMA INMUNE Y MELATONINA

En vertebrados existen 3 sistemas de comunicación intercelular, el sistema nervioso, endocrino e inmune, aunque las interrelaciones entre el sistema nervioso y el endocrino estaban claramente demostradas desde hace años, siempre se pensó que los sistemas era independientes. Fueron Csaba y cols (1965, 1975) y Jaknovic y cols (1975) quienes observaron que la pinealotomía de la rata producía una desorganización de la estructura del timo. Más tarde Maestroni y cols (1986) mantuvieron un grupo de ratones bajo luz constante durante 3 ó 4 generaciones para suprimir la producción de la melatonina (Reiter, 1985). La 3ª y 4ª generaciones de estos ratones crecieron pobremente y mostraron unas habilidades deterioradas para sintetizar respuestas de anticuerpos frente a antígenos T-dependientes acompañados de una atrofia del bulbo esplénico (Maestroni, 1986).

El tratamiento con productos farmacológicos (bloqueante como propanolol) o inyecciones diarias de p-cloropenilalanina a ratones suprime la síntesis de melatonina, observándose una respuesta inmune humoral (anticuerpo primario) a hematies de oveja (Maestroni, 1986) y una disminución de las reacciones mixtas de linfocitos autólogos. La administración nocturna de melatonina abolía estos efectos, hecho que demostró claramente la interrelación entre la glándula pineal y el sistema inmune. (Maestroni y cols, 1986; Becker y cols, 1988). Maestroni y Conti (1990, 1991) mostraron que la concentración fisiológica de melatonina estimula la liberación de agonistas opiodes de los linfocitos T helper (CD4⁺) *in vitro* que aumenta la respuesta inmune (Maestroni y cols, 1989, 1989, 1991; Lakin y cols, 1981; Lissoni y cols, 1986).

La existencia de receptores específicos para la melatonina en las células del sistema inmune apoya la idea de un efecto directo de esta hormona tanto en células activas como no activas (Calvo y cols, 1995).

Muchos estudios afirman una acción de la melatonina sobre las células inmunocompetentes. Así, la pinealectomía en ratones disminuyen la producción de IL-2 y la actividad asociada sobre las células NKs. Este experimento de Gobbo y cols sugiere que la melatonina actúa directamente sobre los linfocitos T.

Giordano y Palermo (1991) mostraron que la melatonina inyectada durante la noche aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) en esplenocitos de ratón, capaz de activar los linfocitos Th₁ por aumento de IL2 e IFN γ en el cultivo (García-Mauriño y cols, 1997).

Morrey y cols (1994) han mostrado que la melatonina es capaz de activar monocitos e inducir la secreción de IL-1 y la citotoxicidad en los humanos.

Otros estudios demostraron que un suptipo de interferón, IFN- γ , aumentó la producción de melatonina en cultivos de la glándula pineal de rata (Reiter, 1989), este aumento de melatonina se acompañó de una reducción en la actividad de la enzima N-acetiltransferasa (Withyachumnarnkul y cols, 1990b)(Fig 1-8).

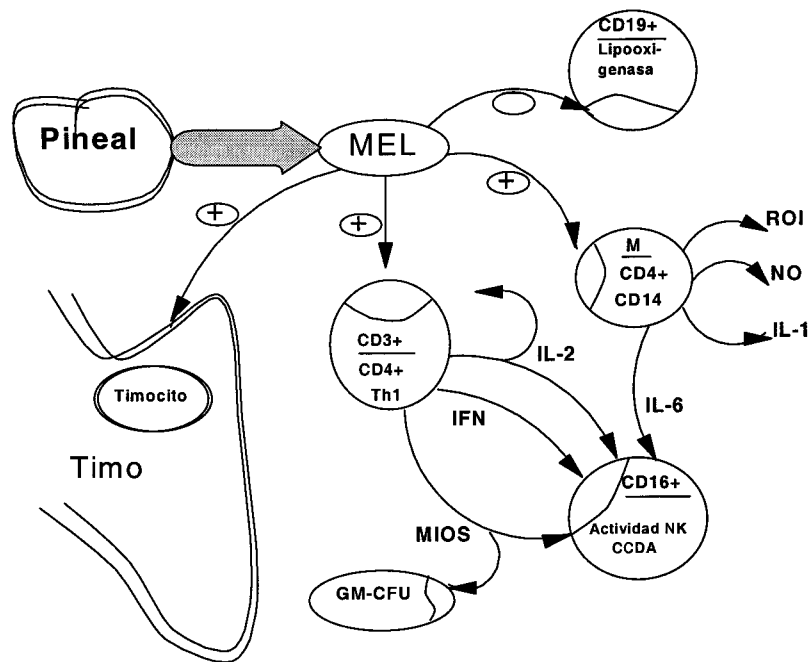


Fig 1-8: Esquema de posibles relaciones entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino. (MEL: melatonina; MIOS: opiáceos estimulados por melatonina; IFN: interferón gamma; IL-2: interleucina 2; IL-6: interleucina 6; IL-1: Interleucina 1; NO: óxido nítrico; ROI: radicales de oxígeno; M: monocitos; CD3+: linfocitos T; CD19: linfocitos B; CD16+: células “natural Killer”; CCDA: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; GM-CFU: colonias formadoras de granulocitos y macrófagos).

Actualmente, la investigación se enfoca sobre los estudios de receptores de melatonina en diferentes tejidos de mamíferos y aves.

En mamíferos existen lugares de unión para la melatonina en el sistema inmune. Se demostró también la existencia de sitios de unión de alta afinidad en bazo de hamster (Niles, 1989).

Maestroni y Conti (1993), muestran el efecto directo de melatonina en los linfocitos *in vitro*. Estos autores no han encontrado ninguna unión del 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina para activar o no los esplenocitos de ratón. Sin embargo, Lopez-Gonzalez y cols (1992a), mostraron que la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina se une específicamente a linfocitos de sangre periférica y también han encontrado un

sitio de unión de bajo afinidad de la melatonina en neutrofilos en el hombre (Lopez-Gonzalez y cols, 1993a).

En la membrana purificada de timo de rata se caracterizo sitios de unión de alta afinidad para la 2[¹²⁵I]-iodomelatonina. (Lopez-Gonzalez y cols, 1993b). también se ha caracterizado receptores específicos en esplenocitos de rata (Rafii-El-Idrissi y cols, 1995).

2-GLÁNDULA HIPOTALÁMICA

2.1- FISILOGIA DEL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una parte del sistema nervioso central que está situada en la parte ventral del diencéfalo, en las proximidades del tercer ventrículo, formado por un grupo de núcleos con unas misiones especiales. Se han identificado gran número de núcleos y diferentes esquemas de su localización. Dichos núcleos se han dividido en tres regiones: el hipotálamo anterior, el hipotálamo posterior y los tubérculos mamilares. (Fig 2-1).

El hipotálamo anterior comprende tres núcleos que se sitúan cerca de la lámina terminal: el núcleo preóptico, que se extiende debajo de la comisura anterior; el núcleo supraóptico, dispuesto alrededor del quiasma; y el núcleo paraventricular, de posición yuxtatrigoal, pues rodea las columnas del fórnix cuando éstas se introducen en la pared ventricular.

El hipotálamo posterior forma la pared infundibular. Contiene también tres núcleos: uno dorsal, colocado por debajo del surco subtalámico de Monro; otro ventral, que continúa al anterior hasta el tuber, y un tercer núcleo posterior, que ocupa, por detrás de los dos últimos, un pequeño campo triangular. Los núcleos del hipotálamo posterior revisten medialmente la columna del triángulo y el fascículo mamilotalámico, que siguen un trayecto en forma de ocho en el espesor de la pared ventricular.

La estimulación del hipotálamo anterior, disminuye la frecuencia respiratoria y la del pulso, así como produce descensos en la presión arterial. Al contrario, el hipotálamo posterior tiene un efecto opuesto, hipertensor y acelerador.

La masa del cuerpo mamilar contiene en realidad varios núcleos. Del núcleo medial sale el fascículo mamilotalámico de Vicq-d'Azyr, y en el lateral termina la columna o pilar anterior del triángulo.

El área lateral del hipotálamo presidiría la regulación de cierto número de fenómenos pertenecientes al dominio de las funciones de nutrición, el apetito, la sed, la regurgitación y las náuseas.

El hipotálamo consta de neuronas (800-1600 neuronas en el hipotálamo de la rata), neuroglia, fibras y terminaciones nerviosas, capilares y células

ependimarias, que en conjunto se disponen en empalizada en el borde del tercer ventrículo.

Gay (1972) distingue unas neuronas peptidérgicas o neurosecretoras y otras que son solamente neurotransmisoras. Las primeras recibirían impulsos nerviosos que se traducirían en una secreción hormonal; a ellas corresponden las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular que, mediante determinados impulsos, segregan la hormona antidiurética (ADH), oxitocina (OXT) y neurofisisina, que por los axones llegan a la neurohipófisis; otro tipo de neuronas peptidérgicas corresponden a todas las del área hipotalámica formadoras de hormonas liberadoras e inhibitoras (RH e IH), cuyos axones terminan en los plexos capilares de la parte superior de los vasos porta, esto es, en la eminencia media y tallo.

Las neuronas exclusivamente neurotransmisoras no formarían ni transportarían péptidos hipofisotróficos; generalmente son noaminérgicas, actuando de intermediarios entre otros impulsos neuronales y las células neurosecretoras; sus axones pueden terminar en el cuerpo de las neuronas peptidérgicas (axo-dentríticas) o en sus terminaciones axónicas en contacto con el plexo capilar superior del sistema porta (axo-axónicas). Menos abundantes que las neuronas neurotransmisoras monoaminérgicas son otras que forman serotonina o acetilcolina. Parece ser que las monoaminérgicas, controlarían la secreción de hormonas gonadotróficas (GH), hormona liberadora de la prolactina (PRL), hormona corticotropa (ACTH), hormona estimuladora de los folículos (FSH), hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH), mientras que la serotonérgicas estimularían la prolactina (PRL) y (GH) e inhibirían la TRH; y las neuronas colinérgicas intervendrían en el control de la ACTH. Así se explica que la L-Dopa estimula la secreción de GH e inhiba la secreción de PRL; por el contrario. A través de la eminencia media pasan los tractos supraóptico y paraventricular camino de la neurohipófisis, además la cruzan las fibras hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH), mientras que la serotonérgicas estimularían la prolactina (PRL) y (GH) e inhibirían la TRH; y las neuronas colinérgicas intervendrían en el control de la ACTH.

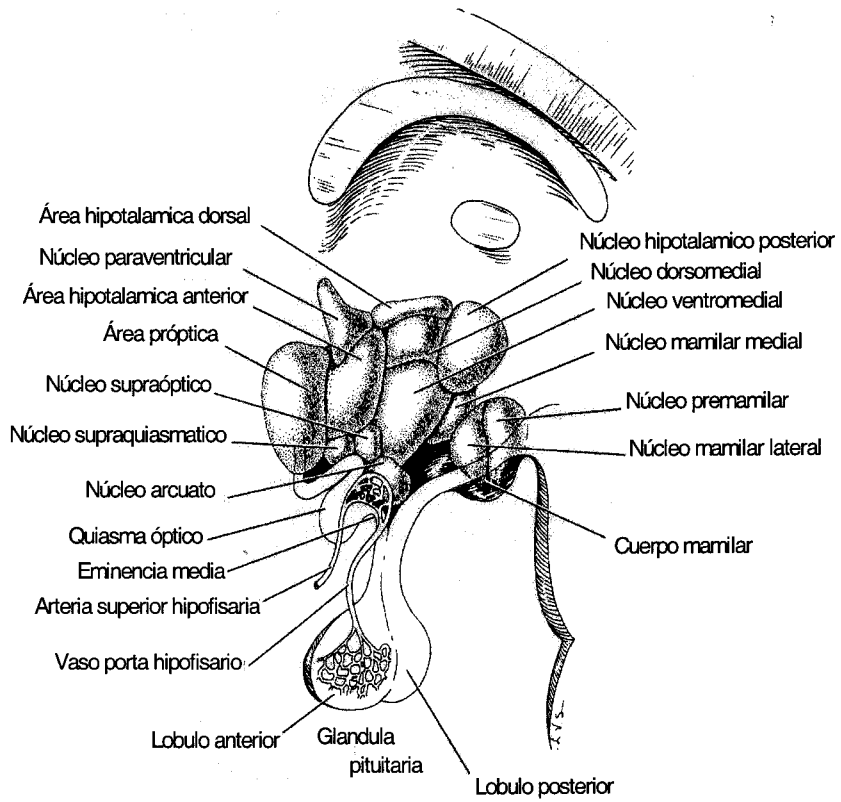


Fig 2-1: Esquema del hipotálamo humano con el vaso hipofisario.

Así se explica que la L-Dopa estimula la secreción de GH e inhiba la secreción de PRL; por el contrario. A través de la eminencia media pasan los tractos supraóptico y paraventricular camino de la neurohipófisis, además la cruzan las fibras procedentes de las propias neuronas hipotalámicas ya descritas (peptidérgicas y neurotransmisoras) y otros dos tipos de fibras nerviosas: las eferentes del hipotálamo a diversos puntos del sistema nervioso central y las procedentes del SNC que llegan al hipotálamo.

2.2- Funciones endocrinas

En los diversos núcleos hipotalámicos se sintetizan diversas sustancias que a través de los axones son vertidas al sistema porta de la eminencia media para ser enviadas a la adenohipófisis y regular la secreción de sus hormonas tróficas. Esas sustancias, al aislarse, se denominaron factores hipotalámicos, pero en realidad son auténticas hormonas, pues se forman por un proceso de secreción y luego pasan a la sangre del sistema porta y de la circulación general para actuar a distancia, aunque en este caso la distancia sea corta, del hipotálamo a la adenohipófisis.

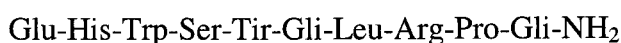
Estas hormonas pueden estimular la liberación de las hormonas de la adenohipófisis, en cuyo caso se denominan RH de “releasing hormone” o, por el contrario, pueden inhibir la secreción de las mismas y se denominan IH de “inhibiting hormone”. Estas hormonas son:

- Hormona hipotalámica liberadora de gonadotrofinas (LHRH), que provoca liberación de hormona estimulante de la LH.
- Hormona hipotalámica liberadora de la tirotrófina hipofisaria (TRH), que provoca liberación de hormona estimulante del tiroides.
- Hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), que provoca liberación de hormona del crecimiento y hormona inhibidora de la hormona del crecimiento (GHIH), que es idéntica a la hormona somatostatina y que inhibe la liberación de hormona del crecimiento.
- Factor liberador de corticotrofina (CRF), que causa liberación de adrenocorticotrofina.

- Factor inhibidor de prolactina (PIF) que causa inhibición de la secreción de prolactina.

2.2.1- Hormona liberadora de LH (LHRH).

La hormona liberadora de gonadotrofinas es una de las moléculas más importantes implicadas en la regulación de la reproducción, se trata de un decapeptido cuya secuencia de amino ácidos es: (Adelman y cols, 1986; Phillips y cols, 1985; Silverman , 1988).



Existen multitud de análogos sintéticos que generalmente poseen menor potencia biológica; así por ejemplo, si se elimina el décimo amino ácido su actividad queda reducida al 11%. Los derivados d-alanina-6-LRH y d-leucina-6-LRH tienen mayor potencia y vida media, pues con una dosis menor el efecto persiste 24 horas. El lugar de su biosíntesis es el hipotálamo medio basal (HBM) (Rettori y cols, 1991), concretamente en el nucleus arcuatus, el cual regularía la secreción tónica, mientras que el área preóptica intervendría en la secreción cíclica de FSH y LH. A su vez, estos centros estarían controlados por áreas del cerebro medio y la amígdala. Su secreción se dirige fundamentalmente hacia la adenohipófisis, pero también pasa a la circulación general (Carmel y cols, 1976; Clarke y cols, 1982), en donde regula la síntesis y la liberación de gonadotrofinas. Se han identificado que la liberación de LHRH y LH es pulsátil (Dierschke y cols, 1970; Levine y cols, 1982; Gearing y cols, 1988) y que cambian el patrón pulsátil de secreción de gonadotrofinas que controlan la maduración de gametos, la secreción de las hormonas tiroideas, la ovulación y el mantenimiento de la función luteica (Crowley y cols, 1985; Hutchison y cols, 1987; Knobil y cols, 1988). Se puede medir la LHRH por RIA, así se ha encontrado que en los carneros su concentración es de $71 \pm 1,4$ pg/ml (Neh y cols, 1973) y en las ovejas castradas sube a 128 pg/ml. En la sangre es más estable que la TRH, y en la mujer puede medirse su efecto biológico en la mitad del ciclo y en la fase luteínica. No se detecta en la orina. En la mujer, las concentraciones son de

menos de 5 pg /ml en la primera fase y de 50 pg/ml durante el pico de la ovulación (Arimura, 1975; Miyake y cols, 1980). La concentración basal en hombres es de 1.6 pg/ml (Bourguignon y cols, 1974).

Normalmente se degrada rápidamente cuando pasa a la sangre. En su mecanismo de acción interviene el cAMP cuya formación es estimulada por la GnRH. Su secreción está influenciada por diversos estímulos (psíquicos, sexuales, luz) que actúan a través del S.N.C, además de por el “feed back” corto hipófisis-hipotálamo.

Ramírez y cols (1965) habían demostrado que la estimulación del hipotálamo de la rata provoca la depleción de LH del lóbulo anterior. MaCaann y cols (1961) y Chowers y cols (1965), observaron que la inyección de extracto hipotalámico a este mismo animal, elevaba la LH plasmática y posteriormente se demostró que producía ovulación (Nikitowitsch y cols, 1958). Estos mismos efectos se obtienen si la inyección se hace en el tallo hipofisario (Nallar et al, 1965) o en la hipófisis misma (Campbell y cols, 1966; Ducommun y cols, 1966). El coito en la rata produce en cambio un descenso en el contenido de esta sustancia en el hipotálamo (Harrington y cols, 1967) y si se seccionan las conexiones nerviosas supraquiasmáticas del tuber cinereum, se suspende la formación de dicho principio. Shally y cols (1966, 1967) han podido aislar y purificar el LHRH porcino, habiéndose establecido después que la hormona activa es un decapeptido (Arimura y cols 1972; Debeljuk y cols, 1972) de una composición química relativamente simple, lo cual ha permitido cerrar brillantemente el ciclo de estas investigaciones obteniéndose de forma sintética (Kastin y cols, 1972).

Guillemin y cols (1972), han sintetizado otra sustancia, que es un tetrapeptido que tendría análogas acciones, pero esta sustancia no es la hormona fisiológica y hasta se duda de su efectividad, pues podría estar contaminada con el decapeptido activo (Arimura y cols, 1973).

La LHRH es también activa en otras especies animales (Arimura y cols, 1972), pero llama la atención la relativa insensibilidad de la mona a ella (Spies y cols, 1973). Yamashita (1967) ha evidenciado que también tiene efecto en la hipófisis de los machos induciendo la liberación de ICSH.

Otros experimentos ultraestructurales en la hipófisis de animales tratados por LHRH (Mendoza y cols, 1973; Redding y cols, 1972; Rennels y cols, 1971), demuestran que la acción no es sólo “liberadora”, sino también estimuladora de la formación de LH “de novo” en la adenohipófisis. La acción sobre la hipófisis parece depender de la edad del animal. En el feto de la oveja se ha comprobado que existe una respuesta positiva a la LHRH porcina (Foster y cols, 1972a, 1972b), pero en cambio en la rata, se necesita un cierto grado de maduración de la adenohipófisis para que la acción tenga lugar (Schally y cols, 1968; Debeljuk y cols 1972).

En la rata el decapeptido se transmite no sólo por los vasos portales, sino también por el líquido cefalorraquídeo (Ondo y cols, 1973). Guillemin (1967), piensa que también los axones de las células ganglionares hipotalámicas pueden actuar como vectores de la LHRH. La liberación de LHRH es pulsátil (Gearing y cols, 1988; Levine y cols, 1985 y Karsch y cols, 1992), este pulso es esencial en la función reproductora (Knobil E et al, 1988 y Lincoln, 1988).

La liberación de LHRH está inducida por norepinefrina que estimula la producción de óxido nítrico. El NO activa la ciclo-oxigenasa, que sintetiza PGE₂, y a la adenilato ciclasa para generar AMPc (Rettori y cols, 1992, 1993). (Fig 2-2).

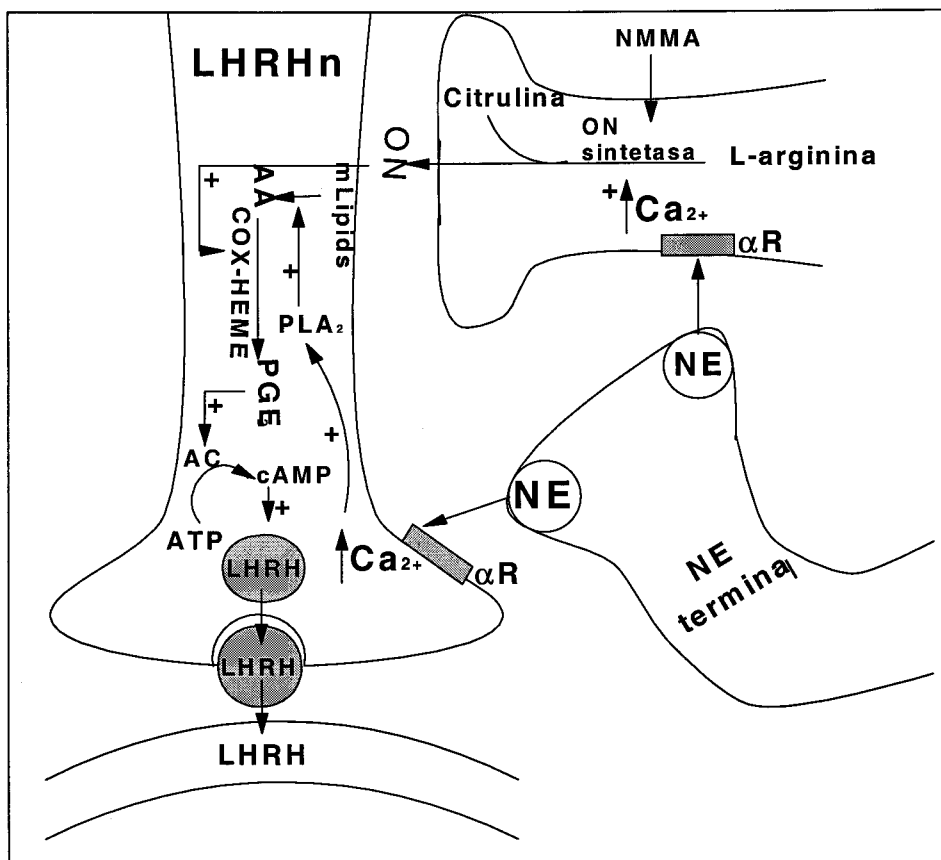


Fig (2-2): Esquema representativo de la vía de la liberación de LHRH.

2.2.2- Regulación de la secreción y liberación de LHRH.

La liberación de LHRH está controlada por muchas neuronas:

El neuropeptido Y (NPY) tiene un efecto modulador sobre las neuronas del hipotálamo (Wehrenberg y cols, 1989). Otros investigadores, demuestran que NPY estimula la liberación de LHRH en la rata (Sabatino y cols, 1990; Woller y cols, 1992) y en LMBS (Prasas y cols, 1993) y también la estimulación de la síntesis de LHRH y el incremento de las concentraciones de ARNm-LHRH en la región preóptica de la rata (Rosie y cols, 1990). Sin embargo, dado que las neuronas LHRH no parecen contener receptores de estrógenos, o en cualquier caso los expresan en escasa proporción (Shivers y cols, 1983), se ha sugerido que la acción del estradiol se ejerciera sobre interneuronas que, a su vez, controlarían

la síntesis del péptido en las neuronas LHRH hipotálamicas correspondientes mediante acciones sinápticas excitatorias e inhibitorias mediadas por mecanismo adrenérgicos-serotonérgicos y opiáceos-dopaminérgicos, respectivamente (Fink, 1994). La progesterona también, es capaz de ejercer efectos rápidos sobre la secreción de LHRH (Raírez y cols, 1990; KE y cols, 1987).

Otro sistema clásicamente analizado como receptor nuclear, es el dopaminérgico, tuberoinfundibular (TIDA), constituido por cuerpos y proyecciones axónicas a la eminencia media, donde liberan dopamina como neurohormona y participan en la regulación de la secreción de LHRH (Fink, 1988, 1994).

El ácido γ -aminobutírico (GABA), tiene también un efecto sobre la regulación neuronal del hipotálamo (Barraclough, 1992; Mistsushima y cols, 1994; Kordon y cols, 1994; Robinson, 1995), y también se ha demostrado que el GABA regula la expresión del gen que codifica para LHRH (Vincens y cols, 1994; Leonhardt y cols, 1995; Li y cols, 1995) y así bien la liberación de LHRH en la rata (Herbison y cols, 1991; Jarry, 1991). Otros estudios demuestran que el GABA puede suprimir o aumentar la respuesta de LHRH (Li y cols, 1993, 1995; Bergen y cols, 1991; Bourguignon y cols, 1997). La β -endorfina (Faletti y cols, 1999), el factor activador de plaquetas en la rata (Olcese y cols, 1999; Mikkelsen y cols, 1995) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Olcese y cols, 1999; Mikkelsen y cols, 1989) y tienen efecto sobre la liberación de LHRH.

Aparte de las neurohormonas, se ha demostrado que algunos compuestos son capaces de inhibir la liberación de LHRH por ejemplo el etanol (Griselda y cols, 1995).

2.3- Funciones vegetativas.

Los centros vegetativos del hipotálamo controlan:

- La regulación cardiovascular.
- La regulación de la temperatura corporal.
- La regulación del agua corporal.
- La regulación de la contractibilidad uterina y de la eyección de la leche por las mamas.
- La regulación gastrointestinal y de la alimentación.

2.4- ÓXIDO NÍTRICO

En las reacciones químicas artificiales, tales como el funcionamiento de algunos motores, y en algunas naturales, como las producidas por el metabolismo de ciertas células, se generan óxidos de nitrógeno. El interés de la biociencia por este tipo de sustancias se concentró inicialmente en sus efectos tóxicos y en sus efectos conservantes para algunos alimentos (Snyder y cols, 1992). Aparte de lo anterior no parecía haber nada de especial en las mismas, pero el estudio de su metabolismo en los mamíferos comenzó a cambiar esta visión convencional.

El óxido nítrico es un pequeño radical gaseoso, tóxico, poderoso por su estructura de radical libre: posee un electrón extra que le confiere una enorme reactividad química ($\cdot\text{N}=\text{O}$). Es una molécula muy efímera, su vida media es de 6-10s. El óxido nítrico (NO) desempeña papeles muy importantes en la biología de los mamíferos. Se aceptó que este tipo de sustancia tóxica tuviese alguna relación con los mecanismos, pero una molécula desprovista de la especificidad secuencia-dependiente y de otras complejidades que caracterizan a los polímeros del organismo tenía pocas posibilidades de ejercer funciones críticas en la homeostasis, por lo cual se originó una amplia controversia antes de verificar que podía estar implicada en dos aspectos. Posteriormente se ha establecido que el NO y los elementos relacionados con su metabolismo, están ampliamente extendidos. De esta manera, se le ha relacionado con la regulación del flujo sanguíneo y los mecanismos antitrombóticos (Furchgot y cols, 1988; Ignarro y cols, 1988; Moncada y cols, 1989), lo cual ha supuesto modificaciones importantes en el enfoque de la fisiología cardiovascular. Su papel en las respuestas inmunes se ha precisado mejor y se ha extendido más allá de los límites del sistema retículo endotelial (Furchgott y cols, 1988; Xie y cols, 1992; Moncada y cols, 1991). Al igual que muchos sistemas bioquímicos de los mamíferos, las condiciones de producción patológica del NO se han relacionado con estados fisiopatológicos tales como la hipertensión esencial y las respuestas patológicas del sistema inmune en el choque séptico (Moncada y cols, 1991).

En los últimos años han aparecido evidencias que sugieren que el NO tiene funciones de neurotransmisor, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. A nivel central se ha localizado en cerebelo, corteza cerebral, núcleo estriado, hipocampo, etc, mediante la relación establecida entre su enzima

sintetizadora (NO-sintetasa) y la NADPH-diaforasa neuronal (Hope y cols, 1991; Vincent y cols, 1992). A nivel periférico, se le ha identificado como el mensajero de un tipo de inervación, no adrenérgica-no colinérgica (NANC) de la musculatura lisa (Bredt y cols, 1990; Garthwaite y cols, 1991). A partir de estas localizaciones tanto a nivel central como periférico, se le ha relacionado con algunos aspectos de la plasticidad neuronal como son la potenciación y la depresión a largo plazo, implicándolo en los mecanismos de memoria y aprendizaje (Garthwaite y cols, 1988; Mayer y cols, 1987), así como en las vías del dolor, particularmente en los fenómenos de hiperalgesia y dolor crónico (Woolf y cols, 1989; Moore y cols, 1991). Al igual que en el sistema cardiovascular, lo anterior ha producido cambios conceptuales muy importantes, que incluyen la hipótesis de los mensajeros retrógrados (Williams y cols, 1993). Además se ha comenzado a considerar su participación en diversas patologías como la esclerosis múltiple (Sherman y cols, 1992), la degeneración neuronal (Moncada y cols, 1991; Garthwaite y cols, 1991; Meldrum y cols, 1990) y la migraña (Olesen y cols, 1993).

2.4.1- Metabolismo del NO

La generación de óxido de nitrógeno por microorganismos (rutas nitrificadoras y denitrificadoras) fue caracterizada mucho antes que en mamíferos. Sin embargo, ya a principios de siglo se describió en orina de humanos un contenido de nitratos superior al ingerido en la dieta (Mitchell y cols, 1916).

En células de mamíferos, el NO se sintetiza enzimáticamente a partir del nitrógeno guanidino terminal de la L-arginina (Plamer y cols, 1988, 1989), siendo el oxígeno molecular el aceptor final de electrones (Kown y cols, 1990; Leone y cols, 1991) (Fig 2-3).



La enzima encargada de catalizar dicha reacción es la sintasa de óxido nítrico (NOS; EC 1.14.13.39) (Garthwaite y cols, 1989; Bredt y cols, 1990; Bredt y cols, 1991). Esta reacción de tipo redox, tiene lugar mediante una cascada de transferencia de electrones desde el NADPH al N del grupo guanidinio de la L-

arginina. En esta transferencia intervienen el FAD, el FMN y el átomo de hierro del grupo hemo de la enzima.

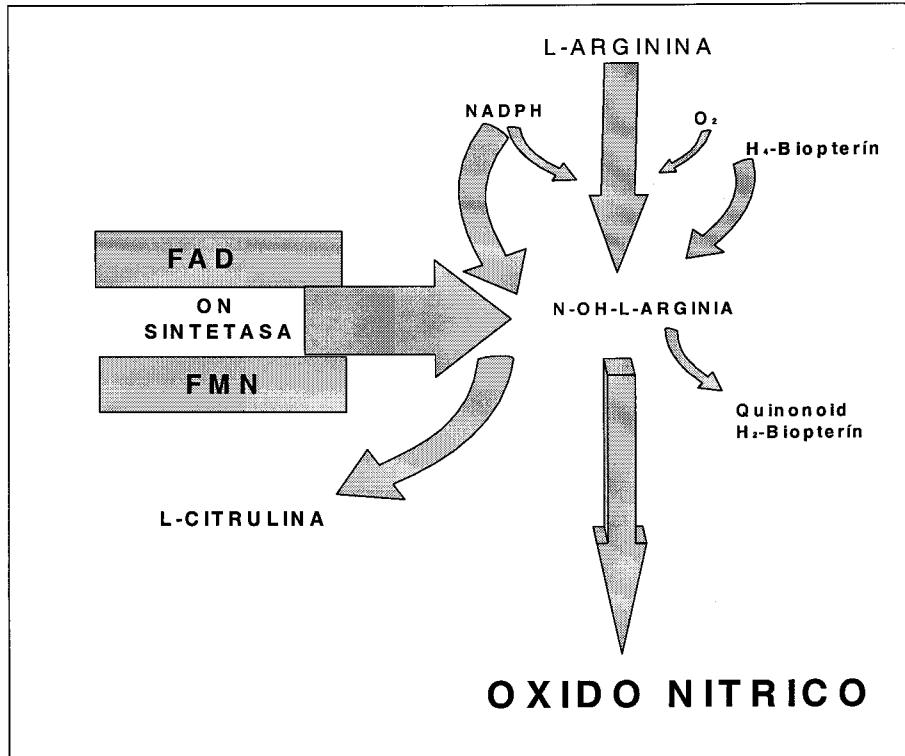


Fig 2-3: Esquema de la biosíntesis del NO.

Se ha establecido que existen múltiples formas de la NOS: NOS I, NOS II y NOS III. La diferencia entre ellas se basa en las características físicas y bioquímicas de las enzimas purificadas, la localización subcélular y la regulación por la concentración de Ca²⁺ libre citosólico, y ha sido confirmada recientemente en estudios de clonación y expresión de los correspondientes genes. Se ha establecido otras clasificaciones de las isoformas de la NOS. Dentro del sistema nervioso se ha encontrado una forma constitutiva (cNOS) con un locus sensible a la calmodulina (Bredt y cols, 1990) y que requiere la entrada de Ca²⁺ al medio intracelular para su activación, así como inducible (iNOS) que si bien no requiere calcio, necesita ser estimulada por endotoxinas y citoquinas (Forstermann y cols, 1991; Knowles y cols, 1990). La forma constitutiva se encuentra en neuronas (Bredt y cols, 1991; Forstermann y cols, 1991), el peso del monómero en geles de

SDS-poliacrilamida oscila entre 150 y 160 Kda. Estas proteínas son citosólicas y se encuentran en las células endoteliales y unidas a membrana (Pollock y cols, 1991), mientras que la forma inducible se localiza en macrófagos y células de la glía principalmente (Forstemann y cols, 1991). El peso del monómero en geles de SDS-poliacrilamida es de 130 kDa y es una proteína citosólica que se encuentra en forma dimérica bajo condiciones nativas (Marletta, 1993b).

El extremo carboxilo terminal de todas las NOS contiene sitios de unión para el FAD, el NADPH, idénticos a los dominios equivalentes de la citocromo P₄₅₀ reductasa (CPR), otro flavín nucleotido reductasa. Además, el grupo cromóforo de la NOS presenta similitudes con los de otras P₄₅₀ reductasas. Vista así, la NOS puede asimilarse a una proteína quimérica con actividades reductasa en su extremo amino y oxidasa en su extremo carboxilo. Todas las NOS unen calmodulina en un proceso que puede ser independiente de Ca⁺⁺ (NOS-II) o dependiente de Ca⁺⁺ (NOS-I y NOS-III). En el caso de la NOS-II la calmodulina (CaM) y el enzima se copurifican, sugiriendo una estructura tetramérica NOS₂/CaM₂. La función de la calmodulina se asocia al control del flujo de electrones. Por otro lado, se postula que tanto la tetrahydrobiopterina (BH₄) como la L-arginina poseen lugares de unión a la NOS. El requerimiento de BH₄ como cofactor es común a otras hidroxilasas, pero en el caso de la NOS su papel es, al parecer, estructural, mientras que en otras hidroxilasas está involucrada en el flujo de electrones. Además, la NOS posee una afinidad por la BH₄ tan elevada que permite la copurificación del enzima y el cofactor (2 moles de BH₄/dímero) (Fig 2-4).

La NOS posee otros sitios de los que carece la citocromo P₄₅₀ reductasa. Tiene un sitio para la calmodulina y otro para la fosforilación (la fosforilación implica la adición de grupos fosfatos a proteínas por una familia de enzimas que reciben el nombre de proteínas quinasas).

La fosforilación de proteínas transmite información procedente de segundos mensajeros, tales como el AMP cíclico, a varias proteínas del interior de las células. La fosforilación es uno de los principales mecanismos de señalización del interior de las células. La NOS podría fosforilarse por una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, una proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina y una proteína quinasa C. Estas quinasas son importantes enzimas

fosforilantes que regulan las respuestas celular a hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento.

2.4.2- Regulación de la biosíntesis del óxido nítrico.

Además, la regulación de la biosíntesis del NO se realiza a varios niveles, que incluyen el genómico, transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional. Dependiendo de la isoforma de que se trate, la regulación será más efectiva en uno u otro nivel (Nathan y cols, 1994)

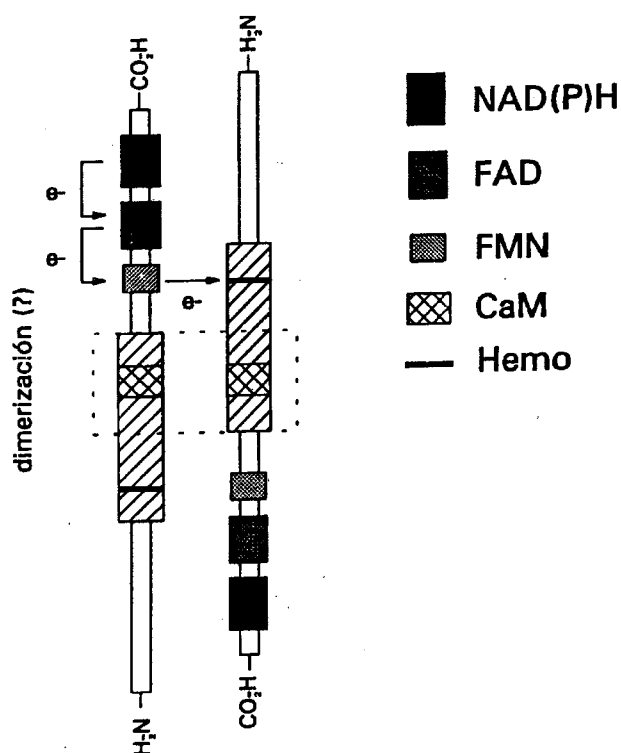


Fig 2-4: Esquema representativo del modelo hipotético de dimerización cabeza-cola de las isoenzimas.

2.4.3- NO como molécula efectora

El interés sobre el posible papel funcional del NO se originó en las observaciones hechas (Magee y Barnes, 1956; Snyder y cols, 1992) sobre nitrosaminas carcinogénicas generadas por el cuerpo humano a partir de los nitratos de alimentos conservados. En otros estudios se observó la persistente excreción de nitratos en cantidades importantes, aún con dietas de bajo contenido en los

mismos, así como el aumento de la excreción de nitratos en individuos con procesos infecciosos (Wagner y cols, 1982).

Posteriormente se ha señalado que la inyección de endotoxina bacteriana en ratas estimulaba la excreción de nitratos (Snyder y cols, 1992), por lo que se asoció la presencia de macrófagos y arginina, con la producción de nitritos y nitratos, considerándose al NO como un producto intermedio de esta cadena. Esta importante faceta del metabolismo del NO ha sido revisada (Furchgott y cols, 1988; Xie y cols, 1992), en los cuales se ha sustentado que, cuando los macrófagos son activados por endotoxinas o células T, responden transformando arginina en NO, el cual les permite eliminar bacterias, hongos y/o células tumorales, mediante acciones intracelulares no precisadas completamente aunque van desde cambios en las características de la membrana celular (Kanner y cols, 1992) hasta modificaciones en la secuencia de ADN (Furchgott y cols, 1988; Moncada y cols, 1991; Levopire y cols, 1991) (Fig 2-5).

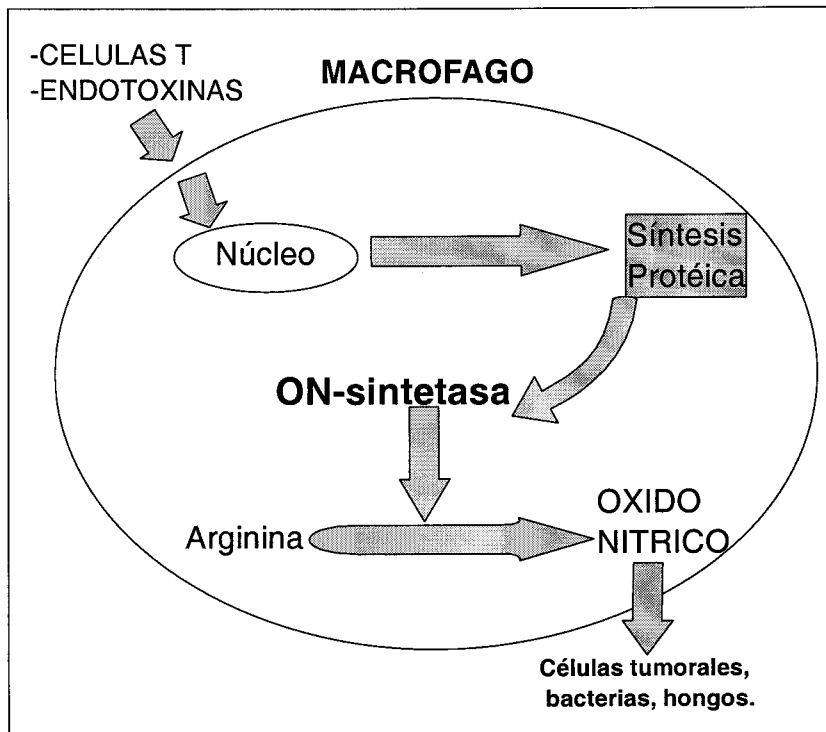


Fig 2-5: NO como molécula efectora.

La expresión de la NOS inducible (calcio-independiente) también aparece después de la estimulación adecuada con lipopolisacárido y gamma-interferón en la pared de los vasos sanguíneos (Radomski y cols, 1990). Este tipo de células constituye sólo una de varias clases de células no pertenecientes al sistema retículo-endotelial que han expresado la NOS inducible, por lo cual podría pensarse que éste es un mecanismo de respuesta inmunológica general, posiblemente verificable en otras células y tejidos (Moncada y cols, 1991).

2.4.4- NO como molécula mensajera

En la identificación del GMP cíclico como primer mensajero convergieron algunos estudios sobre drogas nitrovasodilatadoras con otros sobre neurotransmisores que también producen vasodilatación. Con la observación de que los fármacos nitrovasodilatadores podían activar la forma soluble de la guanilato ciclasa e incrementar de este modo la producción de GMPc, se señaló la producción de NO que caracteriza a estas drogas como posible mecanismo de su acción (Arnold y cols, 1977; Katsuki y cols, 1977). Los detalles de esta reacción, incluyendo la descripción del grupo hemo de la guanilato ciclasa y su papel de receptor para la molécula de NO durante la activación de la enzima (Craven y cols, 1978; Ignarro y cols, 1990), explicaron muchos de los efectos de los nitrovasodilatadores, pero estos hallazgos permanecieron como una curiosidad farmacológica y el NO no se consideró como un posible activador endógeno de la guanilato ciclasa, pues tenía unas características muy inusuales para ser la molécula encargada de esta función tan importante.

El descubrimiento del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Furchgott y cols, 1980) permitió relacionar las evidencias farmacológicas y fisiológicas. A partir de los estudios sobre esta nueva sustancia quedó claro que la mayoría de los vasodilatadores no actuaban directamente sobre el músculo liso vascular, sino sobre las células endoteliales, las cuales a su vez respondían liberando EDRF. Éste logra la relajación en las células del músculo liso por incremento de los niveles de GMPc. Numerosas similitudes entre las propiedades del EDRF y el NO (vida media corta, potentemente inhibidos por hemoglobina u otras hemo-proteína capaces de inactivar el NO, activadores potentes de la guanilato ciclasa) fundamentaron la hipótesis de que las células endoteliales

producían NO y que, además, lo hacían en cantidades suficientes como para explicar los efectos biológicos del EDRF (Palmer y cols, 1987).

Al aclararse el origen del EDRF a partir de la arginina (Palmer y cols, 1989; Palmer y cols, 1988; Marletta y cols, 1988; Dubin y cols, 1990) se aceptó definitivamente que el EDRF era NO o un compuesto relacionado que, en algún momento de su actividad biológica, liberaba NO.

De acuerdo con lo anterior, la actuación del NO a nivel celular viene determinada por su papel activador del sistema del GMPc. Varios estudios por separado han demostrado que el GMPc regula directamente los canales catiónicos de membrana en el mecanismo de transducción de señales luminosas, llevado a cabo en las células fotorreceptoras de la retina, y que está implicado en los incrementos de calcio intracelular originados por la activación de proteinquinasas en las células receptoras del aparato vestibular. Así mismo, se ha relacionado el NO con el control de la función cardíaca, con los decrementos de calcio en células tipo CA₁ del hipocampo y con los efectos del factor natriurético atrial en la excreción de sodio por el riñón. Ha sido identificado también como el mediador de la relajación del músculo liso vascular y de la agregación plaquetaria (Moore y cols, 1991).

Los hallazgos de toxicología, inmunología y farmacología cardiovascular se han unido a la investigación neurofisiológica para sustentar la posible implicación del NO en el tejido nervioso. La estimulación de cortes cerebrales con aminoácidos excitatorios libera un mediador muy lábil con propiedades farmacológicas similares a las del NO (Garthwaite y cols, 1988). El proceso observado consiste en un incremento de los niveles de GMPc mediado por la activación de receptores para esta clase de aminoácidos, tales como el N-metil-D-aspartato (NMDA) y el Alfa-amino-hidroxi-metil-isoxazol propionato (AMPA). A partir de estas evidencias se ha propuesto un modelo de funcionamiento para el sistema del NO dentro del tejido nervioso central, en el cual la activación de los receptores de aminoácidos excitatorios resulta en un incremento de la producción de NO; éste difunde hacia su sitio de acción y, activando la guanilato ciclasa soluble, eleva los niveles de GMPc. Dichos receptores y, por tanto, el NO se han relacionado con procesos de plasticidad neuronal (Mayer y cols, 1987). Debido a que la NO-sintetasa requiere NADPH como cofactor, se sugirió que era la

responsable de la actividad de una enzima del tejido nervioso ampliamente estudiada, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-diaforasa). Mediante estudios histoquímicos se ha identificado a la NO-sintasa con la NADPH-diaforasa neuronal (Hope y cols, 1991). Así la distribución de la NADPH-diaforasa en diferentes regiones del sistema nervioso refleja la distribución de la NO-sintetasa y, por tanto, de las neuronas que producen NO (Mizukawa y cols, 1989; Youg, 1992). Mediante el desarrollo de anticuerpos contra la NOS purificada (Bredt y cols, 1990), se han ubicado los lugares de síntesis del NO en el sistema nervioso (Vincent y cols, 1992), encontrándose tanto en interneuronas como en neuronas de proyecciones largas de diferentes regiones, como cerebelo, cuerpo estriado, corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, sistema visual, sistema reticular ascendente.

Dado que los niveles fisiológicos de calcio intracelular necesarios para la activación de la NOS, inhiben la guanilato ciclasa soluble cerebral (Olson y cols, 1976; Knowles y cols, 1989), se ha sugerido que la guanilato ciclasa no sería activada en aquellas células estimuladas para producir NO, sino que él mismo difunde de manera retrógrada a neuronas presinápticas, a neuronas adyacentes o a células gliales. En éstas últimas también se han observado elevaciones del GMPc mediadas por NO (Angulló y cols, 1992). Aunque estos ensayos se han hecho en cultivo de astrocitos y no se ha podido determinar su significado fisiológico, las evidencias actuales parecen indicar que la respuesta de los astrocitos ante el NO varía mucho según la región celular en la cual se estudie (Angulló y cols, 1992). También se sostiene que algunas regiones de la neurona generadora de NO, dotadas con guanilato ciclasa y bajos niveles de calcio citosólico, no deben ser descartadas como potenciales blancos (Garthwaite, 1991). Todo esto hace particularmente complejo el modelo de funcionamiento del NO.

Por ello es de gran importancia la identificación a nivel sub-celular de las estructuras donde se sintetiza el NO y de aquéllas donde actúa. En este sentido se ha relacionado al NO con la activación de enzimas sintetizadoras de eicosanoides y con variaciones en las membranas lipídicas (Kanner y cols, 1992), con la modificación de proteínas (Levopire y cols, 1991) y con modificaciones génicas (Levopire y cols, 1991). La inestabilidad del NO, principalmente debida a su alta reactividad con el oxígeno y con iones superóxidos, constituye un factor limitante

para su esfera de influencia. Dada la ausencia de un modelo experimental adecuado, se han usado modelos matemáticos de difusión (Crank, 1979), según los cuales la concentración de NO se mantiene estable hasta una distancia de 10 μm , rango dentro del cual se pierde más NO por difusión que por inactivación química. Lo anterior dejaría al NO con un margen de acción equivalente a una esfera de 10 μm de diámetro que incluiría unos cuantos cientos de sinapsis (Garthwaite, 1993). En consecuencia, el NO parece ser un elemento capaz de difundir extensa y efectivamente desde una fuente dada para influir en una variedad de estructuras, a las cuales puede acceder a través de un espacio tridimensional amplio.

2.4.5- Regulación del flujo sanguíneo cerebral

Recientemente se ha prestado atención al efecto vasodilatador del NO y su relación con la circulación cerebral, habiéndose establecido tres puntos de interés principal. El primero es que las fibras nerviosas originadas en el ganglio esfenopalatino (perteneciente al sistema autónomo craneal) y contenedoras de NOS inervan ampliamente los vasos sanguíneos cerebrales mayores, lo cual proporciona un control neurogénico dilatador a los mismos (Toda y cols, 1992). En segundo lugar, el NO generado por las neuronas podría ser el factor de conexión entre la actividad neuronal y los incrementos locales de flujo sanguíneo (Gally y cols, 1990). En tercer lugar, el NO parece actuar de forma significativa en los centros de regulación cardiovascular para modular las señales del sistema simpático, que afectan el tono vascular y la presión arterial (Togashi y cols, 1992). Además de lo anterior, se relaciona al NO con la respuesta vasodilatadora cerebral ante las elevaciones de dióxido de carbono (Iadecola y cols, 1992) y ante la estimulación del núcleo fastigial o de nervios periféricos (Northington y cols, 1992; Dirnagl y cols, 1993). Mediante la infusión de precursores de NO, como la nitroglicerina y el 5-mononitrato de isosorbide (fármacos que poseen origen metabólicos distintos), se ha inducido cefalea y ataques migrañosos, tanto de forma inmediata como prolongada, en pacientes con antecedentes de migraña pero no en pacientes sanos. En los mismos estudios, el aporte de donadores de grupos sulfidrilo (SH), aumentan la producción de NO a partir de nitroglicerina, por lo

cual se han relacionado las cefaleas vasculares y la migraña con una susceptibilidad especial al NO (Olesen y cols, 1993).

2.4.6- Acción neurodegenerativa

El NO se le ha atribuido un posible papel en la degeneración neuronal en base a su capacidad, tanto para inactivar enzimas claves del metabolismo celular como para reaccionar con iones superóxido y generar radicales libres altamente tóxicos (Moncada y cols, 1991; Garthwaite y cols, 1991; Meldrum y cols, 1990; Beckman y cols, 1990). De hecho, los macrófagos aprovechan estas propiedades para lograr su acción citostática y citotóxica sobre las bacterias, hongos y células activadas de la microglía pudiendo producir NO para eliminar neuronas cerebelares co-cultivadas (Boje y cols, 1992). Se ha propuesto que las elevaciones del GMPc mediadas por el NO aumentan la toxicidad del factor de necrosis tumoral (Sherman y cols, 1992) y que la exposición *in vitro* de oligodendrocitos y mielina al factor de necrosis tumoral produce citolisis (Selmaj y cols, 1988). Lo anterior parece concordar con el hecho de que los niveles del factor de necrosis tumoral en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple se correlacionan con la seriedad y progresión de la enfermedad (Sharief y cols, 1991). Por lo tanto, la destrucción autoinmune de mielina y oligodendrocitos que se observa en la esclerosis múltiple podría deberse a un aumento (vía citoquinas) de la producción de NO por macrófagos, microglía, células del músculo liso o células endoteliales en el sistema nervioso central (Sherman y cols, 1992).

Dado que estos estudios se fundamentan en la vía de la NOS inducible, se ha planteado la cuestión de si una sobreproducción de NO por la NOS constitutiva también podría ser causante de daño neuronal. En cultivos de células corticales se ha demostrado que la toxicidad de glutamato mediada por el receptor NMDA (un hipotético contribuyente al daño isquémico) es producida por el NO (Dawson y cols, 1991). Asimismo, en modelos *in vivo* de isquemia focal cerebral se ha encontrado que los inhibidores de la NOS producen una significativa protección tisular (Nowicki y cols, 1991). Sin embargo, también se han presentado evidencias en contra de los hallazgos anteriores (Dermerle-Pallardy y cols, 1991; Yamamoto y cols, 1992), lo cual hace patente la necesidad de encontrar inhibidores más selectivos de la NOS cerebral, desprovistos de acciones sobre

otros mecanismos mediados por el NO, para tener una valoración fiable de esta hipótesis.

2.4.7- Inervación autonómica del músculo liso

Además de las vías del dolor, el NO se ha localizado también en otras zonas del sistema nervioso periférico. Estudios de histoquímica para NADPH-diaforasa y de inmunohistoquímica para NOS han demostrado positividad en poblaciones de neuronas a lo largo del plexo mientérico del tubo digestivo, donde parece ser el principal neurotransmisor NANC (LiC y cols, 1990). También se le ha encontrado en la musculatura lisa urogenital, particularmente en uretra y cuerpo cavernoso (Dokita y cols, 1991; Rajfer y cols, 1992). Sin embargo, mientras que en algunos de estos sitios (como el músculo anocócigeo de la rata) la respuesta al estímulo de nervios NANC puede ser abolida casi completamente por los inhibidores de la NOS, en otros (como el fundus gástrico) sólo puede reducirse parcialmente (Sneddon y cols, 1992). En algunos estudios se han encontrado sustancias como VIP (Li y cols, 1990) y sustancia P (Sneddon y cols, 1992) colocalizadas con el NO, sugiriendo que el NO actúa en combinación con otras moléculas para lograr la relajación del músculo liso producida por los nervios NANC. Además, el NO puede reducir directamente la sensibilidad de las proteínas contráctiles al calcio intracelular (Ozaki y cols, 1992), indicando que los mecanismos de respuesta celular ante el NO son probablemente más complejos que la sola elevación del GMPC. La histoquímica para NADPH-diaforasa también ha sido positiva en neuronas aferentes viscerales, pertenecientes a los ganglios de las raíces posteriores de niveles torácicos bajos (Aimi y cols, 1991). Sin embargo, la interpretación de estos hallazgos debe ser cuidadosa, ya que, si bien hay evidencia sobre la localización de NADPH-diaforasa (Valtschanoff y cols, 1992) y NOS (Valtschanoff y cols, 1992) en regiones celulares similares de la médula espinal, no se ha encontrado equivalencia en cuanto a regiones subcelulares.

2.5- PROSTAGLANDINAS

En 1930, Kurzrok y Lieb, dos ginecólogos norteamericanos que intentaban la inseminación artificial en mujeres, descubrieron que el semen podía producir una poderosa contracción del músculo uterino del mismo modo que ocurría estimulando el músculo uterino “*in vitro*” (Kurzrok y cols, 1931). Varios años más tarde, Goldblatt en Inglaterra (1935) y Von Euler en Suecia (1936) observaron en el semen humano la presencia de un factor capaz de producir contracción del músculo liso uterino y disminución de la presión arterial, cuando se administraba de forma intravenosa. Von Euler, en la creencia errónea de que este componente del líquido seminal derivaba de la glándula prostática, lo denominó prostaglandina (Von Euler, 1936).

Posteriormente se descubrió que la fuente principal de estas sustancias eran las vesículas seminales, pero ya el término prostaglandinas había sido universalmente aceptado. En los siguientes años hubo pocos avances en estudio de las prostaglandinas hasta 1960 en que un grupo de investigadores suecos aislaron por primera vez dos prostaglandinas, la prostaglandina E (PGE), llamada así por obtenerse a partir de un extracto de éter dietílico (Bergström y cols, 1960), y la prostaglandina F (PGF) a partir de un extracto con tampón fosfato (Bergström y cols, 1960).

Hacia 1960 se descubrió también que las prostaglandinas derivaban del ácido araquidónico. A partir de la purificación de PGE y PGF se descubrió que durante el proceso de purificación las estructuras podían ser modificadas y se obtuvieron otras 3 prostaglandinas que se denominaron PGA, PGB y PGC. También se descubrió un isómero de la PGE que se produce biológicamente, al cual se llamó PGD (Segura, 1983).

Los detalles precisos de la estructura y metabolismo de las prostaglandinas no se conocieron hasta finales de la década de los 60, pero desde varios años antes se conocía que éstas ejercen importantes funciones reguladoras sobre varios sistemas, tales como el tono vascular, secreción gástrica, contracción uterina, función intestinal, pulmonar y renal (Segura, 1983).

2.5.1- Estructura química y biosíntesis de las prostaglandinas.

Las hormonas, los autacoides y otras sustancias intensifican la biosíntesis de los eicosanoides al interactuar con los receptores en la membrana plasmática que se acoplan con las proteínas reguladoras de unión con GTP (proteínas G); el resultado es la activación directa de las fosfolipasa (C, A₂ o ambas) o incremento de las concentraciones citosólicas de calcio que también activan las enzimas comentadas (Smith, 1992). Se piensa que los estímulos físicos hacen que penetre el ion calcio a la célula al alterar su membrana y, así, activar la fosfolipasa A₂. La fosfolipasa C desdobla el enlace fosfodiéster, con lo cual se forma un 1,2-diglicérido. Después de lo anterior, se libera ácido araquidónico a partir del diglicérido por intervenciones seriadas de las lipasas de diglicérido y de monoglicérido (Okazaki y cols, 1981). El ácido araquidónico, posee 20 átomos de carbono y 4 dobles enlaces y tiene una configuración en horquilla (Fig 2-6).

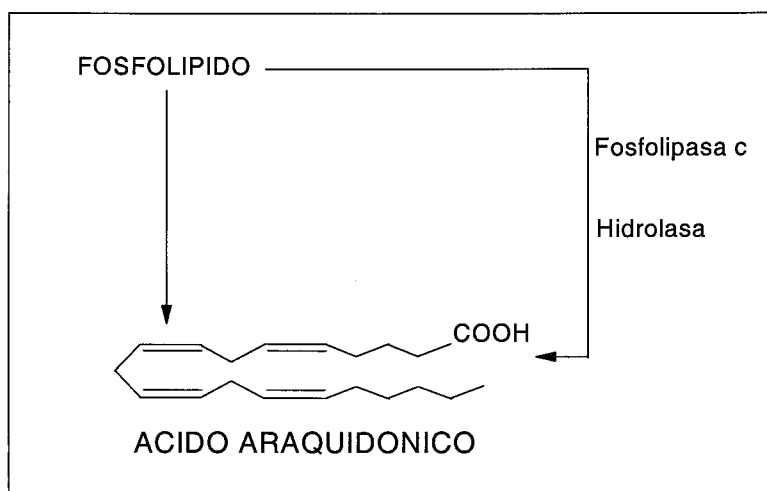


Fig 2-6: Biosíntesis del Acido Araquidónico.

El ácido araquidónico está presente en la membrana de la mayoría de las células, integrado en los fosfolípidos celulares.

2.5.2- Biosíntesis de las prostaglandinas

Las prostaglandinas tienen una estructura básica de 20 átomos de carbono dispuestos en horquilla, con un anillo pentagonal en la zona media de la cadena.

Las prostaglandinas se sintetizan y catabolizan con rapidez extrema. No son almacenadas en las células, sino que se sintetizan y secretan a medida que son requeridas por las células de una región determinada, por lo cual tampoco son transportadas como otras sustancias endocrinas, es decir, se fabrican bajo demanda en el propio lugar de acción, son metabolizadas rápidamente y desaparecen también rápidamente de la circulación.

El ácido araquidónico puede ser metabolizado por dos sistemas enzimáticos principales, la ciclooxigenasa que produce la formación de un anillo y oxigena la molécula, y la lipooxigenasa que sólo introduce oxígeno.

a- Vía de la ciclooxigenasa

Por la acción de esta enzima, se introduce oxígeno molecular en ácido graso y se constituye el anillo pentagonal entre los carbonos 8 y 12, dando lugar al endoperoxido PGG₂, con liberación de radicales inestables y altamente tóxicos que pueden inactivar a la ciclooxigenasa (Segura, 1983).

Los endoperoxidos son convertidos por 3 vías a prostaglandinas u otros eicosanoides. Por medio de la primera vía, la vía de la isomerasa-reductasa son convertidas en las prostaglandinas estables PGD₂, PGE₂ y PGF_{2α}. A través de la segunda vía, la vía de la tromboxano-sintasa convierte el PGH₂ en tromboxano A₂ (TXA₂) (Smith, 1992), que es junto a la angiotensina II, un vasoconstrictor muy potente y un activo inductor de la agregación plaquetaria. Tiene una vida media de unos 30 segundos y es hidrolizado a tromboxano B₂ (TXB₂), un compuesto estable pero inactivo. Por último, mediante la vía de la prostaciclina-sintetasa, se produce la prostaglandina I₂ (PGI₂) o prostaciclina, que es más conocida. Esta última vía enzimática se lleva a cabo fundamentalmente en las células endoteliales vasculares y en otras estructuras de la pared vascular (Segura, 1983) (Fig 2-7).

b- Vía de la lipooxigenasa.

La lipooxigenasa, presente en la mayoría de los leucocitos, da lugar a la formación del 5-hidroperoxidoeicosatetraenoico (5-HPETE), a partir del ácido araquidónico. El 5-HPETE es el precursor de una serie de sustancias no bien conocidas hasta hace muy pocos años llamadas leucotrienos (Samuelsson, 1983; Samuelsson y cols, 1987; Sigal, 1991). Estos leucotrienos son denominados A₄, B₄, C₄, D₄ y E₄ y son hasta 10.000 veces más potentes que la histamina y las prostaglandinas como estimulantes del músculo liso bronquial. Los leucotrienos están fuertemente involucrados en la enérgica y prolongada constricción de los bronquios (Segura, 1983).

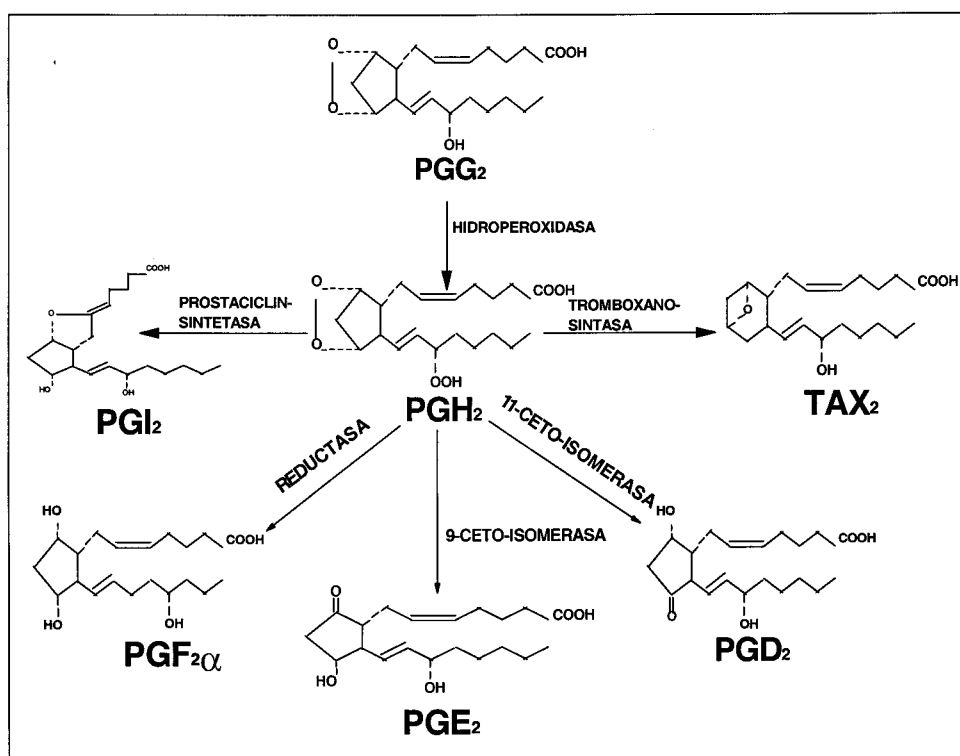


Fig 2-7: Biosíntesis de prostaglandina.

2.5.3- Las prostaglandinas y el AMPc

Las acciones biológicas de las prostaglandinas son las más variadas de todos los compuestos naturales. Sus acciones están íntimamente relacionadas con modificaciones en el AMPc, de forma que una misma prostaglandina estimula la adenilciclase en un tejido y la inhibe en otro. Cuando las prostaglandinas originan un incremento del AMPc, se potencia la acción de la célula diana. Por el

contrario, cuando la función celular es deprimida por las prostaglandinas, se produce una reducción del AMPc. Sin embargo, el descubrimiento de la PGI₂ y del tromboxano (TX)A₂, hace aparente que estos compuestos manifiestan acciones más potentes que las PGE sobre AMPc y el GMPc. Así, la PGI₂ es más potente que la PGE₁ en la estimulación de la adenilciclase plaquetaria. Dado que el receptor de PG presenta una mayor sensibilidad a la PGI₂, parece bastante probable que ésta constituya el ligando natural que se fija al receptor. Por otra parte, el TXA₂ constituye un potente inhibidor del AMPc estimulado por la PGI₁ en las plaquetas humanas, y la inhibición de TXA₂ por el imidazol bloquea las acciones de las hormonas lipolíticas (catecolaminas) tanto sobre la lipólisis como sobre la formación de AMPc, lo cual sugiere que el TXA₂ puede ser necesario para el ensamblaje entre los receptores y la adenilciclase.

Las prostaglandinas ejercen un papel en la transmisión de mensajes de hormonas tróficas tales como la hormona luteinizante (LH), la tirotrópina (TSH) y la adrenocorticotropina (ACTH). Estas hormonas tróficas interactúa con un receptor de membrana, lo cual origina un incremento de la actividad de la prostaglandina sintetasa y de la producción de prostaglandinas. Éstas, a su vez, activan la adenilciclase de membrana, probablemente a través de un receptor prostaglandínico específico. A su vez, el incremento resultante del AMPc generado a partir del ATP produce su acción sobre la función celular. Así, las prostaglandinas actuarían como un segundo mensajero y el AMPc como un tercer mensajero. Sin embargo, el aspecto más sorprendente reside en la notable inespecificidad de la acción prostaglandínica, aumentado la acumulación de AMPc en ciertos sistemas e inhibiéndola en otros. A diferencia de otros estimuladores de la adenilciclase, cuya acción se ve restringida a una célula diana concreta (hormona paratiroidea [PTH] que incrementa el AMPc en riñón y hueso, pero no en otros tejidos) las prostaglandinas ejercen efectos sobre el AMPc de prácticamente todas las líneas celulares. Parece bastante verosímil, que las prostaglandinas actúen como mediadores intracelulares locales que respondan a estímulos regionales con respuestas específicas de las células y tejidos implicados (Kuehl y cols, 1976).

2.5.4- Efectos de las prostaglandinas sobre las funciones fisiológicas.

Las prostaglandinas tienen importantes funciones sobre una gran cantidad de órganos y sistemas, en muchos casos con acciones contrapuestas (Samuelsson y cols, 1978; Vane y cols, 1982; Dun, 1983).

a- Sistema nervioso y cerebro

Algunas prostaglandinas pueden producir fiebre cuando se administran en los ventrículos cerebrales, probablemente por acción sobre el centro termorregulador. Por otra parte, la PGD_2 pueden modular la liberación de neurotransmisores en las terminaciones adrenérgicas.

b- Sistema endocrino

Diversos tejidos endocrinos reaccionan a las prostaglandinas. En diversas especies, la administración sistémica del compuesto de tipo E_2 aumenta las concentraciones circulantes de ACTH, hormona de crecimiento, prolactina y gonadotropinas; el efecto recién mencionado al parecer entraña la participación de un sitio hipotalámico de acción (Behrman, 1979).

c- Sistema respiratorio

La $PGF_{2\alpha}$ contrae el músculo liso bronquial, mientras que la PGE_2 y PGI_2 lo relajan. La SRS-A producida por la acción de la lipooxigenasa sobre el ácido araquidónico contrae el músculo liso bronquial y tiene gran importancia en el mecanismo del asma. La PGE_2 a veces produce broncoconstricción (Mathe y cols, 1977; Spannhake y cols, 1981)

d- Sistema gastrointestinal.

La PGE_2 y PGI_2 disminuyen la secreción gástrica. Sobre el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica tienen efectos contrarios, ya que la PGI_2 lo incrementa y la PGE_2 lo reduce. Las PGs aumentan la secreción de moco gástrico y tienen un efecto citoprotector de la mucosa del aparato digestivo.

En el intestino, la PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ disminuyen la reabsorción de líquidos y pueden producir diarrea (Bennett, 1977; Wilson y cols, 1981). En cambio, la PGI_2 inhibe este efecto. La PGI_2 relaja el músculo liso intestinal mientras la $PGE_{2\alpha}$ lo contrae.

e- Sistema reproductor.

La PGE₂ y PGF_{2α} inducen contracciones uterinas y se ha sugerido que serían las causantes de la dismenorrea. En el mercado existen derivados sintéticos de PGF_{2α} que son usados como inductores del parto y como abortivos. En algunos animales la PGF_{2α} es la hormona responsable principal de la luteolisis.

f- Sistema cardiovascular.

El TXA₂ es un potente vasoconstrictor, la PGI_{2α} tiene moderada acción vasoconstrictora, mientras la PGE₂ tiene el efecto contrario pero también se han identificado efectos constrictores (Bergström y cols, 1968). Se ha sugerido también que la PGE₂ es la responsable del mantenimiento del ductus arterioso tras el nacimiento. h- Sistema hematológico. Además de los efectos sobre el tono vascular que ejercen las PGS, el TXA₂ es un potente estimulador de la agregación plaquetaria, mientras la PGI₂ es un potente inhibidor de dicha acción. La PGE₂ inhibe la diferenciación de linfocitos B en plasmocitos que secretan anticuerpos. También impide la proliferación de linfocitos T estimulada por mitógeno. Se han mostrado que las prostaglandinas exógenas prolongan la vida de un aloinjerto de piel (Goldyne y cols, 1981; Davies y cols, 1984).

g- Riñon.

Las prostaglandinas que se encuentran en los riñones por ejemplo PGE₂ y PGI₂ ejercen una importante función reguladora en el control del flujo sanguíneo renal y filtración glomerular. El tejido arteriolar y glomerular sintetizan grandes cantidades de PGE₂ y PGI₂ en respuesta a la acción de sustancias vasoconstrictoras como angiotensina y vasopresina y contrarresta en parte la acción de estos péptidos (Segura, 1983). La PGE₂ también inhibe la resorción de cloruro en la rama ascendente gruesa del asa de Henle en el conejo (Stokes, 1979).

Por otra parte, estas dos prostaglandinas, en especial PGI₂, estimulan la secreción de renina (Bolger y cols, 1981; Keeton y cols, 1980).



OBJETIVOS



El objetivo de este trabajo fue profundizar en el estudio de algunos mecanismos de acción de la melatonina que estas mediados por receptores, y otros que no están mediados por receptores, es decir, la interacción de ésta con calmodulina y la acción inhibidora de la melatonina. Para ello se plantearon los siguientes objetivos.

- 1- Estudiar el efecto de la melatonina sobre la actividad NOS en el hipotálamo de rata.
- 2- Mostrar el efecto inhibidor de la melatonina sobre la producción de PGE₂ inducida por norepinefrina.
- 3- Estudiar el efecto inhibidor de la melatonina sobre la producción de AMPc inducida por norepinefrina.
- 4- Estudiar el efecto inhibidor de la melatonina sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina.
- 5- Mostrar la presencia de un nuevo mecanismo de interacción independiente que participa en la regulación de la liberación de LHRH en el hipotálamo de rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

1- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

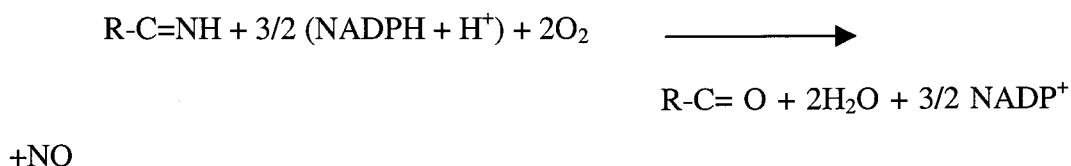
Se utilizaron ratas WISTAR, machos y hembras de un peso comprendido entre los 200 y 300 gramos. Los animales se mantuvieron en cámaras de aclimatación con fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y temperatura de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e alimentaron todas ellas, hasta el momento del sacrificio, con una dieta standard.

2- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA NOS.

2.1- Fundamento del análisis.

La actividad de la NOS en el hipotálamo fue medida por la conversión de L-arginina y oxígeno en desarrollado un método por el cual la actividad de la NOS es registrada como la formación de [³H]citrulina a partir del sustrato L-[³H] tras la separación por cromatografía, siguiendo el método descrito por bredt y Snyder (1989). Como puede observarse la reacción es estequiométrica para la formación de NO y citrulina (Kwles y Palacios, 1989).

La reacción general de óxido-reducción catalizada por la NOS es:



Donde R-C es la parte común a arginina y citrulina

C=NH es el grupo guanidino de la L-arginina y C=O es el grupo carbonilo de la citrulina.

El enzima funciona adecuadamente cuando al tampón tiene todos los requerimientos. Es decir, se añadieron el sustrato (L-arginina) y los cofactores.. También se adicionó al tampón de análisis un inhibidor de la arginasa: la inosina, para que el enzima no se detuviera por falta de sustrato.

2.2- Reactivos

a- Tampón de Homogenización.

- Tris-HCl (25 mM) y DTT (1 mM). La solución se justía a pH = 7.6
- Leupeptina (10 µg/ml)
- Aprotinina (10 µg/ml)
- Pepstatina (10 µg/ml)
- PMSF (1 mM)

b - Tampón de ensayo de la actividad de la NOS

- Tris-HCl (25mM) y DTT (1 mM). La solución se justía a pH = 7.6
- BH₄ (30 μM)
- FAD (10 μM)
- Inosina (0.5 mM)
- CaCl₂ (0.1 mM)
- L-Arginina (10 μM)
- [³H]-arginina (40 nM)
- BSA (0.5 mg/ml)

c - Tampón de ensayo de la actividad de la NOS usando [EGTA]

- Tris-HCl (25 mM) y DTT (1mM). La solución se ajustó a pH = 7.6.
- BH₄ (30 μM)
- FAD (10 μM)
- Inosina (0.5 nM)
- EGTA (0.5 mM)
- L-arginina (10 μm)
- [³H]-arginina (40 nm)
- BSA (0.5 mg/ml)

d- Tampón para detener la reacción (tampón de parada)

- Hepes (100 mM)
- EGTA (10 mM)
- L-citrulina (1 mM)

El tampón se ajustó a pH=5.5 y se conservó a 4°C.

e- NADPH (5 mM)

f- Preparación de las columnas cromatográficas (columna de Dowex)

1 volumen de resina Dowex-50W concentrada ocho veces (Dowex 50x8) se resuspendió en 3 volúmenes de NaOH, 1M. Tras mantener en agitación suave, durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante de NaOH y se lavó la resina con

agua repetidas veces, hasta que el pH del sobrenadante sea igual al del agua. Se añadió 1.5 ml de resina en pipetas Pasteur con la punta obturada con lana de vidrio.

2.3- Procedimiento

El hipotálamo se extrajo del cerebelo de la rata, se cortó resuspendiendolo en 1ml de tampón de homogenización. Durante 15s se sonicó la glandula 6 veces a 50 MHZ, con 1 minutos de intervalo entre sonicaciones. Tras la sonicación del homogeneizado, un a alícuota de 10 µl del mismo se añadió a 50µl de tampón de análisis y se completó hasta 100 µl con agua y/o los reactivos correspondientes. La reacción se activó con 15 µl de NADPH y se incubo durante 30 minutos a 37°C con agitación suave. La reacción se detuvo añadiendo 400 µl de tampón de parada a 4°C.

Tras detener la reacción, se pasó todo el volumen de las muestras de un ensayo a las columnas de Dowex-50 x 8, cargadas con Na⁺ y previamente equilibradas con tampón de parada de la reacción. Finalmente, las columnas de Dowex se lavaron con 0,6 ml de agua desionizada, 2 veces, para eluir la L-citrulina. Cuando las columnas de Dowex terminaron de eluir, se transfirió el eluido en viales de centelleo a los que se añadieron 4 ml de líquido de centelleo para muestras líquidas.

La radioactividad del [³H] fue medida utilizando un contator de centelleo. Para los tubos blancos, los 10µl del tampón de homogeneizado se sustituyeron por 10 µl del tampón de homogenización.

2.4- Cuantificación.

Calculo de la actividad espesifica (A.S)

$$A.S = \frac{(cpm-B) \times A \times 1nmol}{A.T \times 30 mn}$$

Donde:

B es el tejido blanco.

A es la actividad del [³H]-Arginina marcada en cada tubo.

1nmol es la molaridad de arginina fría.

A.T es la actividad total.

30 minutos es el tiempo de incubación.

3- DETERMINACIÓN DE PROTEINAS

3.1- Fundamento del análisis.

Para la determinación del contenido total de proteínas, existen varios métodos. En nuestro caso se utilizó una técnica colorométrica basada en la reacción del grupo alcohol de los residuos de la proteína (tripsina y triptofano) con el reactivo Folin Ciocalteau según el método descrito por Lowry y cols (1951) y modificado por Markwel y cols (1978) empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

3.2- Reactivos

a- Solución A

- Na_2CO_3 (2%)
- NaOH (0.4%)
- Tartrato sódico/potásico (0.16)
- SDS (1%)

b- Solución B

- $\text{SO}_4\text{Cu } 5\text{H}_2\text{O}$, (4%)

c- Solución de Folin-Cicalteau

1 volumen de Folin/1 volumen de agua, (V/V)

d- Solución C

Se mezcla 100 partes de la solución A con 1 parte de la solución B.

e- BSA, proteína estándar

3.3- Procedimiento

Se añadió 20 μl de muestra a 750 μl de reactivo a 20 y 75 μl de reactivo de Folin-Cicalteau y agua destilada hasta completar 875 μl . Se incubó durante 45 minutos, a temperatura ambiente, en oscuridad. La lectura de la absorbencia a 660nm.

3.4- Cuantificación.

Para la transformación de las absorbencias en mg de proteínas se utilizó una curva estándar de un patrón de albúmina de suero bovino (BSA) en el intervalo de 0-50 μg .

Cantidad de proteína es en (mg/ml)

Actividad especifica es en A.e = nmol/mg de proteína/min.

4- CULTIVO DE LA GLANDULA HIPOTÁLAMICA

4.1- Extracción del hipotálamo.

Las ratas se sacrificaron por decapitación y después de abrir la cabeza, se extrajo el hipotálamo junto a los nervios ópticos. Tras la inmersión de la glándula en el medio de cultivo para lavarla y con la ayuda de bisturí, nos quedamos con el hipotálamo medio basal (MBH) según el método descrito por Rettori y cols (1991) y Antunes-Rodrigues (1970).

4.2- cultivo de medio-basal del hipotálamo

- Medio de cultivo

Para la realización de algunos experimentos se utilizaron los siguientes medio de cultivo descrito por Rettori y cols (1992).

- Krebs-Ringer-bicarbonato/glucosa (47.6 g/5ml)

- Acido ascorbico (0.06 mM)

- Bacitracina (23 μ M)

- Bicarbonato (1.26 g/5ml)

El medio de cultivo una vez preparado se filtró ajustándole el a pH = 7.4. El filtro usado fue de 0.22 μ m de diámetro. El medio de cultivo se conservó posteriormente a 4°C.

4-3- Procedimiento general del cultivo.

Siguiendo el método explicado en la seccion (a) se preincubó la parte medio basal de la glándula durante 30 minutos a 37°C en 500 μ l del medio correspondiente, saturado durante 1 minutos con carbógeno (95% O₂ y 5 % CO₂). Dicho periodo de preincubación es necesario para conseguir la acomodación del tejido al medio.

Tras esta preincubación, las MBH se colocaron individualmente en otros tubos de cultivo con un volumen final de 300 μ l de medio por tubo. A continuación, se suplementaron con los distintos reactivos. Se saturó el medio de incubación con carbógeno. A continuación, los tubos se cerraron herméticamente y se incubaron durante 30 min a 37°C, con agitación.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se guardó el sobrenadante a de 4°C o -20°C según el tiempo hasta su utilización para la determinación de la concentración de PGE₂ y LHRH y la glándula a -80°C hasta el momento de la determinación de la concentración AMPc.

5- DETERMINACIÓN DE LA PROSTAGLANDINA E₂.

5.1- Fundamento del análisis.

La determinación de la prostaglandina E₂ se realizó siguiendo el método de inmunoanálisis específico, con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en la síntesis de la prostaglandina E₂ a partir del ácido araquidónico y la ciclooxigenasa-1. La síntesis de PGE₂ fue medida utilizando la técnica ELISA.

5.2- Reactivos

- Estándar o calibrador de PGE₂ (0, 10, 50, 250, 1 000 y 5 000 pg/ml).
- Anticuerpo secundario de PGE₂ de conejo.
- Tampón fosfato.
- Sustrato de para-nitrofenil fosfato.
- Solución de lavado.
- Solución de parada.
- Placa de 96 pocillos de anticuerpo primario anti PGE₂.

5.3- Procedimiento.

La reacción comenzó incubando cada MBH en 300 µl de medio de cultivo suplementado con melatonina y norepinefrina o melatonina. Tras la adición de estos compuestos, el cultivo se incubó durante 30 min a 7°C. Posteriormente, las glándulas se congelaron a - 80°C hasta el momento de la determinación de la AMPc y el sobrenadante se utilizó por la determinación de PGE₂.

5.4- Determinación de PGE₂ por ELISA

Una vez transferido el sobrenadante a hielo, se añadieron 900µl de acetato de etilo y 30µl de HCL, 0.25 N, la mezcla se agitó fuertemente y se centrifugó a

3000 rpm durante 10 mn. 900 µl de la fase orgánica fueron transferidas a otro tubo. La muestra fue secada en el estufa a temperatura inferior a 40°C o con Nitrogeno. Una vez la muestra secada, se añadieron 250 µl de tampón y se agitó fuertemente.

Posteriormente se transfirieron 100 µl de la suspensión de cada muestra a los pocillos de la placa que tiene el anticuerpo policlonal de PGE₂. A cada uno de ellos se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario de PGE₂ de conejo y se agitó.

La incubación se realizó a 4°C durante una noche. Posteriormente, se incubó con 100 µl de de conjugado fosfato alcalino de PGE₂ durante 3 horas, a 4°C. Tras la incubación de la placa se lavaron los pocillos 3 veces con el tampón de lavado. Mientras dura el tiempo de lavado, se disolviéron las pastillas de para-nitrofenyl fosfato en el sustrato de la dilución: 1 pastilla en 12.5 ml de sustrato de la dilución de para-nitrofenil fosfato.

Una vez terminados los lavados, se añadieron 300 µl de la solución preparada de para-nitrofenyl fosfato, se incubó durante una hora a 37°C y finalmente se añaderon 50 µl de solución de parada para la reacción. Las [PGE₂] fue medida por medidas por absorbencia a 405nm.

5.5- Analisis de los resultados

En cada experimento, para valorar los resultados, necesitamos una curva estandar de un patrón de Pge₂ en el intervalo de 0-10-50-250-1.000 y 5.000 pg/ml, que se usa el mismo protocolo.

5.6- Cuantificación

La concentración de PGE₂ de cada muestra se calculó siguiendo la curva estándar, en pg/ml.

6- DETERMINACIÓN DEL AMPc

6.1- Fundamento del análisis.

La concentración de AMPc se valoró por radioinmunoanálisis (RIA), utilizando para ello un kit, capaz de cuantificar concentraciones de AMPc del orden femtomolar. El RIA de AMPc se fundamenta en la elevada capacidad antigénica del AMPc, que posibilita la producción de anticuerpos (AC) muy específicos frente a él a partir del suero de conejos. Además el AMPc se puede marcar radioactivamente con ^{125}I , preparándose en la forma ^{125}I -AMPc. Al añadir una elevada cantidad de ^{125}I -AMPc a una muestra que contiene una cantidad desconocida de AMPc y a continuación se añade una cantidad limitada de anticuerpos, ambas formas de AMPc compiten por unirse al anticuerpo específico, formándose complejos del tipo Ac-AMPc y Ac- ^{125}I -AMPc. Cuanto más AMPc contenga la muestra, más trazador libre queda. Al precipitar por centrifugación, posteriormente, los complejos Ac-AMPc y Ac- ^{125}I -AMPc mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo y desechando el sobrenadante, la radioactividad que queda en el precipitado corresponde sólo al complejo Ac- ^{125}I -AMPc, siendo inversamente proporcional a la cantidad de AMPc que tenga la muestra.

6.2- Reactivos

- Excepto la muestra, el resto de los componentes pertenecen al Kit
- AMPc estándar: AMPc a una concentración 32 pM.
- Trazador: Adenosina 3', 5'-ciclo ácido fosforico 2'-O succinil-3-[^{125}I] iodotirosina metil ester (^{125}I -AMPc), Diluido en tampón de análisis de forma que 100 μl corresponden a 27. 000 cpm.
- Anticuerpo primario: Suero conejo anti-succinil AMPc.
- Anticuerpo secundario: Suero mono-anti conejo.
- Tampón de análisis: acetato 0.05 M, pH = 5.8, thimerosal 0.01 %.

- Muestra: obtenida por reconstitución, añadiendo 200 μ l de tampón al extrato seco obtenido.

6.3- Procedimiento

Para la extracción de AMPc, a todos los tubos que contienen el tejido del hipotálamo medio basal (MBH), se añadieron 200 μ l de tampón de cultivo de la glándula (Krebs Ringer/Bicarbonato). Se sonicó durante 10 segundos y se añadieron 800 μ l de metanol a los 200 μ l de homogenado.

Las muestras fueron primero centrifugadas durante 10 min a 12.000 g y posteriormente se recuperó la fase orgánica. Las muestras fueron secadas en el estufa a 50°C. Una vez secadas, se añadieron en cada muestra 250 μ l de tampón, 50 μ l de anticuerpo primario más 50 μ l de trazador. Se agitaron los tubos y se incubaron durante 3 horas a 4°C. Una vez terminada la incubación, se añadieron 250 μ l de anticuerpo secundario a cada muestra, (excepto a los AT), se agitaron y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente con el fin de que el segundo anticuerpo se uniese a los complejos antígeno/anticuerpo formados durante la primera incubación. Una vez terminada la incubación, se centrifugaron los tubos durante 10 min a 3.000 rpm y posteriormente, se desechó el sobrenadante aspirando al vacío, contándose a continuación la radioactividad de los precipitados (fracción ligada) en el contador gamma durante 2 min.

6.4- Analisis de los resultados.

Se construyó una curva estándar a partir de los valores de los estándares en el intervalo de 0-25-50-100-400-800 y 1 600 fmol, tomándose como 0 de AMPc al punto B₀ (blanco de la reacción). La radioactividad ligada (B) encontrada en cada concentración estándar y en las muestras, se expresa como porcentaje de la radioactividad en B₀. La cantidad de AMPc (fmoles/tubo) en cada muestra, se calculo por interpolación a partir de la curva estándar.

6.5- Cuantificación.

Concentración de AMPc en pmol/ml

7- DETERMINACIÓN DE LHRH.

7.1- fundamento del análisis.

La liberación de la hormona LHRH del hipotálamo por exocitosis en la sangre es el resultado de la producción de AMPc a partir de ATP por la acción de la enzima adenilato ciclasa.

La determinación de LHRH se valoró por RIA. El RIA de LHRH, se fundamenta en la elevada capacidad antigénica del LHRH, que posibilita la producción de anticuerpos (Ac) muy específicos frente a él a partir del suero de conejo a los que se le ha inyectada y en la facilidad con que se puede marcar radioactivamente con ^{125}I , preparándose en la forma ^{125}I -LHRH. Al añadir una elevada cantidad de ^{125}I -LHRH a una muestra que contiene una cantidad conocida de LHRH y a continuación se añade una cantidad limitada de anticuerpos, ambas formas de LHRH compiten por unirse al anticuerpo específico, formándose complejos del tipo Ac-LHRH y Ac- ^{125}I -LHRH. Cuanto más LHRH contengan las muestras, más trazador libre queda. Al hacer posteriormente precipitar por centrifugación los complejos Ac-LHRH y Ac- ^{125}I -LHRH mediante un anticuerpo anti-inmunoglobina de conejo unido a polimeros magnetizables y al desechar el sobrenadante con el trazador libre, la radioactividad que queda en el precipitada corresponde sólo al complejo Ac- ^{125}I -LHRH siendo inversamente proporcional a la cantidad de LHRH que tenga la muestra.

7.2- Reactivos.

- Estándar o calibrador LHRH: [0-5-10-20-40-80-160-320 pg/ml].
- Anti-suero LHRH de conejo
- [^{125}I] Histidina-LHRH
- Tampón. Borato.
- Suero anti-conejo.

7.3- Procedimiento

Tras la preincubación, el hipotálamo medio-basal transfirió a 300 μ l del medio de cultivo en presencia o ausencia de los reactivos correspondientes durante 30 min. Una vez terminada la incubación, se midió LHRH en el sobrenadante.

Se añadieron 2 ml de etanol 98% a 300 μ l del sobrenadante, se agitaron los tubos durante 2 min (el etanol inhibe la proteinasa de LHRH) y se centrifugaron durante 15 min a 2.000 g a 4°C. La fase orgánica fue transferida a otro tubo y se secó en la estufa a 37°C o con nitrógeno. Una vez seca, la muestra se resuspendida en 500 μ l de tampón LHRH.

A continuación, se añadieron 100 μ l de anticuerpo primario a 200 μ l de la muestra y los tubos fueron agitados e incubados durante 6 horas a la temperatura de 4°C. Después de este tiempo, se añadieron 100 μ l del trazador [¹²⁵I] LHRH, se agitó y se incubó durante 18 horas a temperatura 4°C.

Tras la incubación, se añadieron 100 μ l de anticuerpo secundario a cada muestra (excepto la actividad total) y se incubaron 30 min a temperatura ambiente con el fin de que el segundo anticuerpo pueda unirse a los complejos antígeno/anticuerpo formado durante la primera incubación. Finalmente, se añadió 1 ml de agua y se centrifugó durante 10 min a 2000 g. Se descartó el sobrenadante aspirando al vacío, y el precipitado, que tiene la fracción ligada, se cuantificó en el contador γ durante 2 min.

7.4- Analisis de los resultados.

Se construyó una curva estándar a partir de los valores estándar en el intervalo de 0-5-10-20-40-80-160 y 320 pg/ml, tomándose como punto 0 de LHRH al punto B₀. La radioactividad (B) encontrada en cada concentración estándar y en las muestras se expresa como porcentaje de la radioactividad en B₀, la cantidad de LHRH (pg/ml) en cada muestra, se calcula por interpolación a partir de la curva.

.5- Cuantificación

La concentración de LHRH se expresa en pg/ml.

RESULTADOS



1- ESTUDIOS DEL EFECTO DE MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD NOS EN EL HIPOTÁLAMO DE LA RATA.

1.1- Estudios in vitro.

a- Efecto de concentraciones de melatonina sobre la actividad NOS del hipotálamo de rata.

Inicialmente estudiamos el efecto de concentraciones crecientes de melatonina hasta 1mM sobre homogenado del hipotálamo de rata (Fig. 1). La melatonina inhibió de una forma dosis-dependiente la actividad enzimática. Cabe destacar que la concentración de 1nM de la melatonina (= 230 pg/ml) que representa la concentración fisiológica de la hormona durante la noche, inhibió de forma significativa la actividad de la NOS.

b- Efecto de la melatonina y el EGTA sobre la actividad NOS del hipotálamo de rata.

El efecto inhibitor de la melatonina sobre la síntesis de citrulina se observó en presencia de Ca^{2+} . Así, cuando se añadió 0.5 mM de EGTA, un quelante específico de Ca^{2+} , no se detectaba ninguna actividad de la NOS (Fig. 2). Por tanto, el efecto inhibitor de la melatonina se observó exclusivamente en presencia de Ca^{2+} .

c- Relación entre la calmodulina (CaM) y el efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad NOS del hipotálamo de rata.

Cuando se añade al medio de incubación CaM exógena pura se consigue revertir parcialmente el efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad NOS (Fig. 3). Así, la adición de 0.1 μM de CaM al medio de incubación evitó completamente el efecto inhibitor de la dosis 1nM de melatonina y, parcialmente, la de 1 μM de melatonina. Por tanto, el efecto de la calmodulina parece ser

dependiente de la dosis, ya que la adición de 0.5 μ M de CaM evitó completamente el efecto inhibitor de la melatonina a 1 nM y 1 μ M.

d- Efecto de la concentración de homogenado sobre el efecto inhibitor de la melatonina en la actividad NOS en el hipotálamo de rata.

Al aumentar la concentración de homogenado (≥ 10 mg/ml) en el medio de incubación, el efecto de la melatonina sobre la actividad NOS desaparecía, siendo efectiva en un rango de 0.5 a 2 mg/ml de homogenado (Fig. 4).

e-Efecto de melatonina sobre la actividad NOS en diferentes tejidos.

La melatonina inhibió no solamente la actividad NOS en el hipotálamo de rata, también inhibió la actividad NOS en el cerebelo, la corteza cerebral, el bulbo olfatorio y el cuerpo estriado (Tabla 1). El efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad NOS de estos tejidos se observó a una concentración de 1 mM.

1.2- Estudios *in vivo*.

a- Actividad NOS del hipotálamo de rata bajo las condiciones de luz/oscuridad.

Los estudios anteriores demuestran que la melatonina tiene un efecto sobre la actividad NOS del hipotálamo de rata. Sin embargo, los estudios *in vivo* demuestran que la actividad NOS del hipotálamo de ratas mantenidas con luz continua y sacrificadas a la 0200 horas de la noche, fue significativamente más alta que la actividad NOS del hipotálamo de ratas mantenidas a un periodo luz/oscuridad normal (Tabla 2).

b-Efecto de la luz continua y melatonina sobre la actividad NOS del hipotálamo de rata.

El estudio *in vivo* demuestra también, que la actividad NOS del hipotálamo de rata tratada con luz continua y con melatonina suministrada en el agua de bebida durante 14 días, fue significativamente más baja que la actividad NOS del hipotálamo de rata tratada solamente con luz continua durante 14 días (Tabla 3).

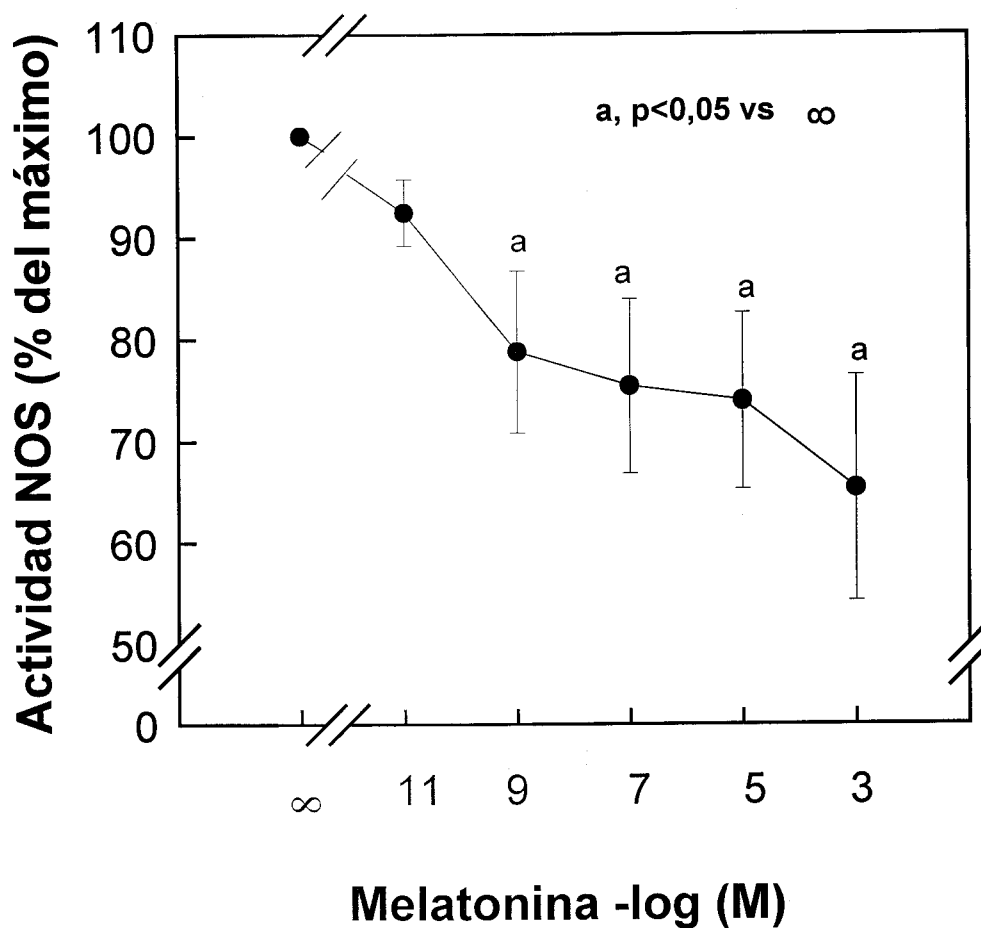


Fig 1: Efecto de la melatonina a concentraciones crecientes sobre la actividad de NOS. Se extrajo la glándula de la rata y se sonicó en el tampón de homogenización. A continuación se incubó a 37°C durante 30 min en presencia de las concentraciones indicadas de Melatonina [0-10⁻¹²-10⁻⁹-10⁻⁷-10⁻⁵-10⁻³M]. Los datos representan la media ± SEM de 5 experimentos realizados por duplicado. La actividad específica en ausencia de melatonina fue de 38,75 ± 4,41 pmol/mg de proteína /min.

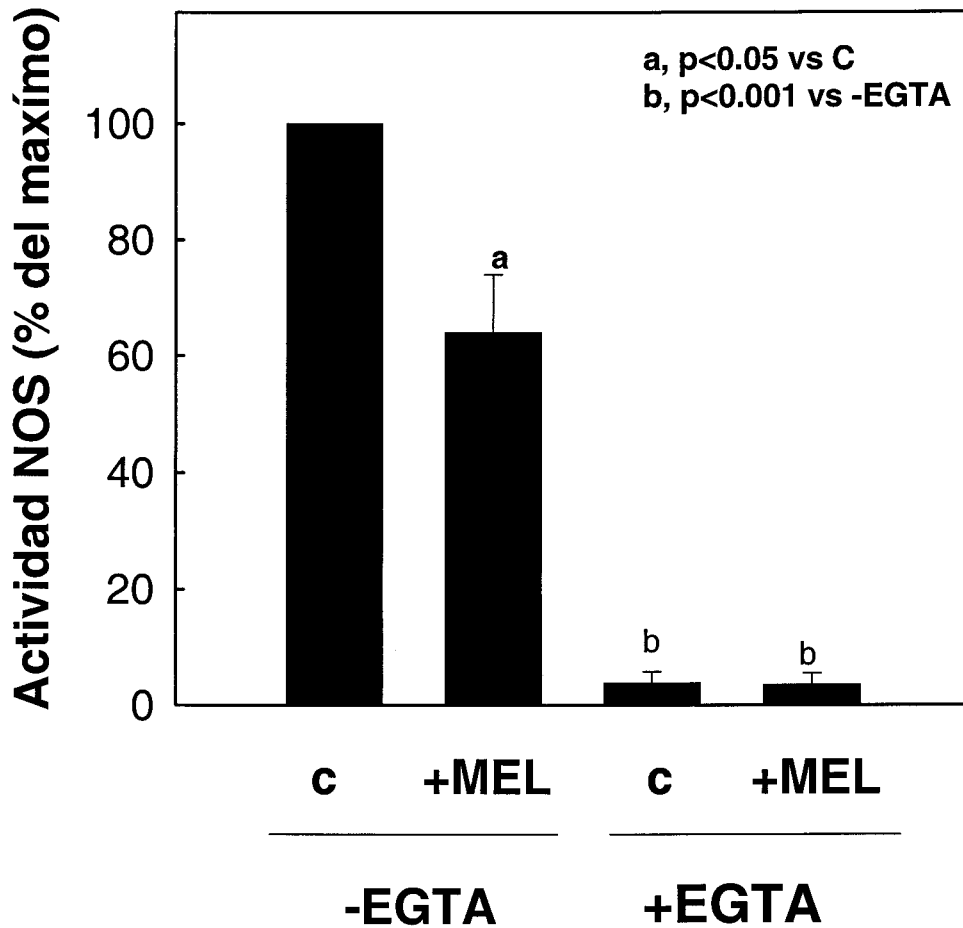


Fig 2: Efecto de la melatonina y el EGTA sobre la actividad de la NOS. Se extrajo la glándula de la rata y se sonicó en el tampón de homogenización, incubándose durante 30 min a 37 °C. La actividad NOS se determinó en ausencia y presencia de 1mM de Melatonina y/o 0.5 mM de EGTA. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos realizados en duplicado. La actividad específica en la ausencia de melatonina y EGTA fue de 41.18 ± 6.81 pmol / mg de proteína / min.

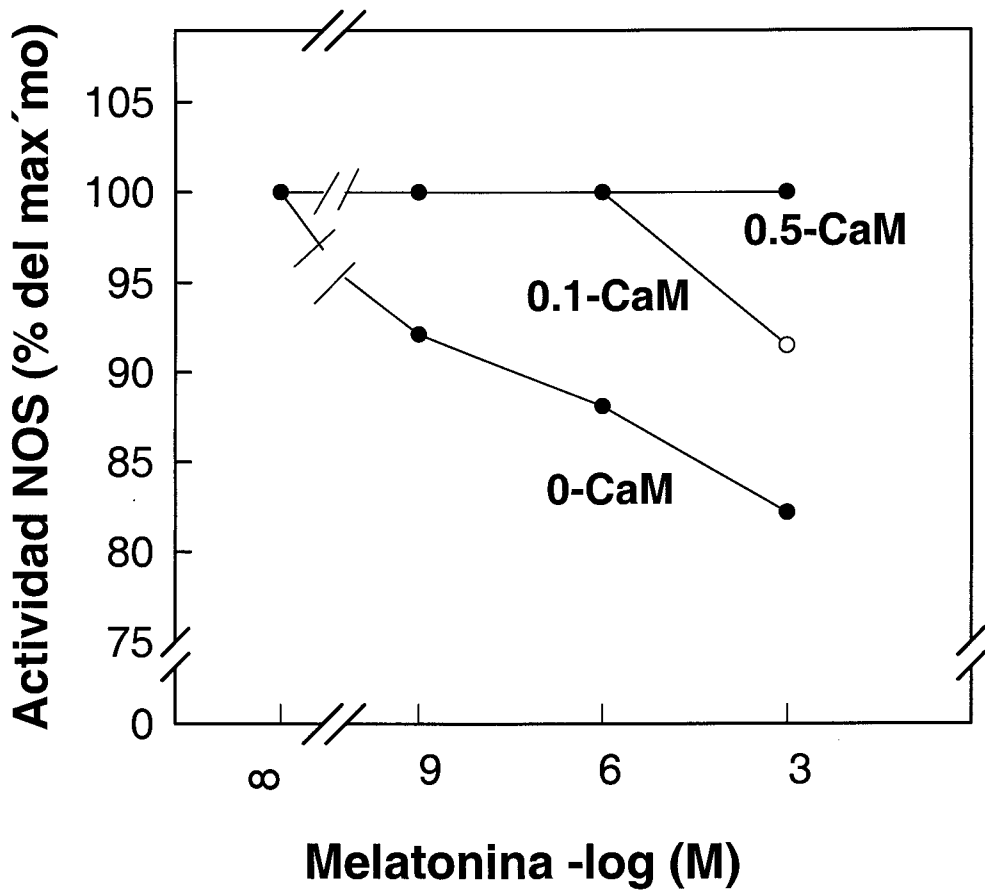


Fig 3: Relación entre la Calmodulina (CaM) y el efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad de la NOS. Una vez la glándula fue sonicada en el tampón de homogenización, se incubó a 37°C durante 30 min en presencia de concentraciones crecientes de melatonina sin la adición de CaM (0 μ M) o tras la adición de 0.1 y 0.5 μ M de CaM exógena. Los datos representan la media \pm SEM de cuatro experimentos realizados por duplicado. La actividad específica en ausencia de melatonina y CaM fue de 50.8 ± 7.71 pmol / mg de proteína / min.

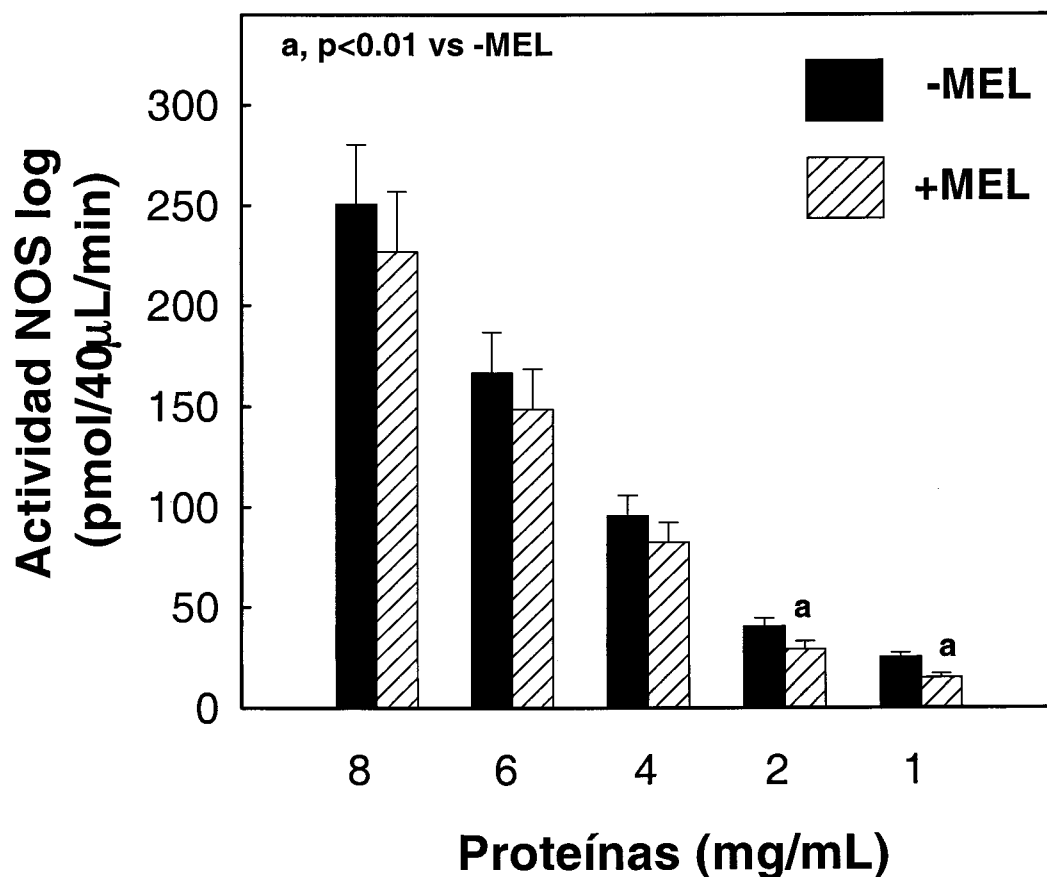


Fig 4: Efecto de la concentración de homogenado sobre el efecto inhibitor de la melatonina en la actividad NOS. Se extrajo el hipotálamo y se sonicó en el tampón de homogenización. Los homogenados en concentraciones crecientes [1-2-4-6-8 mg/ml] en ausencia de melatonina y en presencia de 1 mM de melatonina, incubaron a 37°C durante 30 min. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

Tabla 1: Efecto de Melatonina sobre la actividad NOS en el hipotálamo de la rata en otras estructuras neuronales. Los diferentes tejidos (hipotálamo, cerebelo, corteza frontal, bulbo olfativo, y el cuerpo estriado), se extrajeron del cerebro, se cortaron en trozos con las tijeras y se sonicaron en el tampón de homogenización seis veces durante 10 s. Los homogenados se centrifugaron 2.000 g durante 5 min. El sobrenadante del homogenado se incubó a 37°C durante 30min. La actividad NOS de los diferentes tejidos del cerebro se determinó en ausencia y presencia de melatonina 10 mM. Los datos representan la media \pm SEM de cuatro experimentos realizados en duplicados.

ESTRUCTURA	ACTIVIDAD NOS (pmol/mg proteína)	
	- MEL	+MEL
Hipotálamo	39,4 \pm 4,6	21,7 \pm 3,8 a
Cerebelo	49,5 \pm 8,5	28,7 \pm 4,9 a
Corteza frontal	29,5 \pm 4,1	18,5 \pm 3,6 a
Bulbo olfatorio	45,8 \pm 5,8	29,6 \pm 5,3 a
Cuerpo estriado	21,3 \pm 2,2	15,5 \pm 2,1 a

a, p<0.01 vs -Mel

Tabla 2: Actividad NOS del hipotálamo de rata bajo condiciones de la luz/oscuridad. El primer grupo se sacrificó a las 0200 horas como control: El otro grupo se sacrificó a las 0200 horas tras ser mantenido con luz continua. Se extrajo el hipotálamo de la rata y se sonicó en el tampón de homogenización, incubándose durante 30 min a 37 °C. La actividad NOS se determinó en los 2 grupos. Los datos representan la media \pm SEM de ocho animales en cada grupo.

<u>ACTIVIDAD NOS (pmol/mg proteína)</u>	
Oscuridad	37,35 \pm 1,34
Luz continua	43,84 \pm 1,41
A, p<0.01 vs oscuridad	

Tabla 3: Efecto de la luz continua y melatonina sobre la actividad NOS del hipotálamo de la rata. El primero grupo de animales se mantuvo en luz continua durante 14 días y, el segundo grupo, se mantuvo en luz continua más melatonina suministrada en el agua de bebida a concentración de 10 µg/ml durante 14 días. Se extrajo el hipotálamo y se sonicó en el tampón de homogenización, incubándose durante 30min a 37 °C, determinándose a continuación la actividad NOS de ambos grupos. Los datos representan la media ± SEM de seis animales en cada grupo.

	<u>ACTIVIDAD NOS (pmol/mg proteína)</u>
Luz continua	59,28 ± 1,82
Luz continua + Melatonina	46.03 ± 3,91 a
a, p<0.05 vs Luz continua	

2- EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PGE₂ Y AMP_c INDUCIDA POR NOREPINEFRINA EN EL HIPOTÁLAMO DE RATA.

En todos los experimentos de este apartado, se utilizó un cultivo de hipotálamo medio-basal (MBH).

2.1- Efecto de la norepinefrina (10 μ M) y melatonina (1 mM) sobre la producción de PGE₂ y AMP_c.

En este estudio, se demostró que la norepinefrina activa la producción de PGE₂ en ausencia de la melatonina. Cuando se incubó la parte medio-basal del hipotálamo de rata con melatonina sola, el efecto inhibitorio de esta hormona sobre la producción de PGE₂ se observó en presencia de norepinefrina (Fig. 5).

En la figura 6 se comprobó el efecto estimulador de norepinefrina, en ausencia de melatonina sobre la producción de AMP_c. También se comprobó el efecto de la melatonina (1 mM) incubada con o sin norepinefrina (10 μ M).

2.2- Efecto de concentraciones crecientes de melatonina sobre la producción de PGE₂ y AMP_c inducida por norepinefrina.

Una vez demostrado que la melatonina a concentración de 1 mM tiene un efecto en ausencia o en presencia de la norepinefrina a concentración de 10 μ M, nos planteamos estudiar el efecto de concentraciones crecientes de melatonina hasta 1 mM sobre la producción de PGE₂. La melatonina inhibió de una forma dosis-dependiente la producción de PGE₂. Cabe destacar que la concentración de 1 nM, que presenta la concentración fisiológica de la hormona durante la noche, inhibió de una forma significativa la producción de PGE₂ inducida por norepinefrina (Fig. 7).

En la figura 8, se confirmó el efecto inhibitorio de la melatonina a concentraciones crecientes en presencia de la norepinefrina (NE, 10 μ M). La melatonina inhibió también de una forma dosis-dependiente la acumulación de

AMPC en el hipotálamo de rata. También se confirmó que la melatonina a concentración de 1 nM, que representa la concentración fisiológica de la hormona durante la noche, inhibió de una forma significativa la acumulación de AMPC.

2.3- Efecto de la norepinefrina, melatonina y nitroprusiato (SNP), solos o combinados sobre la producción de PGE₂ en el hipotálamo de rata.

Con la adición de nitroprusiato (SNP, 100 μ M), que es productor de óxido nítrico (NO) en el cultivo, se demostró que la melatonina (Mel, 1 mM) no tiene efecto inhibitor sobre la producción de PGE₂. En cambio, se observó el efecto de la melatonina en presencia ó ausencia de norepinefrina (NE, 10 μ M) sobre la producción de PGE₂ (Fig. 9).

2.4- Efecto de la norepinefrina, melatonina y nitroprusiato (SNP), solos o combinados sobre la producción de AMPC en el hipotálamo de rata.

En este experimento, se estudia el efecto de la melatonina sobre la producción de AMPC. La glándula hipotalamica fue incubada con nitroprusiato (SNP, 100 μ M). Hemos obtenido resultados similares al estudio anterior al estudiar la producción de PGE₂ en presencia ó ausencia de norepinefrina (NE, 10 μ M).

Estos resultados sugieren claramente que la melatonina tiene un efecto inhibitor sobre la producción de PGE₂ y AMPC inducida por norepinefrina y no sobre la producción de PGE₂ y AMPC inducida por NO.

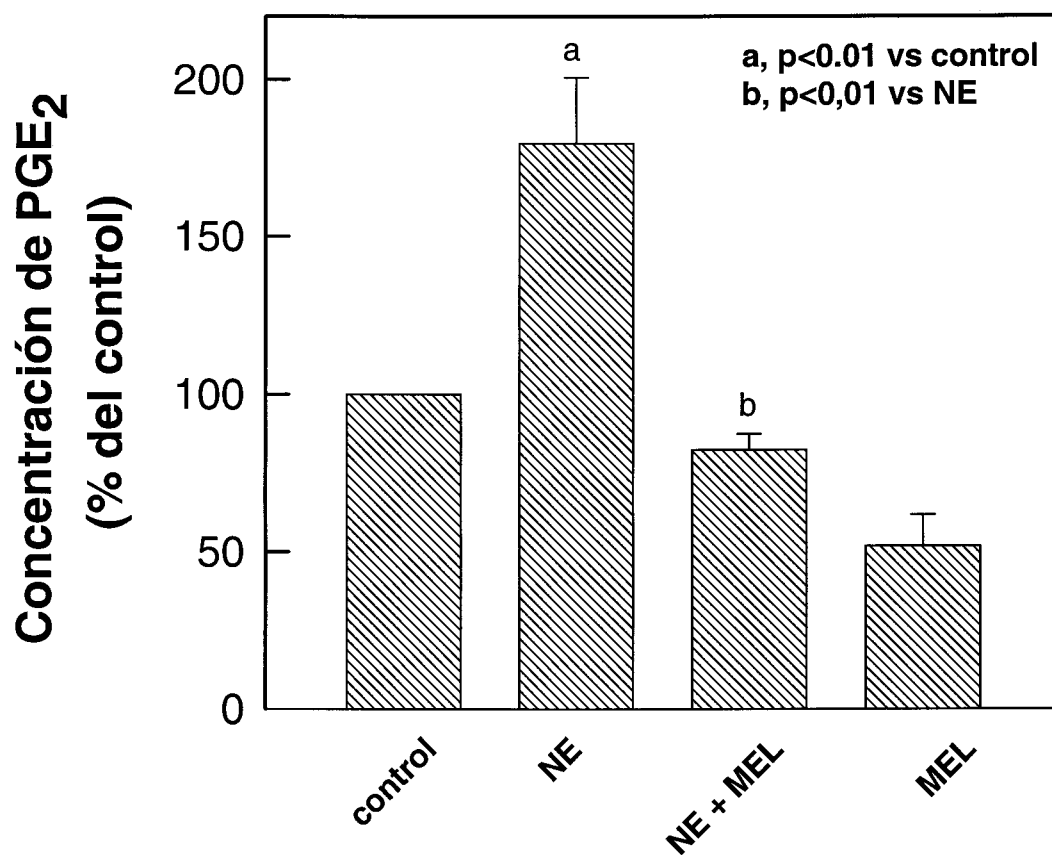


Fig 5: Efecto de la norepinefrina y la melatonina sobre la producción de PGE₂ en el hipotálamo de rata. Se extrajo el hipotálamo de la rata. La parte medio-basal fue preincubada en el medio de cultivo a 37°C durante 30 min con agitación. A continuación, se incubó durante 30 min a 37°C en presencia de melatonina +/- norepinefrina determinándose la concentración de PGE₂. La concentración de PGE₂ se determinó a partir del sobrenadante del medio de cultivo en ausencia o en presencia de la melatonina (Mel, 1mM) y/o norepinefrina (NE, 10µM). El control MBH se incubó en el medio de cultivo sin tratamiento durante el mismo tiempo. Los datos representan la media ± SEM de seis experimentos realizados en duplicado.

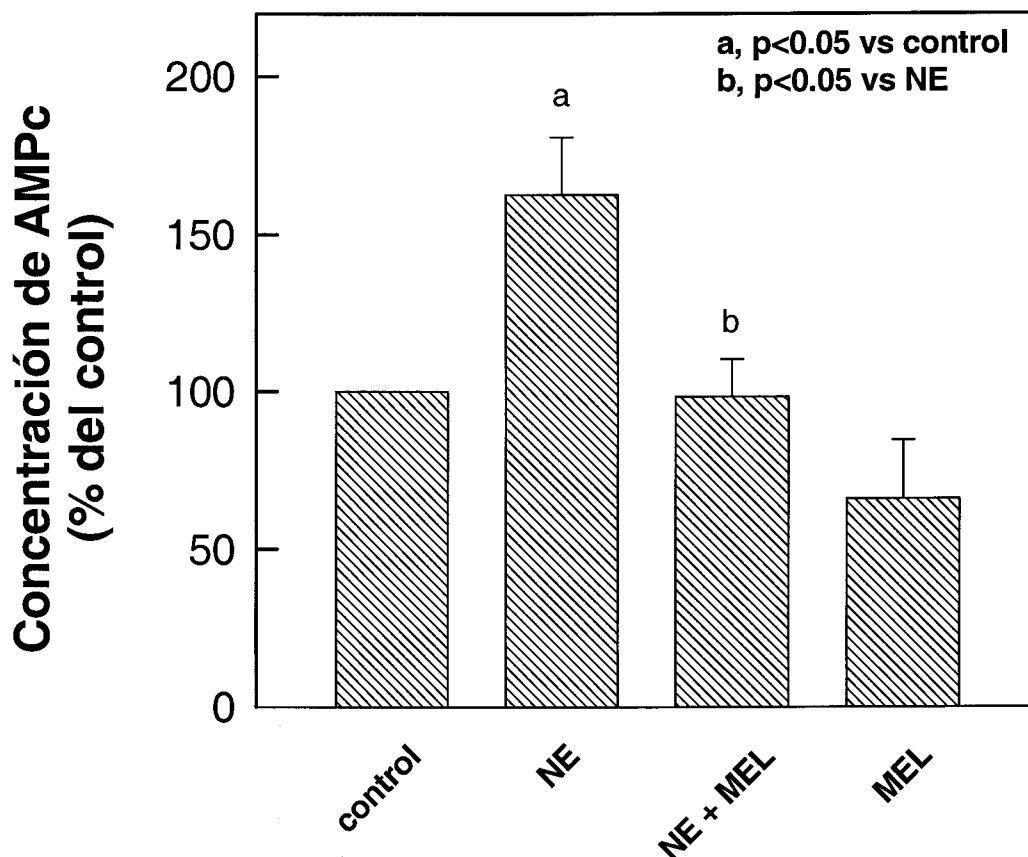


Fig 6: Efecto de la Norepinefrina y la melatonina sobre la producción de AMPc en el hipotálamo de rata. El hipotálamo fue preincubado en el medio de cultivo a 37°C durante 30min y luego se incubó durante otros 30 min a 37°C. Tras la incubación se sonicó y la concentración de AMPc se determinó a partir del homogenado ya fuera en ausencia o en presencia de melatonina (1mM) y/o norepinefrina (10µM). El control se incubó en el medio de cultivo sin tratamiento durante el mismo tiempo. Los datos representan la media \pm SEM de seis experimentos realizados por duplicado.

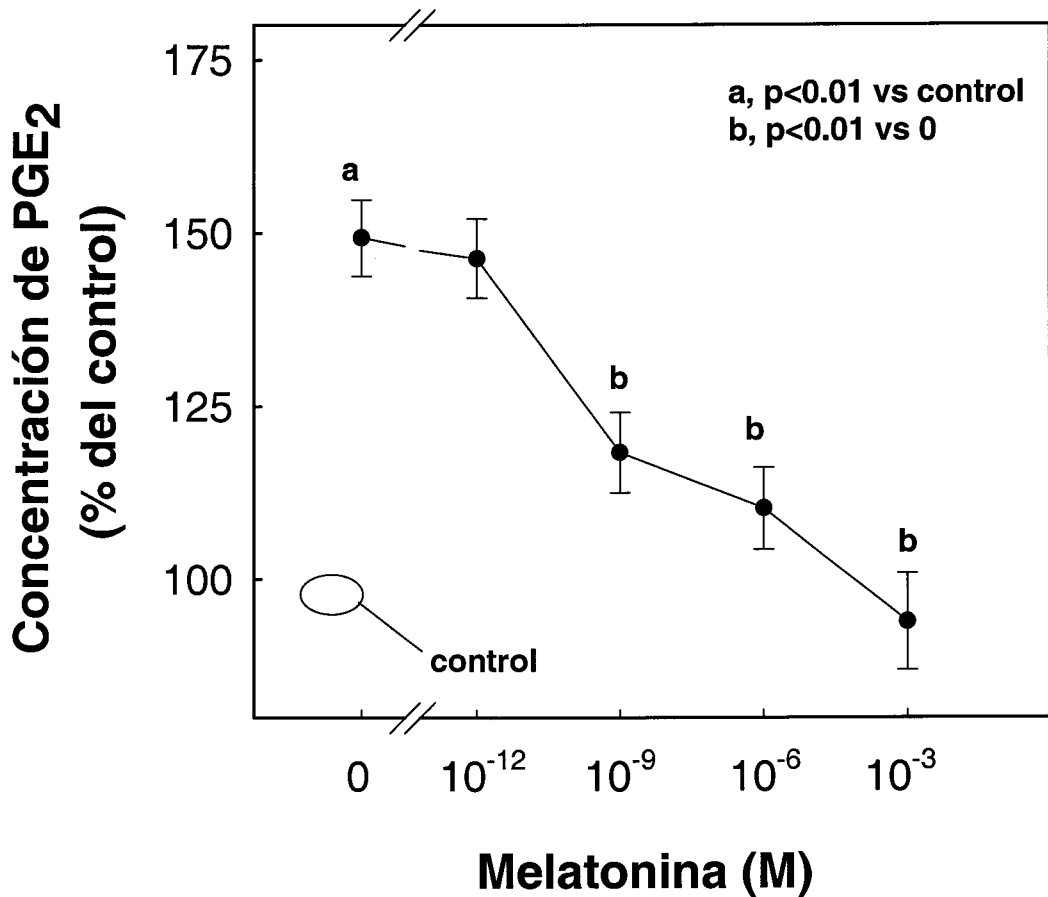


Fig 7: Efecto de concentraciones crecientes de melatonina en la producción de PGE₂ inducida por norepinefrina (NE, 10 μ M) en el hipotálamo de rata. Se extrajo el hipotálamo de la rata. La parte medio-basal fue preincubada en el medio de cultivo a 37°C durante 30min, luego se incubó durante 30 min a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de melatonina y norepinefrina (NE, 10 μ M). La concentración de PGE₂ se determinó a partir del sobrenadante del medio de cultivo. Los valores control representan la producción de PGE₂ en ausencia de norepinefrina. Los datos representan la media \pm SEM de ocho experimentos realizados por duplicado.

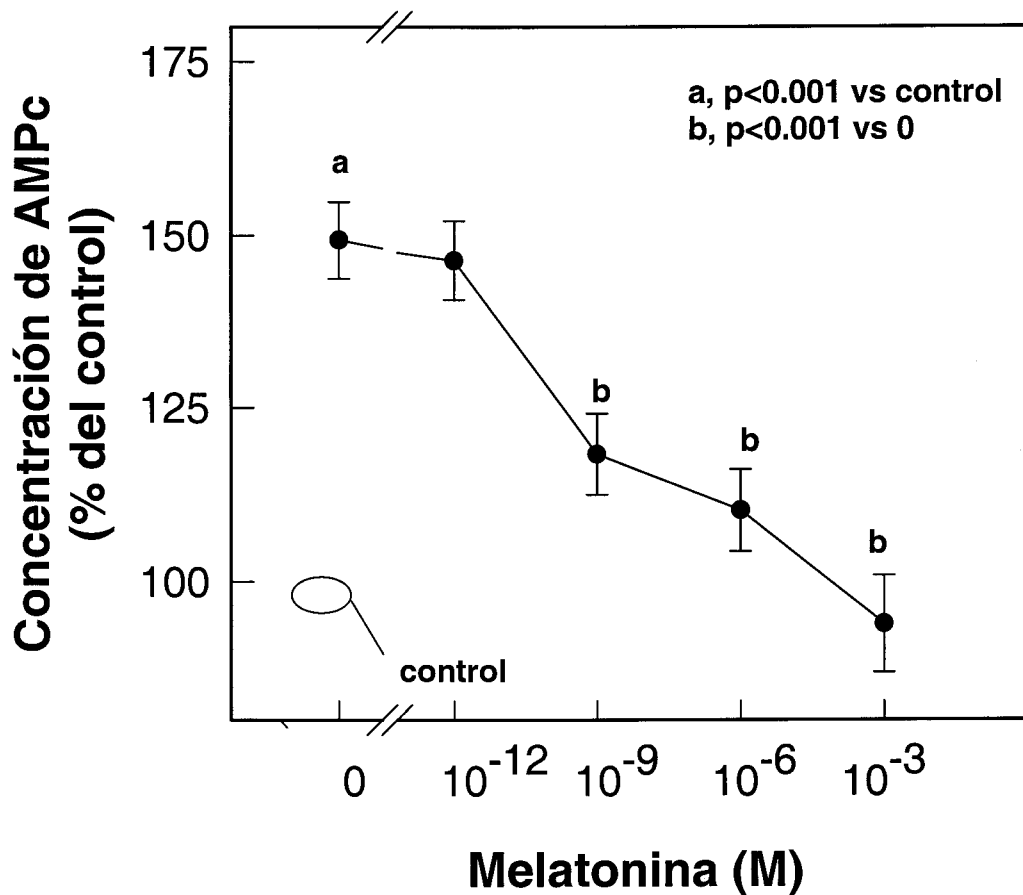


Fig 8: Efecto de concentraciones crecientes de melatonina en la producción de AMPc inducida por norepinefrina ($10\mu\text{M}$) en el hipotálamo de rata. La parte medio-basal del hipotálamo se preincubó en el medio de cultivo a 37°C durante 30min. Tras la sonicación, se incubó durante 30 min a 37°C . La concentración de AMPc se determinó a partir del homogenado en presencia de melatonina ($1\ \mu\text{M}$, $1\ \text{nM}$, $1\ \mu\text{M}$, $1\ \text{mM}$) y norepinefrina ($10\ \mu\text{M}$). Los valores control representan la producción de AMPc en ausencia de norepinefrina y melatonina. Los datos representan la media \pm SEM de ocho experimentos realizados en duplicado.

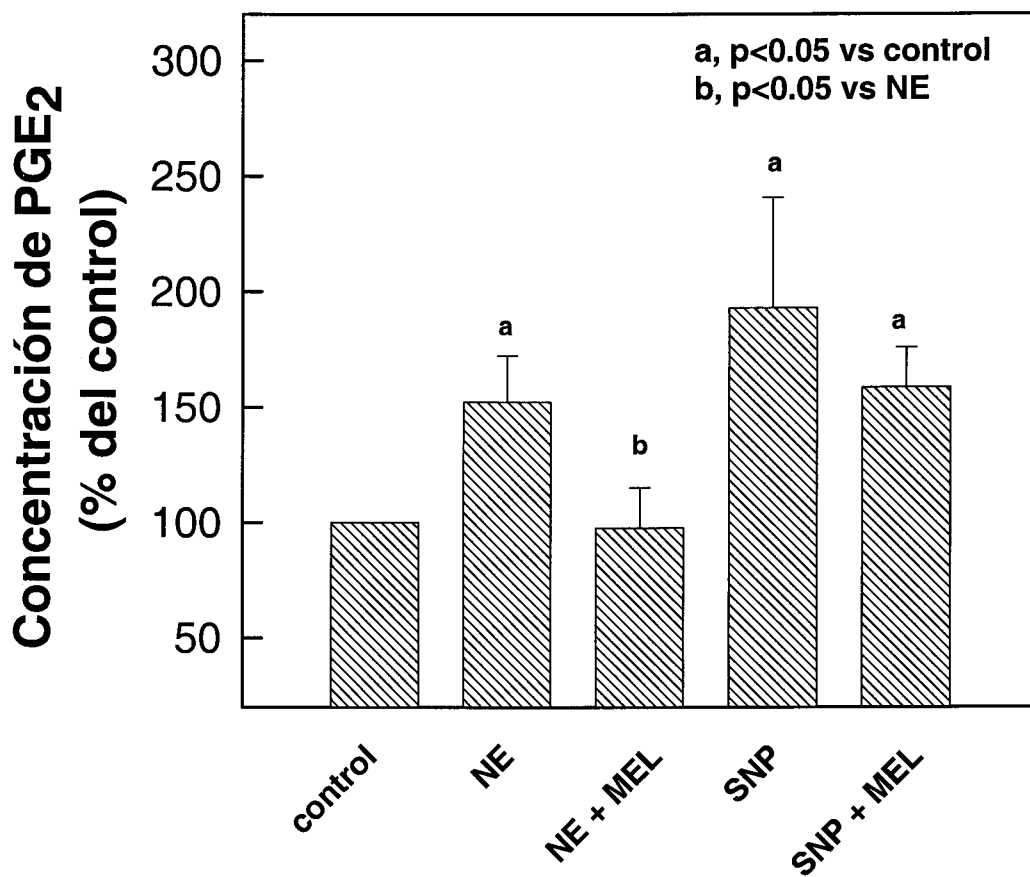


Fig 9: Efecto de la norepinefrina, melatonina y nitroprusiato, solo o combinados sobre la producción de PGE₂ en el hipotálamo de rata. La parte medio-basal del hipotálamo se preincubó en el medio de cultivo a 37°C durante 30min, luego se incubó durante 30 min a 37°C. La concentración de PGE₂ se determinó a partir del sobrenadante del medio de cultivo en ausencia o en presencia de la melatonina (1 mM), y/o norepinefrina (10 µM) y/o nitroprusiato (100 µM). El control MBH se incubó en el medio de cultivo sin tratamiento durante el mismo tiempo. Los datos representan la media ± SEM de seis experimentos realizados en duplicado.

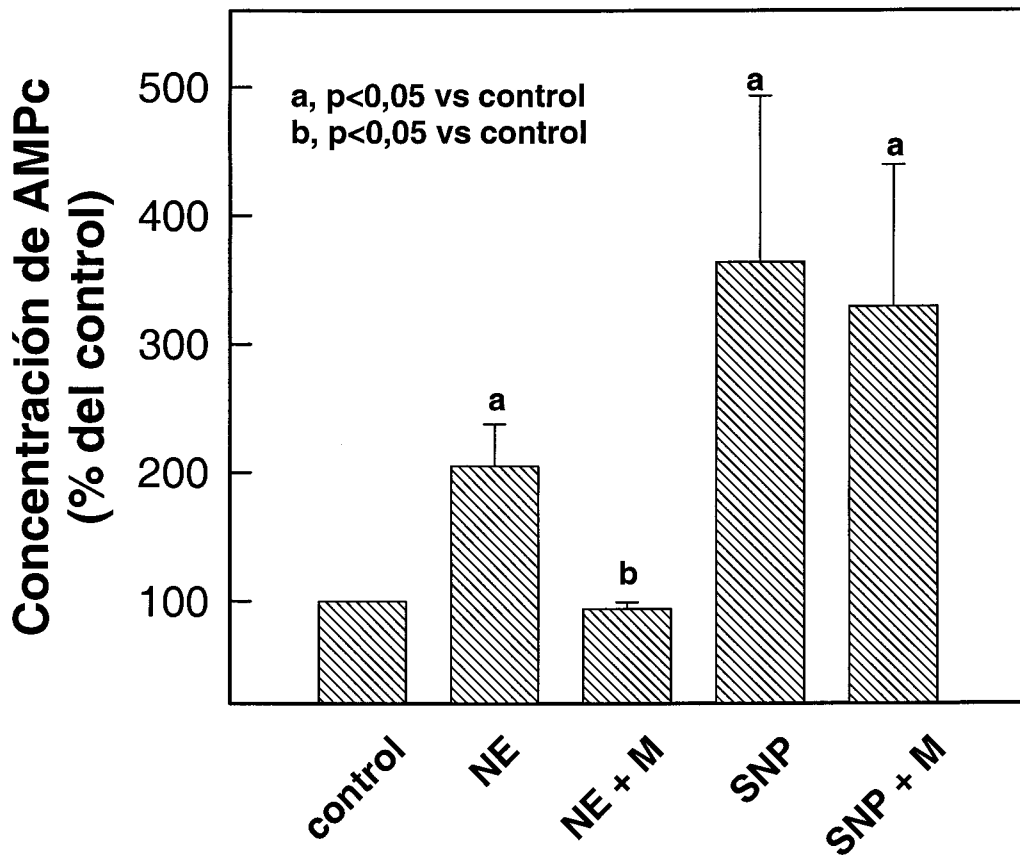


Fig 10: Efecto de la norepinefrina, la melatonina y nitroprusiato, solo o combinados sobre la producción de AMPc en el hipotálamo de rata. La parte medio-basal del hipotálamo fue preincubado en el medio de cultivo a 37°C durante 30min, luego se incubó durante 30 min a 37°C en presencia o ausencia de la melatonina (Mel, 1mM), norepinefrina (NE, 10 μ M) y nitroprusiato (100 μ M). El control se incubó en el medio de cultivo sin tratamiento durante el mismo tiempo. Los datos representan la media \pm SEM de seis experimentos realizados en duplicado.

3- EFECTO DE LA MELATONINA, CGP 52608 Y S 20098 SOBRE LA LIBERACIÓN DE LHRH INDUCIDA POR NOREPINEFRINA EN EL HIPOTÁLAMO DE RATA.

De forma similar que para los estudios de la producción de PGE₂ y AMPc, nuestro objetivo en este apartado fue comprobar si la melatonina tiene un efecto inhibitor sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina.

3.1- Efecto de la melatonina (Mel, 1 mM) sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina (NE, 10 μM).

En estos estudios, se demostró que la norepinefrina estimula la liberación de LHRH en ausencia de la melatonina. El efecto inhibitor de la melatonina se observó tanto en presencia de la norepinefrina como en ausencia de norepinefrina sobre la liberación de LHRH en MBH de rata (Fig.11).

3.2- Efecto de la melatonina a concentraciones crecientes hasta 1 mM sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina en el hipotálamo de rata.

En la Fig.12, se muestra que la melatonina en presencia de norepinefrina (NE, 10 μM), inhibió de una forma dosis-dependiente la liberación de LHRH de la parte medio-basal del hipotálamo (MBH). Cabe destacar que la concentración de 1 nM de melatonina que representa la concentración fisiológica de la hormona durante la noche, inhibió de una forma significativa la liberación de LHRH.

3.3- Efecto de la melatonina, CGP 52608 y S 20098 sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina.

Nuestro siguiente objetivo fue determinar el tipo de receptores de melatonina en las células del hipotálamo de rata. En primer lugar, la MBH se incubó con un producto farmacológico, análogo del receptor nuclear de melatonina que es CGP 52608 a diferentes concentraciones (CGP, 0-1nM-0.1μM) y con norepinefrina (NE, 10μM). Se observó una inhibición significativa de la

liberación de LHRH. Por otra parte la adición de un fármaco, análogo del receptor de membrana de la melatonina, que es el S 20098 a diferentes concentraciones (S, 0.1 nM -0.1 μ M) en presencia de norepinefrina, también se mostró una inhibición significativa de la liberación de LHRH. El efecto inhibitorio de la melatonina a concentraciones diferentes (Mel, 0-1nM-0.1 μ M) en presencia de norepinefrina es aproximadamente similar al efecto inhibitorio de CGP 52608 y S 20098 sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina.

3.4- Efecto inhibitorio de la melatonina, CGP 52608 y S 20098 sobre la producción de PGE₂ inducida por norepinefrina.

La adición de CGP 52608 a concentraciones diferentes (CGP, 0-1nM-0.1 μ M) en el cultivo en presencia de norepinefrina (NE, 10 μ M), mostro una inhibición sobre la producción de PGE₂ en la parte medio basal de rata, tanto cuando se añadió la melatonina a concentraciones diferentes (Mel. 0-1 nM-0.1 μ M) en el cultivo de MBH de rata. Así mismo, la adición de S 20098 a una concentración de 1nM en el cultivo mostro una inhibición significativa, pero no tuvo ningún efecto inhibitorio de S 20098 a concentración de 1 μ M sobre la producción de PGE₂ en presencia de norepinefrina (Fig.14).

3.5- Efecto de la melatonina, CGP 52608 y S 20098 sobre la actividad NOS en el hipotálamo de rata.

Una vez demostrado el papel inhibitorio de CGP 52608 y S 20098 sobre la liberación de LHRH y la producción de PGE₂ inducida por norepinefrina en el hipotálamo de rata (MBH), nuestro siguiente objetivo fue determinar el efecto inhibitorio de CGP 52608 y S 20098 sobre la actividad NOS del hipotálamo de rata.

En la Fig.15, se observó, que CGP 52608 y S 20098 no tiene ningun efecto inhibitorio sobre la actividad NOS en el hipotálamo de rata. Sin embargo, cuando se repitió el experimento con melatonina (Mel, 1mM), se observó un efecto inhibitorio sobre la actividad NOS en el hipotálamo de rata.

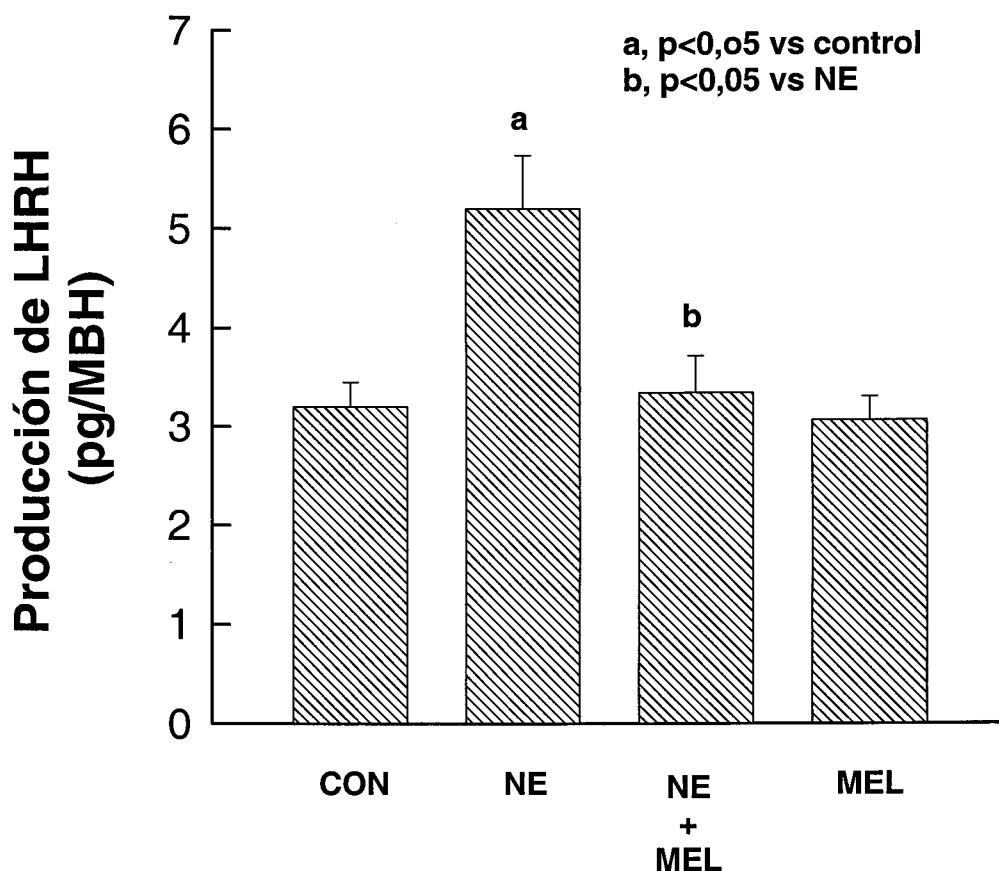


Fig 11: Efecto de la melatonina y norepinefrina sobre la liberación de LHRH en el hipotálamo de rata. La parte medio-basal del hipotálamo (MBH) fue preincubada en el medio de cultivo a 37°C durante 30 min, luego se incubó durante 30 min a 37°C con melatonina (1 mM) y/o norepinefrina (10 μ M). La concentración de LHRH se determinó a partir del sobrenadante del medio de cultivo. El control MBH de rata se incubó en el medio de cultivo sin tratamiento durante el mismo tiempo de incubación. Los datos representan la media \pm SEM de cuatro experimentos realizados en duplicado.

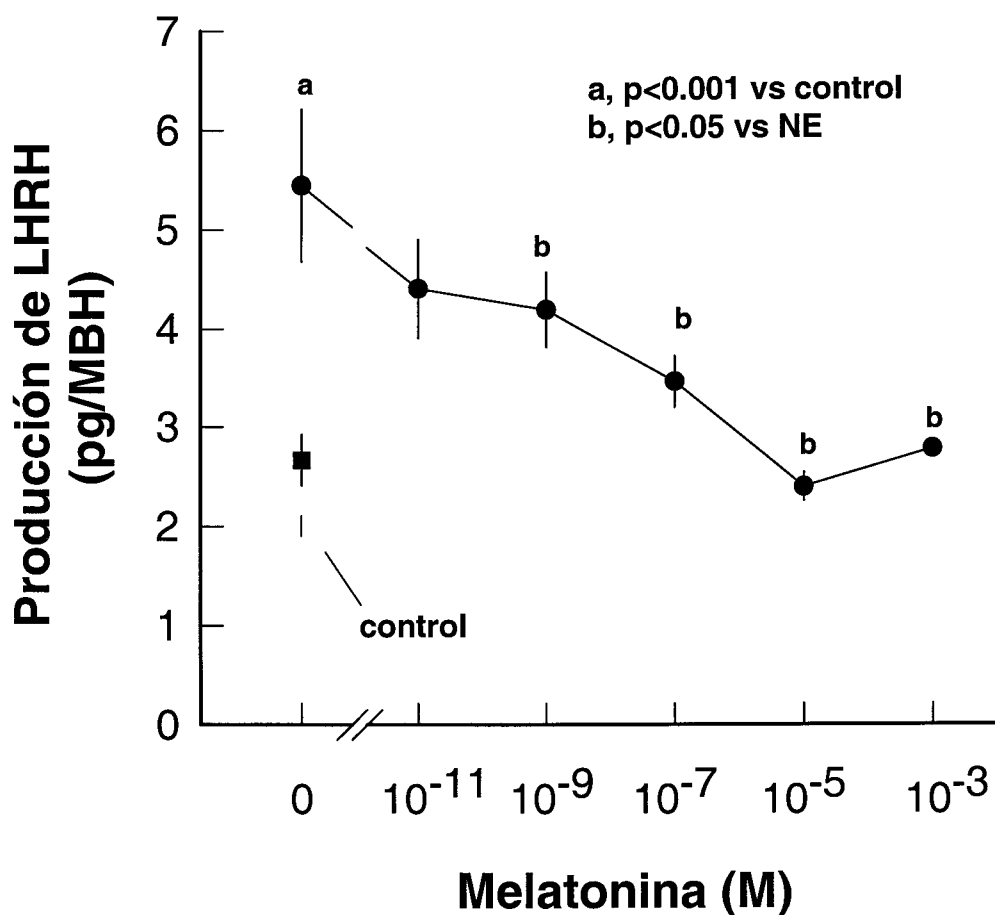


Fig 12: Efecto de concentraciones crecientes de melatonina sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina. Una vez realizada las incisiones en el hipotálamo, nos quedamos con la parte medio-basal del hipotálamo (MBH) para preincubarlo en el medio de cultivo a 37°C durante 30 min, luego se incubó durante 30 min a 37°C con melatonina a concentraciones crecientes [10⁻¹¹-10⁻⁹-10⁻⁷-10⁻⁵-10⁻³ M] y norepinefrina (10 µM). La concentración de LHRH se determinó a partir del sobrenadante del medio. Los valores control representan la liberación de LHRH en ausencia de norepinefrina. Los datos representan la media ± SEM de cuatro experimentos realizados en duplicado.

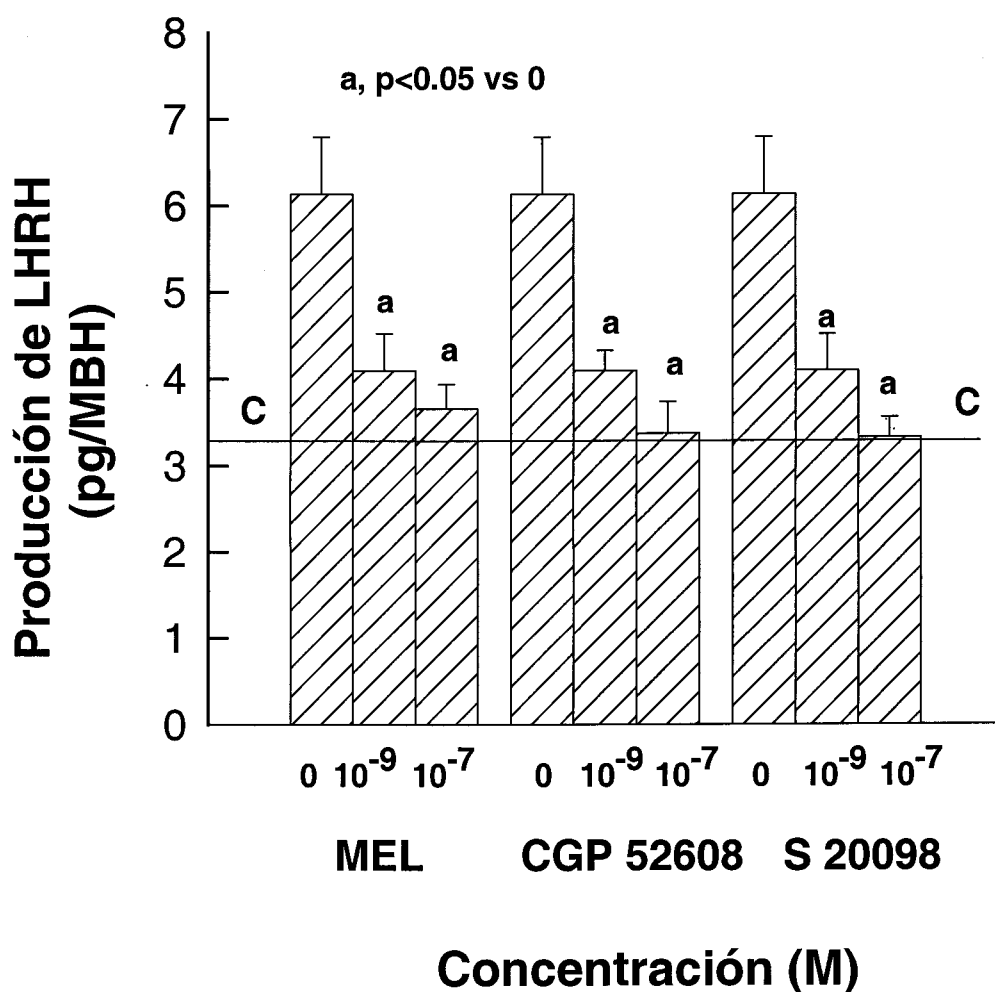


Fig 13: Efecto de la melatonina y sus análogos sintéticos del receptor nuclear CGP 52608 y del receptor de la membrana S 20098 sobre la liberación de LHRH inducida por norepinefrina. Tras la preincubación del hipotálamo medio-basal (MBH) a 37°C durante 30 min, este fue incubado por segunda vez durante 30 min a 37°C con melatonina (0-1nM-0.1µM), CGP 52608 (0 - 1nM - 0.1µM) o S 20098 (0 - 1 nM - 0.1µM) en presencia de norepinefrina. La concentración de LHRH se determinó a partir del sobrenadante del medio de cultivo de MBH. Los valores control representan la concentración de LHRH en ausencia de norepinefrina. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos realizados por duplicado.

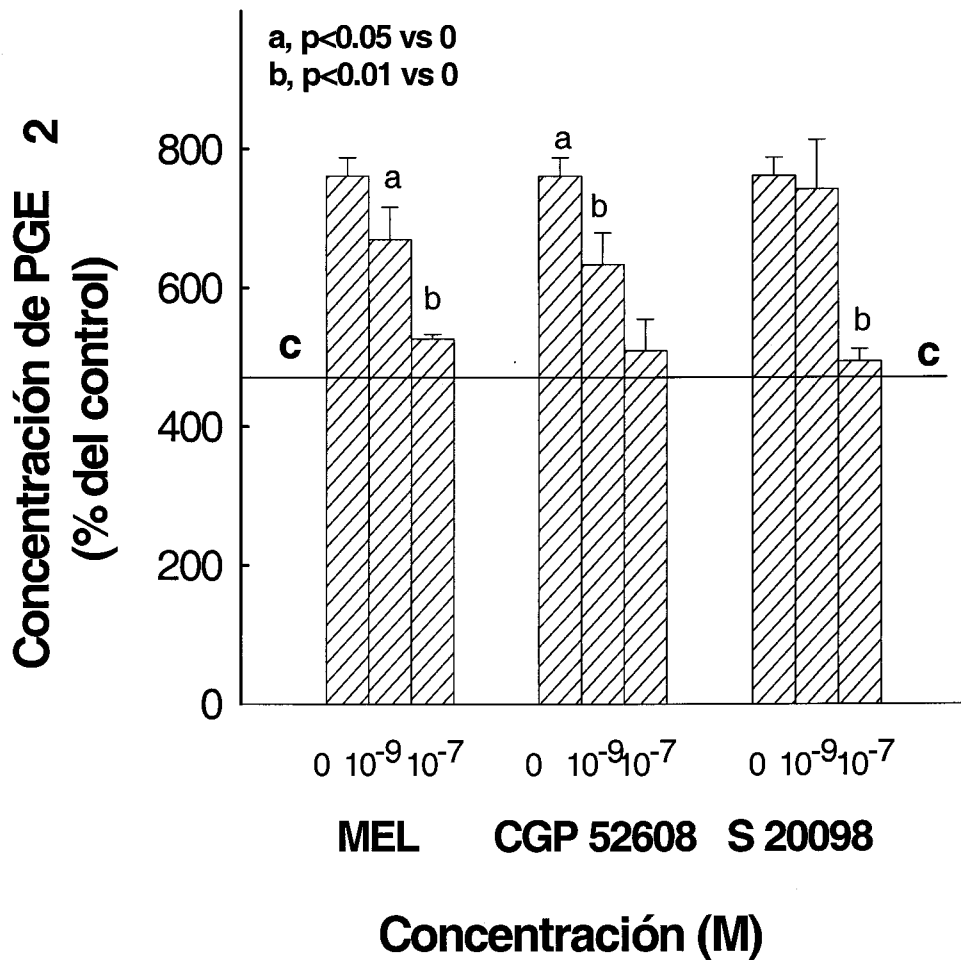


Fig 14: Efecto de la melatonina, CGP 52608 y S 20098 sobre la producción de PGE₂ inducida por norepinefrina. Se extrajo el hipotálamo. La parte medio-basal del hipotálamo fue preincubada durante 30 min a 37°C. Tras la preincubación, la MBH se incubó una segunda vez en presencia de norepinefrina con melatonina o (0 - 1nM -0,1µM) o CGP 52608 (0 - 1nM - 0.1µM) o S 20098 (0 - 1 nM - 0.1 µM). El control MBH se incubó en el medio de cultivo sin tratamiento durante el mismo tiempo. Los datos representan la media ± SE M de cuatro experimentos realidos en duplicado.

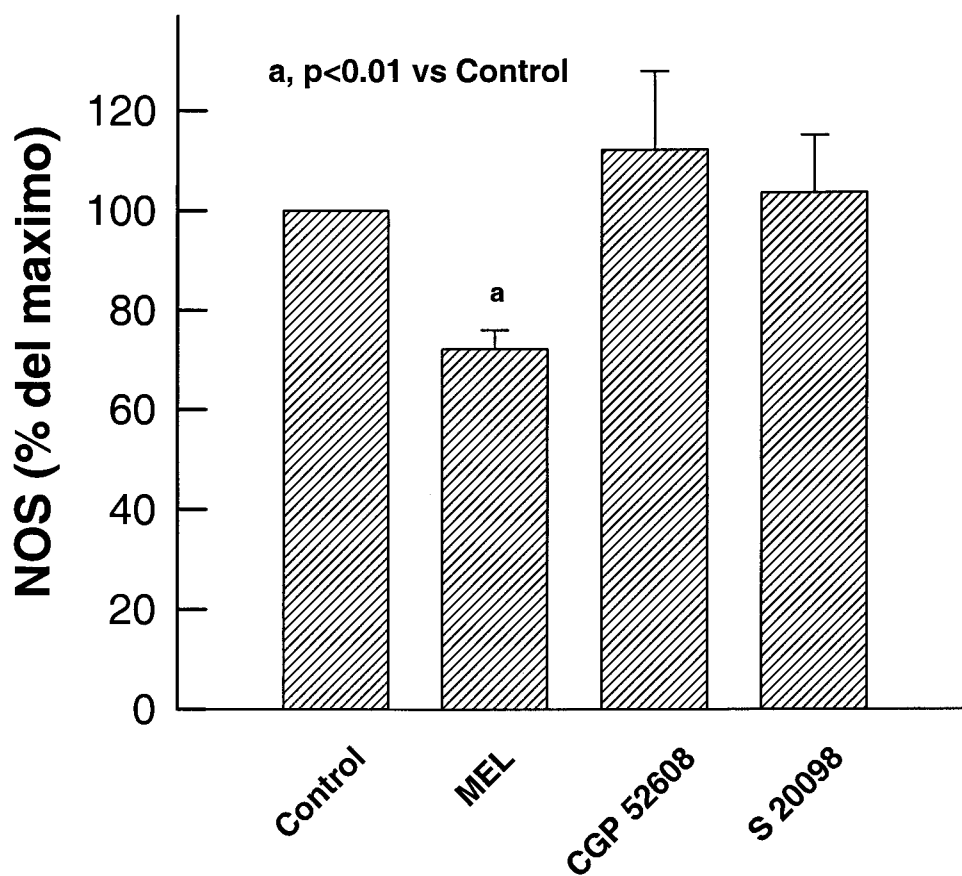


Fig 15: Efecto de la melatonina, CGP 52608 y S 20098 sobre la actividad NOS en el hipotálamo de rata. Se extrajo el hipotálamo, se sonicó en el tampón de homogenización. El homogenado fue incubado a 37°C durante 30 min en presencia de melatonina (1 mM), o CGP 52608 (0.1 μ M) o S 20098 (0.1 μ M). Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos.

DISCUSIÓN



1- Melatonina.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), principal producto del metabolismo indólico de la glándula pineal, fue aislada y caracterizada químicamente por Lerner y colaboradores en 1959. Su producción y secreción a la circulación sanguínea por la glándula pineal de todas las especies estudiadas, incluidos los humanos, está regulada por el fotoperiodo ambiental, siendo ésta de menos de 15 pg/ml durante el período de luz e incrementándose hasta 150 pg/ml durante la fase oscura. Este indol, que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y otras barreras morfofisiológicas, se ha encontrado además en otros fluidos como la saliva, el líquido cefalorraquídeo y la cámara anterior del ojo. Si se administra exógenamente, el nivel de melatonina en sangre se incrementa varios cientos de veces.

La melatonina participa en cinco funciones biológicas; en cuatro de ellas, su mecanismo de acción es a través de receptores de alta afinidad.

Los mecanismos moleculares que podrían mediar estos efectos son diversos e incluirían receptores de membrana acoplados a proteínas G, proteínas citosólicas, receptores nucleares y la propia capacidad antioxidante de la melatonina.

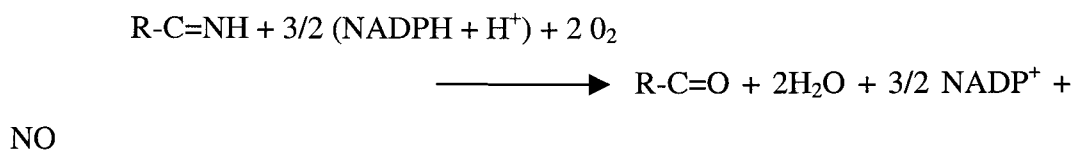
Los diferentes mecanismos de acción de la melatonina y su antigüedad filogenética hacen pensar en una molécula de gran versatilidad evolutiva, lo que llevó a nuestro grupo a interesarse en esta hormona, siendo unos de los pioneros en la investigación de sus diferentes acciones (Guerrero J.M, Osuna C, Molinero P, Calvo J.R).

2- Óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula compuesta de un oxígeno y un átomo de nitrógeno, y tiene un electrón desapareado. Estas características hacen de él un mensajero fisiológico con importantes funciones reguladoras en los sistemas nervioso, inmune y cardiovascular. En el SNC, el NO juega múltiples papeles de especial relevancia, siendo por tanto del mayor interés la búsqueda de sistemas de modulación de la producción de NO. Se le ha implicado en los efectos

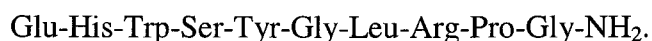
neurotóxicos en el Alzheimer, el Huntington, y en la isquemia cerebral (Hoffman y cols, 1991). Las otras funciones en las que, al parecer, el NO se ve implicado son los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) y de memoria, junto con el control del sistema vascular cerebral (Izumi y cols., 1992; Raszliwicz y cols., 1992).

Para realizar la determinación de la actividad de la NOS en el hipotálamo medimos la formación de [³H] citrulina a partir del sustrato L-[³H]arginina tras la separación por cromatografía, ya que como se ve la reacción es estequiométrica para la formación de NO y citrulina. La reacción general de óxido-reducción catalizada por la NOS es:



3- Hormona reguladora de la hormona luteinizante (LHRH).

LHRH es una hormona hipotálmica (Harris GW, 1955; Shally y cols, 1973), aislada por la primera vez a partir del tejido hipotalámico de porcino (Harris y cols, 1971; Harris y cols, 1971) y es un decapeptido (Matsu y cols, 1971; Baba y cols, 1971) que tiene la siguiente fórmula:



La hormona LHRH es sintetizada en la parte medio basal del hipotálamo (MBH) (Blake y cols, 1974; Levine y cols, 1980; Soper y cols, 1980). Las células neuronal responsables de la síntesis de LHRH están localizadas en la área preoptica del hipotálamo (Philips y cols, 1985; King y cols, 1985; Silverman y cols, 1988; Ronnekleiv y cols, 1987; Song y cols, 1987). La LHRH se libera a partir de la neurona terminal en el tallo de la pituitaria media hacia la circulación general (Sarker y cols, 1979; Clarke y cols, 1987).

4- Efecto de la melatonina sobre el hipotálamo.

La glándula pineal y su hormona más importante, la melatonina, transforman la información de la iluminación en señales que modulan las interacciones reproductora, adrenal y neuroendocrina así como la función inmune. (Rreiter, 1991; Hardelan y cols, 1995, Rafii-El-Idrissi y cols, 1995-1996).

Se ha sugerido que la pineal de mamíferos tiene influencia sobre la función del sistema nervioso central y sobre la actividad de la NOS de tipo constitutivo (Miles y cols, 1988).

El efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad NOS en el cerebelo de rata fue demostrado por nuestro grupo [Pozo y cols, 1994]. Inicialmente estudiamos *in vitro*, el efecto de concentraciones crecientes de melatonina hasta 1mM sobre homogenados de hipotálamo de rata. La melatonina inhibió de una forma dosis-dependiente la actividad enzimática. Cabe destacar que concentraciones de 1nM de melatonina, que representan la concentración fisiológica de la hormona durante la noche, inhibieron de una forma significativa la actividad de la NOS.

Los estudios estequiométricos también demuestran que el efecto máximo es observado a una concentración de 1mM de melatonina (inhibición de 4%) y, por lo tanto, la constante IC_{50} es $>0,1mM$ de melatonina.

Por otro lado, el efecto inhibitor de melatonina sobre la actividad NOS se observó solamente en presencia de Ca^{++} . Así, la melatonina no tiene ningún efecto inhibitor sobre la actividad NOS en presencia de 0,5mM de EGTA, un quelante específico de Ca^{++} .

Esta inhibición se acopla a una inhibición dosis dependiente de la producción y está acoplada a la inhibición de la producción de GMPc activada por L-arginina. El óxido nítrico se reconoce como un neurotransmisor en el sistema nervioso central, siendo un mediador de los efectos del neurotransmisor glutamato (Moncada y cols, 1991; Snyder y cols, 1991). Este proceso tiene lugar también en las células del hipotálamo como células NOérgicas (bredt y cols; 1991), estas neuronas estimulan la liberación de muchos polipéptidos a partir del hipotálamo incluyendo la LHRH (Breds y cols, 1991). La norepinefrina induce la

liberación de LHRH (Rettori y cols, 1993), estimulando la producción de NO en la neurona NOérgica. Este mecanismo implica que la acción del receptor $\alpha 1$ -adrenérgico localizado en la neurona NOérgica conduce al aumento de $[Ca^{++}]$ intracelular. Los iones de calcio se combinan con la calmodulina para activar la NOS de tipo constitutivo y consecuentemente la producción de NO. El NO difunde en la neurona LHRH terminal, donde se une al grupo hemo de la ciclooxigenasa, que sínteza PGE_2 a partir del ácido araquidónico. La producción de PGE_2 entonces activa la adenilato ciclasa para generar AMPc, que a su vez induce la liberación de gránulos secretorios de LHRH por exocitosis en los capilares portales de la hipófisis (Rettori y cols, 1992).

Cuando se añade al medio de incubación calmodulina exógena (CaM) se consigue parcialmente el efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad NOS. Así, la adición de $0,1\mu M$ de CaM al medio de incubación impidió completamente el efecto inhibitor de la dosis $1nM$ de melatonina y parcialmente de $1\mu M$ de melatonina. Estos resultados demuestran que la actividad neuronal de la NOS depende fuertemente de la unión Ca^{++}/CaM que exige también como cofactores: NADPH y BH_4 (Bredt y cols, 1990).

Por otra parte, el efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad NOS no es exclusivamente en el hipotálamo. Hemos demostrado también en las estructuras neuronales de la corteza frontal del cerebro, el bulbo olfatorio y el cuerpo estriado, en la cual el complejo Ca^{++}/CaM está presente y son afectados por la melatonina.

Como hemos citado, la actividad NOS en el cerebelo depende del complejo Ca^{++}/CaM . Así, los antagonistas de CaM como, trifluoperazina, clorpromazina, calmidazolium, W7 y W13 inhiben algunas isoenzimas de la NOS, incluso la NOS constitutiva (Förstermann y cols, 1991). En este contexto, la melatonina actúa como un antagonista de CaM. Así, el efecto inhibitor de melatonina sobre NOS en el hipotálamo de rata está suprimido por la dosis, cuando se añadió CaM en el medio de incubación. Además, al aumento de la concentración del homogenado de proteína en el medio de incubación disminuye el efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad NOS. También se observó en el homogenado del cerebelo, una disminución del efecto de la melatonina en

presencia del péptido de la NOS, el cual se une a la CaM (Breds y cols, 1991; Pozo y cols, 1987). Además, la interacción entre la melatonina y la CaM está demostrado por Benitez-King y colaboradores (1993) y confirmado por nuestro grupo (Pozo y cols, 1997). La incubación de MACK y NIE-115 con melatonina muestra una nueva disposición compatible de los microfilamentos y microtúbulos con el cambio intracelular de la actividad de la CaM (Benitez-King y cols, 1993).

Así, *in vivo*, los experimentos nos han permitido saber si el nivel fisiológico de melatonina puede tener un efecto sobre la actividad NOS en el hipotálamo. Los resultados muestran que la actividad NOS en el hipotálamo disminuye durante la noche (cuando la concentración de melatonina en la sangre es alta) cuando lo comparamos con animales mantenidos bajo la luz continua durante 2 semanas. La administración también de melatonina disminuye la actividad NOS en el hipotálamo de rata. Las dosis experimentales sugieren que la producción nocturna de melatonina así como la administración exógena de melatonina pueden inhibir la actividad NOS.

La melatonina no es solamente una sustancia natural capaz de inhibir la actividad NOS (12), así L-NMMA y L-ADMA son compuestos naturales que están derivados de la metilación de L-arginina (Vallance y cols, 1992).

L-NMMA es un inhibidor competitivo (con L-arginina) de la NOS, esta inhibición es enantiómero específica.

Las concentraciones normales para la inhibición de L-NMMA y L-ADMA en el suero son bajas ($<1\mu\text{M}$). Pero en algunas condiciones son superiores a $1\mu\text{M}$, por ejemplo durante el funcionamiento de los riñones, estos compuestos se acumulan en una cantidad suficiente para inhibir la síntesis de NO (Vallance y cols, 1992). La melatonina, como estos compuestos, también inhibe la actividad NOS. Sin embargo, estos compuestos son inhibidores naturales diferentes de la melatonina que actúa a concentración fisiológica nocturna.

Estos resultados pueden representar un nuevo mecanismo de acción de la melatonina en el hipotálamo lo cual implica la unión de melatonina con el receptor específico de melatonina de la eminencia tuberalis media (Vanecek, 1988; Weaver y cols, 1989). Así, la producción de NO estimulada por NE participa en la regulación de la síntesis y la liberación de LHRH a partir de la activación de la ciclooxigenasa que cataliza la síntesis de PGE_2 y también la

activación de la adenilato ciclasa (Rettori y cols, 1992; 1993). Por lo tanto, el efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad NOS podría representar un mecanismo por lo cual esta hormona suprime la producción de LHRH y la función reproductora.

De otra parte, hemos demostrado que la melatonina inhibe a concentración fisiológica 1nM la producción de PGE₂ y AMPc inducida por norepinefrina en la parte medio basal del hipotálamo. Este efecto es similar a la inhibición de la actividad NOS por la melatonina en el SNP.

Los estudios muestran que el efecto máximo se observa a la concentración farmacológica de 1mM de melatonina. Sin embargo, la concentración fisiológica de melatonina (1nM) inhibe significativamente la activación de la producción de PGE₂ y AMPc inducido por norepinefrina. Además, la concentración en el rango nanomolar de melatonina se observó en la rata y los humanos durante la noche (Vakkuri y cols, 1984; Claustrat y cols, 1986). Estos resultados indican que la melatonina a concentración de 10nM inhibe la síntesis de PGE₂ en el hipotálamo de rata (Cardinali y cols, 1980).

Como hemos citado más arriba, la norepinefrina estimula la neurona NOérgica para la producción de NOS constitutiva en el hipotálamo (Rettori y cols, 1990; Moretto y cols, 1993). La liberación de NO en de la interneurona difunde hacia la neurona terminal LHRH donde se produce la liberación de LHRH, probablemente a partir de la activación de la ciclooxigenasa.

La activación de la ciclooxigenasa entonces convierte el ácido araquidónico en PGE₂ (Rettori y cols, 1992). La PGE₂ activa la adenilato ciclasa, que provoca la producción de la AMPc, lo cual a través de una proteína quinasa A, produce la liberación de LHRH para exocitosis hacia la vena porta-hipofisaria (Kim y cols, 1986; Negro-Vilar y cols, 1979).

Por otra parte, se sugiere que la inhibición de la NOS es capaz de suprimir la liberación de LHRH mientras que la producción de NO a partir de nitroprusiato (NSP) suprime la inhibición de LHRH (Rettori y cols, 1990; 1992; Negro-Vilar y cols, 1979). En este mecanismo, la melatonina podría inhibir la activación de la NOS en la parte medio basal del hipotálamo de rata, por tanto producirán una disminución de la producción de NO y en consecuencia la reducción de la síntesis

de PGE₂ y AMPc. Por lo tanto, el efecto inhibitor de la melatonina en la síntesis de PGE₂ y AMPc inducida por NE puede mostrar un mecanismo por el cual la melatonina suprime la producción de LHRH y la función reproductora (Fig 4-1).

Muchos experimentos han mostrado que la melatonina en suero puede también inhibir la liberación de LHRH. De otra parte, las hormonas hipotalámicas (factor estimulante de la prolactina, hormona liberadora de corticotrofina, vasopresina, hormona liberadora de la hormona de crecimiento y somatostatina) están también controladas por la producción neuronal de NO (Duvilanski y cols, 1995) y por lo tanto pueden estar moduladas potencialmente por la melatonina.

La inhibición inducida por la melatonina sobre la actividad de la producción de GMPc está producida por la L-arginina. Estos resultados muestran que la CaM parece estar implicada en este proceso ya que en experimentos de incubación en el medio impide el efecto de la melatonina en la actividad NOS y la producción de la GMPc (Pozo y cols, 1997). Además, se realizaron estudios para determinar la existencia de una interacción directa entre la melatonina y la CaM mediante ensayos de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida-urea. Estos resultados sugieren una posible interacción entre la calmodulina y la melatonina. (Bredts y cols, 1991).

La interacción descrita puede mostrar un nuevo mecanismo de acción de la melatonina en el hipotálamo, además de la implicación de la melatonina en la unión específica al receptor de membrana en la eminencia media y la pars tuberalis (Wear y cols, 1989, Vanecek y cols, 1988). Los sitios específicos de la unión de melatonina localizado en la membrana plásmatica están demostrados en el sistema nervioso central (Stankov y cols, 1991) incluso el hipotálamo (Wearver y cols, 1989) y en el tejido periférico (Calvo y cols, 1995).

Ebisawa y Reppert, (1994), identificaron una proteína con siete dominios transmembrana hidrófobos como receptor de la melatonina.

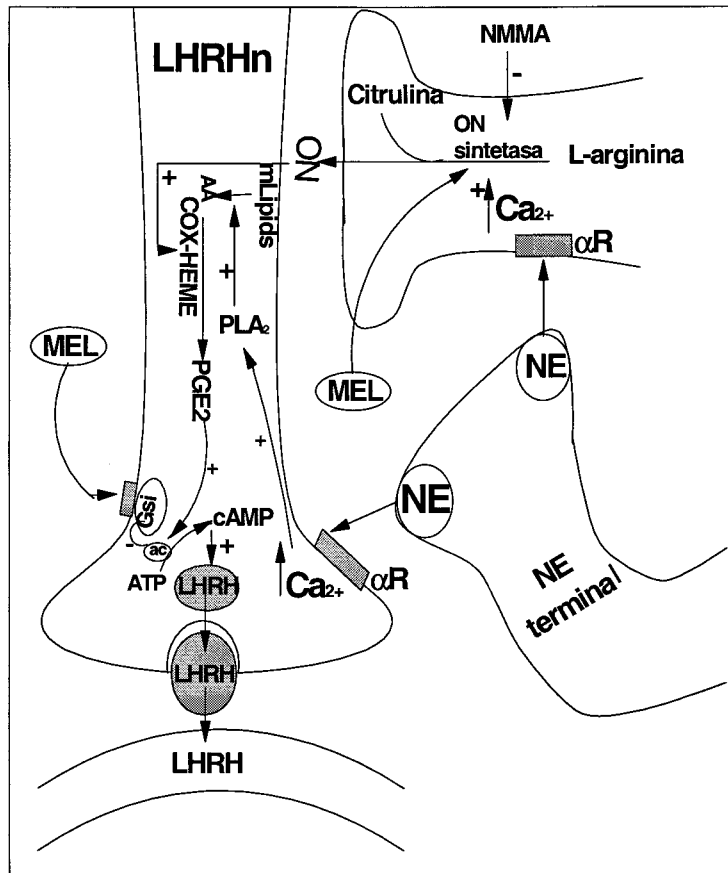


Fig 4-1: Esquema representativo de posibles interacciones de melatonina con la interneurona y la neurona terminal LHRH. m lipids, membrana lipídica; ac, adenilato ciclasa; AA, ácido araquidónico, COX-HEME, ciclooxigenasa; αR, α1-receptor adrenérgico; PLA₂, fosfolipasa A₂; -, inhibición; +, estimulación.

Recientes investigaciones han demostrado la unión de melatonina a algunos miembros de la gran familia de receptores nucleares que se comportan, en realidad, como factores de transcripción. Dentro de esta superfamilia existen los denominados receptores huérfanos, RZR/ROR. Así, Becker-André y colaboradores, (1994) clonaron en 1993 el receptor nuclear huérfano RZR α de células endoteliales de vena umbilical humana. Carlberg y colaboradores (1994) clonaron un ADNc que codificaba para el receptor nuclear huérfano RZR β de cerebro de rata. Se demostró que la melatonina se une a este receptor RZR β y lo activa, con valores de Kd e IC₅₀ en el rango nanomolar. En un trabajo posterior, Wiesberg y colaboradores (1995) comprobaron que RZR α y RZR α 1 son también receptores nucleares para melatonina y propusieron su posible implicación en la regulación transcripcional modulada por melatonina en tejidos periféricos; identificaron, además, un ligando sintético del receptor RZR, el CGP 52608, que se une específicamente a RZR α . El CGP 52608 es un agonista funcional de la melatonina que se une al receptor nuclear y lo activa, pero que no se une al receptor de membrana lo que convierte en una herramienta de gran utilidad para diferenciar entre ambas rutas de señalización, al igual que ocurre con el uso de agonistas específicos que se unen al receptor de membrana pero no al receptor nuclear, como es el caso del compuesto S 200098, N-[2-(7metoxi-1-naftil)etil]acetamida).

Los resultados muestran que CGP-52608 fue capaz de reproducir los efectos de la melatonina sobre la producción de PGE₂ y la liberación de LHRH en la parte medio basal del hipotálamo de rata, exhibiendo la misma potencia, ya que en todo momento se utilizaron las mismas concentraciones para ambos (1nM, 0,1 μ M). Estos resultados hablan en favor de un posible mecanismo mediado por receptores nucleares, frente a receptores de membrana, para el efecto inhibitor de la melatonina sobre la producción de PGE₂ y la liberación de LHRH. Sin embargo, cuando se incubó CGP-52608 en el homogenado del hipotálamo no se observó un efecto inhibitor de la actividad NOS. Estos resultados identifican la existencia de receptores nucleares de melatonina en el hipotálamo.

La adición del análogo de melatonina de la membrana S 20098 a concentración fisiológica en el medio de cultivo de MBH de rata produjo una

inhibición de la liberación de LHRH, pero no se observó ningún efecto inhibitor en la producción de PGE₂ y la actividad NOS.

Estos resultados en primer lugar nos permiten seguir investigando para completar nuestro trabajo sobre cómo actúa la melatonina a nivel nuclear en la liberación de la hormona LHRH en el hipotálamo. En el segundo lugar, podríamos obtener una mayor información sobre los diferentes mecanismos de acción de la melatonina.

CONCLUSIONES

De este trabajo, hemos llegado a una serie de conclusiones que se resumen en los siguientes puntos.

- 1-** La melatonina interacciona con la calmodulina, y esta unión produce una inhibición de la actividad NOS en el hipotálamo de rata.

- 2-** La producción de PGE₂ inducida por norepinefrina está inhibida por la melatonina.

- 3-** la producción de AMPc inducida por norepinefrina está modulada por la melatonina.

- 4-** la melatonina es capaz de inhibir la liberación de LHRH inducida por norepinefrina en la parte medio basal del hipotálamo.

- 5-** Los resultados obtenidos acerca del efecto de la melatonina sobre la liberación de LHRH, juntos a posibles mecanismos, parecen indicar que dicho efecto puede estar mediado por receptores nucleares de la hormona. Este hecho se demuestra por los resultados obtenidos con la utilización de un análogo del receptor nuclear de la melatonina, el CGP 52608.

BIBLIOGRAFÍA



Acuña-Castroviejo D, García del Río C, García-Torres L, Luna J y Osorio C (1984). Role of pineal gland in kidney-adrenal homeostasis. *Horm. Metab. Res* 16:589-592.

Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos M y Burgos A (1994). Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of liver. *J. Pineal res.* 16:100-112.

Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS y seeburg PH (1986). Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropic-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat: *Proc Natl Acad Sci USA* 83:179-183.

Arendt J (1988). Melatonin. *Clinical Endocrinol* 29:205-229.

Arendt J, aldous M, English MV y Arendt JH (1987). Some effects of jet-lag and their alleviation by melatonin. *Ergonomics* 30:1379-1393.

Ariens Kappers J (1965). Structure y function of the epiphysis cerebri. *Progr Brain. Res* 10, 87.

Arimura A, Debeljuk L y Schally AV (1972). *Endocrinology* 91:529.

Arimura A, Deblejuk L, Shino M, Rennels EG y Schally AV (1973). *Endocrinology* 92:1507.

Arimura A, Matsuo H, Baba Y, Debeljuk L, Sandow J y Sachally AV (1972). *Endocrinology* 90:163-168.

Axelrod J (1974). The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184:1341-1348.

Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH (1965). Control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. *J. Biol. Chem* 240:949-954.

Baba Y, Matsu H y Shally AV (1971). *Biochem Biophys res commun.* 44:459.

Badura LL y Goldman BD (1992). Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters. *Brain Res* 598:98-106.

Barkmann W (1943). Die epiphysis cerebri. *Mollendorf handb. Mikroskop. Anat. Des Menschem.*

Barraclough CA (1992). Neuronal control of the synthesis and release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Ciba foundation symposium* 168:233-251.

Barsch H, Barsch C, Simon WE, Flehming B, Ebels I y Lippert TH (1992). Antitumor activity of pineal gland: Effect of unidentified substances vs, the effect of melatonin. *Oncology* 49:27-30.

Becker-André M, André E y DelaMarter JF (1993). Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 194:1371-1379.

Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, André E, Missbach M, Surat JH y Calberg C (1994). Pineal gland hormone melatonin binds activates an orphan of the nuclear receptor superfamily J. *Biol. Chem* 269:28531-28534.

Benitez-King G, Huerto-Delgadillo f y Anton-Tay (1991). Melatonin modifies calmodulin levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res* 557:289-292.

Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L y anton-Tay F (1993). Binding of ³H-melatonin to calmodulin. *Life Sci* 53:201-207.

Benitez-King GL, Huerto-Delgadillo, Anton-Tay F (1990). Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Pineal Res.* 9:209-220.

Benitez-King, Huerto-Delgadillo GH, Anton-Tay F (1993). Binding of ³H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53:201-207.

Benitez-King, Huerto-Delgadillo GL y Anton-Tay F (1990). Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Pineal Res* 9:209-220.

Bergen HT, Hejtmancik JF, Pfaff DW (1991). Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists and antagonist on LHRH-synthesizing neurons as detected by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Exp Brain Research* 87:46-56.

Bergström S y Sjövall J (1960). The isolation of prostaglandin E from sheep prostate glands. *Acta Chem. Scand* 14: 1701.

Bergström S y Sjövall J (1960). The isolation of prostaglandin F From sheep prostate glands. *Acta Cehm. Scand* 14: 1693.

Besharse JC y Dunis DA (1983). Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. *Science* 219:1341-1343.

Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S y Fitzpatrick FA (1985). Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂. *Nature* 315:511-513.

Birnbaumer L, Abramowitz J y Brown AM (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1031: 163-224.

Bittman EL y Waever DR (1990). The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe. *Biol.Reprod* 43:986-993.

Bittman EL, Hkaynard A, Olster DH, Robinson JE, Yellon SM y Karsch FJ (1985). Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* 40:409-418.

Blake CA, Sawyer CH (1974). Effects of hypothalamic deafferentation on the pulsatile rhythm in plasma concentrations of luteinizing hormone in ovariectomized rats. *Endocrinology* 94:730-736.

Blazynski C y Dubocovich ML (1991). Localization of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *J. Neurochem* 56:1873-1880.

Blazynsky C y Dubocovich (1992). Localization of 2-(¹²⁵I) iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *J.Neurochem*, 1990, 56:1873-1880. Brooks DS and

Bloom W y Fawcett DW (1973). Epifisis o cuerpo pineal. En: *Tratado de Histología*. Ed. Labor, Buenos Aires. Cap. 21:537-544.

Blum M, McEwen BS y Roberts JL (1987). Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment. *J. Biol. Chem* 262:817-821.

Bolger PM, Eisner GM, Ramwell PW y Slotkoff LM (1976). Effect of prostaglandin synthesis on renal function and renin in the dog. *Nature* 259: 244-245.

Bourguignon JP, Gerard A, Purnelle G, Czajkowski V, Yamanaka C, Lemaitre M, Rigo JM, Moonen G y franchimont P (1997). Duality of Glutaminergic and Gabaergic control of pulsatile GnRH secretion by rat hypothalamic explants: I. Effects of antisense oligonucleotides using explants including or exluding the preoptic area. *J Neuroendocrinol* 9:183-191.

Bredt DH, Hwang PW, Glatt CE, Lowenstein, Creed RR y Snyder SH (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718.

Bredt DS y Snyder SH (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86:9030-9033.

Bredt DS y Snyder SH (1990). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:682-685.

Bubenik GA, Brown GM y Grota LJ (1976 a). Immunohistochemical localization of melatonin in the harderien Gland. *J. Histochem. Cytochem* 24:1173-1177.

Bubenil Ga, Brown GM y Grota LJ (1976 b). Differential localization of N-acetylated indolealkylamines in CNS and harderian gland using immunohistology. *Brain Res* 118:417-427.

Buechter DD (1988). Fre radicals and oxygen toxicity. *Pharm. Res* 5:253-260.

Calvo JR, Rafii-Eldrissi M, Pozo D y Guerrero JM (1995). Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J. Pineal Res* 18:119-126.

Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Pozo D y Guerrero JM (1995). Functional and molecular characterization of VIP receptors and signal transduction in human and rodent immune systems. *Adv. Neuroimmunol* 9:649-678.

Campbell HJ y Gallardo E (1966). *J of physiol* 186-689.

Cardinali DP, Ritta MN, Fuentes AM Gimeno MF y Gimeno AL (1980). Prostaglandin E release by rat medial basal hypothalamus in vitro: Inhibition by melatonin at submicromolar concentrations. *Eur. J. Pharmacol* 67:151-153.

Carlberg C y Weissenberg I (1995). The orphan family RZR/ROR, melatonin and lipoxigenase: An unexpected relationship. *J. Pineal Res* 18:171-178.

Carlson L, Wearver LDR y Repert SM (1989). Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology* 125:2670-2676.

Carmel PW, Araki S y Ferin M (1976). Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence of pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology* 99:243-248.

Casson VM, Brooks DS y Kelm TA (1995). Comparative distribution of 2-(¹²⁵I) iodomelatonin binding in the brains of diurnal birds:outgroup analysis with turtles. *Brain Behav.Evol* 45:241-256.

Cassone VM. Daily and circadian regulation of 2-(¹²⁵I) iodomelatonin binding in the chik brain. *Endocrinology* 131:1297-1304.

Champney TH y Champney JAC (1992). Novel anticonvulsant action of chroninc melatonin in gerbils. *Neuroendocrinology* 3:1152-1154.

Chik CL, Ho AK y Klein DC (1988). α_1 -adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptidestimulation of rat pineal adenosine 3',5'-monophosphate and

Chong NW y Sugden D (1991). Guanine nucleotides regulate 2-(¹²⁵I) iodomelatonin binding sites in chick retinal pigment epithelium but not in neuronal retina. *J. Neurochem* 57:685-689.

Chowers I y Mac Cann SM (1965). *Endocrinology* 76:700.

Christen S, Pterhans E y Stocker R (1990). Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proc. Natl acad. Sci. USA* 87:2506-2510.

Clarke IJ y Cummins JT (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in the ovariectomized ewe. *Endocrinology* 111:1737-1739.

Clarke IJ, Cummins JT, Karsch FJ, Seeburg PH y Nikolics K (1987). GnRH-associated peptide (GAP) is cosecreted with GnRH into the hypophyseal portal blood of ovariectomized sheep. *Biochem Biophys Res Commun.* 143:665-671.

Claustrat B, Brun J, Garrey P, Roussel B y Sassolas G (1986). A once-repeated study of nocturnal plasma melatonin patterns and sleep recordings in six normal young men. *J. Pineal Res* 3:301-310.

Clegg MT y Ganong WF (1960). *Endocrinology* 67:179.

Cozzi B, Stankov B, Viglietti C, Panzica, Capsoni S, Aste N, Lucini V, Frascini

F y panzica GC (1993). Distribution and characterization of melatonin receptors in the brain of Japanese quail, *Cotunix japonica*. *Neurosci.Lett* 150:149-152.

Csaba G y Barath P (1975). Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinolo. Exp* 9:59-67.

Daniels WMV, Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Pablos MI y Ortiz GG (1995). Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6-phosphatase activity. *J.Pineal Res* 19:1-6.

Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford-Hutchinson AW (1984). The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu. Rev. Immunol* 2:335-357.

De Roberts E y Pellegrino de Iraldi A (1961). Plurivesicular secretory processes and nerves endings in the pineal gland. *J. Biophys Biochem. Cytol* 10, 361.

Debeljuk L, Arimura A y Schally AV (1972). *Endocrinology* 90:585-588.

Debeljuk L, Armura A y Schally AV (1972). *Endocrinology* 90:1499.

Deby C (1991). La biochimie de l'oxigène. *La recherche* 228:56-64.

Deby C y Pincemail J (1986). Toxicité de l'oxigène, radicaux libres et moyens de défense. Presse Méd 15:1468-1474.

Del Río Ortega P (1932). Pineal gland. In pensfied W. Ed. Citology and Pathology of the nervous system, 1932), vol. 2, Hoerber, Nueva York.

Descartes R (1662). De Homine; Figuris et Latinitate Donatus a Florentio Schuyt.

Deveson S, Howarth JA, Arent J y forayth IA (1992). In vitro autoradiographical localization of melatonin binding sites in the caprine brain. J.Pineal Res 13:6-12

Dierschke DJ, Bhattacharya AN, Atkinson LE y Knobil E (1970). Circhoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. Endocrinology 87:850-853.

Dodet B (1991). La chasse aux radicaux libres oxigénés. Biofutur, Elsevier pp 23-24.

Dubocovich ML (1988). Pharmacology and function of melatonin receptors. FASEB J 2:2765-2773.

Dubocovich ML (1991). Pharmacology characterization of melatonin binding sites. Adv. Pineal Res 5:167-173.

Dubocovich ML (1995). Melatonin receptors:are there multiples subtypes? Trends Pharmacol.Sci 16:50-56.

Dubocovich ML y Takahashi JS (1987). Use of 2-(¹²⁵I) iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina.Proc. Natl.Acad.Sci.USA 84:3916-3920.

Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S y Sauri DM (1997). Melatonin receptor antagonists that differential between the human Mel(1a),and(1b) recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML(1) presynaptic heteroreceptor. Naunym-Schmiedebergs. Arch.Pharmacol 355:365-375.

Ducommun S y Guillemin R (1966). Proc. Soc. Exper. Biol and Med 122:1966.

Duncan MJ, Takahashi JS y Dubocovich ML (1989). Characterisitcs and autoradiographic localization of 2-(¹²⁵I) iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. Endocrinology 125:1011-1018.

Dunn M.J (1977). Prostaglandins and the kidney. Am. J. Physiol 233:f169-f184.

Dunn MJ (1983). Renal prostaglandins. En Contemporary Nephrology. (Klahr S y Massry S.G. eds.) Vol. 2, Plenum Publishing Corporation.

Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich AD, Pisera MLDiaz MC, Belova N, Rettori V y McCann SM (1995). Role of nitric oxide in control of prolactine release by adenohipophysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 92:170-174.

Ebadi M (1984). Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. The pineal gland. Reiter RJ ed. Raven press, New York 1-38.

Ebisawa T, Karne S, Lerner MR y Reppert SM (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from Xenopus dermal melanophores. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91:6133-6137.

Ebisawa T, Karnw S, Lerner MR y reppert SM (1994). Expression of a high-

Ekstrom P y Vanecek J (1992). Localisation of 2-(¹²⁵I) iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Neuroendocrinology 55:529-537.

Faraci FM y Brian JE (1994). Nitric oxide and the cerebral circulation. Stroke 25:692-703.

Farci FM y Brian JE (1994). Nitric oxide and the cerebral circulation, Stroke 25:692-703.

Fink G (1988). The GW Harris lecture. Steroid control of brain and pituitary function. QJ Exp Physiol 73:257-293.

Fink G (1994). Molecular principales from neuroendocrine models: steroid control of central neurotransmission. Progr Brain Res 100:139-147.

Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller M y Murad F (1991). Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88:1788-1792.

Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HW, Heller M, Murad F (1994). Calmodulin-dependent endothelium-dreived relaxing factor nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:1788-1792.

Foster DL, Cruz TAC, Jackson GL, Cook B y Nalbandov AV (1972 a). Endocrinology 90:673-683.

Foster DL, Jackson GL, Cook B y Nalbandov AV (1972 b). Endocrinology 90:684-689.

Garcia-Mauriño (1997)

García-mauriño S, gonzález-Haba MG, Calvo JR, rafii-El-Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R y Guerrero JM (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- γ production by human circulating CD4+ cells. J. Immunol 159:574-581.

Gay VL (1972). Fertil and Steril 23:50.

Gearing M y Terasawa E (1988). Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuroterminals mapped using the push-pull perfusion method in the rhesus monkey. Brain res Bull 21:117-121.

Giordano (1990). Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. J Interferon Res 10(4):403-11
Giordano (1991)

Giordano M y Palermo MS (1991). Melatonin induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. J.Pineal Res 10:117-121.

Glass JD y Lynch GR (1981). Melatonin: identification of sites of antigonadal action in mouse brain . Science 214:821-823.

Glass JD y Lynch GR (1982). Evidence for a brain sites of melatonin action in the white-footed mouse, Peromyscus leucopus. Neuroendocrinology 34:1-6.

Goldblatt MW (1935). Properties of human seminal plasma. J. Physiol (London) 84: 208-211.

Goldman BD, Darrow JM y Yogev L (1984). Effects of timed melatonin infusions on reproductive development in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). Endocrino 114:2074-2083.

Goldyne ME, Kennedy MS y Stobo JD (1981). Immunoregulatory role of prostaglandins and related lipids. CRC Crit. Rev. Immunol 1:189-223.
guanosine 3',5'-monophosphate: evidence for a role of calcium and protein kinase C. Endocrinology 122: 702-708.

Guerrero JM y Reiter RJ (1992). A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. Endocrine Res 18:91-113.

Guillemin R (1967). Annual review of Physiol 29:313.

Gutteridge JMC (1975). The use of standards for malonyldialdehyde. Ana biochem 69:518-526.

Haliwell B (1988). Free radicals and antioxidant protection mechanisms and significance in toxicology and disease. Human toxicol 7:7-13.

Halliwell B (1989). Tell me about free radicals, doctor. A review. J. Royal Soc. Med 82:747-752.

Hamberg M Svensson J, Wakabayashi T y Samuelsson B (1974). Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 71:345-349.

Hamberg M, Svensson J y Samuelsson B (1974). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 72:2994-2998.

Hamm HE y Menaker M (1992). Retinal rhythms in chicks: Circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyl transferase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4998-5002.

Hardelan R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, Wolf R Meyer TJ y Reiter RJ (1995). On the primary function of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of the free radicals. J. Pineal Res 18:104-111.

Harrington FE, Eggert RG y Wilbur RD (1967). Endocrinology 81:877.

Harris GW (1955). Neural Control of the Pituitary Gland. E. Arnold. London.

Hartmann F (1957). Über die Innervation der Epiphyse des menschlichen Gehirns. Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat 46, 416.

Helliwell RJA y Williams RJA (1992). Melatonin binding sites in the ovine brain and pituitary: characterization during the estrous cycle. J. Neuroendocrinol 4:287-294.

Herbison AE y Dyer RG (1991). Effect on luteinizing hormone secretion of GABA receptor modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge. Neuroendocrinology 53:317-320.

Hernert JPM, Stacey PM y Thorpe DH (1978). Recurrent breeding seasons in pinealectomized or optic nerve-sectioned ferrets. J. Endocrinol 78:389-397.

Hoffman K (1973). The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight and pelage color in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). J. Comp. Physiol 85:267-282.

Hoffman M (1992). A new role for nitric oxide: Neurotransmission. Science 252:1788.

Hoffman RA y Hester RJ (1965). Influence of compensatory mechanism and the pineal gland induced gonadal atrophy in male hamster. Nature 207:658.

Horton EW (1972). Prostaglandins. Proc R Soc Lond B Biol Sci 69:411-426.

Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F y Benitez-King G (1994). Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. J. Pineal res. 17:55-62.

Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitez-King G (1994). Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. J. Pineal Res. 17:55-62.

Illnerova H, Buresova HM y Presl J (1993). Melatonin rhythm in human milk. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 77:838-841.

Illnerova H, Vanecek J y Hoffman K (1983). Regulation of the pineal melatonin concentration in the rat (*Rattus norvegicus*) and in the Djungarian hamster immunoreactive β -endorphin and MET-enkephalin binding to thymic opioid receptors. *Int. J. Neurosci.* 61:289-298.

Iuvone PM y Gan J (1994). Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures. *J.Neurochem* 63:118-124.

Izumi Y, Benz AM, Clifford DB y Zorumski CF (1992). Nitric Oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 135:227-230.

Jankovic D, Isakovic K y Petrovic S (1970). Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. *Immunology* 18:1-6.

Jarry H, Leonhardt S y Wuttke W (1991). Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 53:261-267.

Kaku K, Inove Y, Matsutani A, Okubo M, Kaneki T y Yanaihara N (1983). Receptor for vasoactive intestinal polypeptide on rat dispersed pineal cells. *Biomed Res* 4:321-328.

Kappers JA (1960). The development, topographical relation and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 52:163-215.

Karsch FJ, Moenter SM y Caraty A . The preovulatory surge of gonadotropin releasing hormone. In: Crowley WF, Conn PM (eds) *Modes of action of GnRH and GnRH Analogs.* Springer-Verlag, New York, pp 241-255.

Kastin AJ, Schally AV, Gual C y Arimura A (1972). *J. Clin. Endocr* 34:753-756.

Ke Fc y Ramírez VD (1987). Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effects on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 45:514-517.

Keeton TK y Campbell WB (1980). pharmacologic alteration of renin release: *Pharmacol: Rev* 32:81-227.

Kelly MR, Amato F y Seamark RF (1984). N-acetyl-5-methoxy kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 121:372-379.

Kennaway DJ, Dunstan EA y Staples LD (1987). Photoperiodic control of the onset of breeding activity and fecundity in ewes. *J. Reprod. Fertil* 34, suppl.: 187-199.

Kernohan JW y Sayre GP (1962). Tumors central nervous system. In *Atlas of tumor pathology* 37 Armed forces Inst. Pathol. Washington.

Kilduff TS, Landel HB, Nagy GS, Suntin EL, Dement WC y Heller HC (1992). Melatonin influences fos expression in the rat suprachiasmatic. *Brain res. Mol Brain Res* 16:47-56.

Kim K y Ramirez VD (1986). Effects of prostaglandin E2 forskolin and cholera toxin on cAMP production and in vitro LH-RH release from the rat hypothalamus. *Brain Res* 386:258-265.

King JC, Anthony ELP, Fitzgerald DM y Stopa EG (1985). Luteinizing hormone-releasing hormone neurons in human preoptic/hypothalamus: differential interneuronal of immunoreactive forms. *Jclin Endocrinol Metab* 60:88-97.

Kitay JI y Altschule M (1954). The pineal gland. Harvard Uni. Press. Cambridge, mass,

Klein DC y Weller JL (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169:1093-1095.

Klein DC y Weller JL (1972). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyl transferase activity. *Science* 177: 532-533.

Klein DC, Buda M, Kapoor CL Y Krishna G (1978). Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: an abrupt decrease in cyclic AMP may be the signal for "turn off". *Science* 199: 309-311.

Klein DC, Schaad NL, Namboordiri MAA, Li Y y weller JL (1991). Control of N-acetyltransferase. *Molecular Enzymology group Colloquium* organized by A

Klein DC, Weller JL y Moore RJ (1971). Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc. Acad. Sci. USA* 68: 3107-3110.

Knobil E y hotchkiss (1988). The menstrual cycle and its neuroendocrine control. In: Knobil E, Neil J (eds) *the physiology of reproduction*. Raven Press, New York pp 1971-1994.

Knowles RG y Moncada S (1994). Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem. J* 298:249-258.

Knowles RG, palacios M, Palmer RMJ y Moncada S (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for

stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 86:5159-5162.

Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escaler G y Weiner RI (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. In: knobil E. Neill JD (eds) the Physiology of reproduction, ed. 2, raven Press, NY pp 1621-1681.

Kuehl FAJR (1976). Prostaglandin-cyclic nucleotide interactions in mamalian tissues, en prostaglandins: Chemical and Biochemical aspect. 1976, p191-196.

Kurzrok R y Lieb C (1931). Biochemical studies of human semen. II. The action of semen on the human uterus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 28: 268-270.

Laborit H (1965). Les regulations metaboliques. Masson, Paris.

Laborit H y Topall G (1991). Les radicaux libres en biologie. In biologie et électronique. Sciences du Vivant 4:81-109.

Laitien JT y Saavedra JM (1990). The chick retinal melatonin receptor revisited: localization and modulation of agonist binding with guanine nucleotides. Brain Res 528:349-352.

Laitinen JT y Saavedra JM (1990). Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. Edocrinology 126:2110-2115.

Lakin ML, Miller CH, Scott ML y Winters WD (1981). Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. Life Sci 29:2543-2551.

Le Gross Clark WE (1940). The nervous and vascular relations of the pineal gland. J. Anat 74, 471.

Leach CM y Thornburn GD (1980). A comparison of the inhibitory effects of melatonin and indomethacin on platelet aggregation and thromboxane release. Prostaglandins 20 51-56.

Leino M y Airaksinen MM (1985). Methoxyndoles of the retina. Medical Biology 63:160-169.

Leonhardt S, Seong JY, Kim K, Thorun Y, Wuttke W y Jarry H (1995). Activation of central Gaba- but not GABAB-receptors rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in the the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. Neuroendocrinology 61:655-662.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH y Mori W (1958). Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. J. Am. Chem. Soc 81, 60.

Leterrier F y Laborit H (1964). Essai d'interprétation du mécanisme d'action métabolique de la sérotonine. *Agressologie* 5:153-161.

Levine JE, Norman RL, Gliessman PM, Oyama TT, Bangsberg DR y Spies HG (1985). In vivo gonadotropin-releasing hormone release and serum luteinizing hormone release in ovariectomized, estrogen-treated rhesus macaques. *Endocrinology* 117:711-721.

Levine JE, Ramirez VD (1981). In vivo release of luteinizing-hormone hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology* 107:1782-1789.

Li S y Pelletier G (1993). Chronic administration of muscimol and pentobarbital decreases gonadotropin-release hormone mRNA levels in the male rat hypothalamus determined by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 58:136-139.

Li S y Pelletier G (1995). Inhibitory effect of the potential endogenous benzodiazepine receptor ligand, octadecaneuropeptide (ODN), on gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain. *NeuroReport* 6:1354-1356.

Lincoln DW (1988). LHRH pulse generation. In: Leng G (ed) *Pulsatility in neuroendocrine systems*. CRC Press, Boca Raton, FL pp 35-60.

Lincoln GA y Clarke IJ (1994). Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J. Neuroendocrinology* 6:251-260.

Lincoln GA y Clarke IJ (1995). Evidence that melatonin acts in the pituitary gland through a dopamine-independent mechanism to mediate effects of day length on the secretion of prolactin in the ram. *J. Neuroendocrinol* 7:637-643.

Lindroos OF, Veilahti J, Leinonen LM y Laakso ML (1993). Characterization of melatonin binding to the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat. *Eur. J. Pharmacol* 250:161-163.

Lissoni (1986)

Lissoni P, Esposti D, Esposti G, Mauri R, Rsentini M, Morabio F, Fumagalli P, Santagostino A, Delitala G y Frascini F (1986). Clinical study of the relationship between the pineal gland and the opioid system. *J. Neural. Transm* 65:63-73.

Lobo RA y Limaos EA (1991). Inflammatory response modulated by pinealectomy: Effect of light. *Brazilian Med. Biol. Res* 24:1159-1162.

López-González MA, Calvo JR, Osuna C y Guerrero JM (1992 a). Interaction of melatonin with human lymphocytes: Evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. *J. Pineal Res* 12:97-104.

Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Segura JJ, Guerrero JM Calvo JR, Segura JJ y Guerrero JM (1993 b). Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotechnol Ther* 4(3-4):253-62 m

Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Segura JJ, Guerrero JM y Maestroni (1993 a). Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL y Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193:265-275.

Mac Cann SM y Taleisknik S (1961). *Endocrinology* 68:1023.

Maestroni GJ, y Conti A (1990). The pineal hormone melatonin stimulates activated CD4⁺, Thy-1⁺ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J. Neuroimmunol* 28:167-176.

Maestroni GJ, y conti A (1991). Anti-stress role of the melatonin-immuno-opiod network: Evidence for a physiological mechanism involving T cell-derived,

Maestroni GJ y Conti A (1989). β -endorphin and dynorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int. J. Immunopharmacol* 11:333-340.

Maestroni GJ, Conti A y Pierpaoli W (1986). Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol* 13:19-30.

Maestroni GJM (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J. Pineal Res* 14:1-10.

Maestroni GJM, Conti A y Pierpaoli W (1988). Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. *Ann. NY Acad Sci* 521:140-148.

Martin JE y Klein DC (1976). Melatonin inhibition of the neonatal pituitary response to luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 191:301-302.

Martin JE, Mckeel DW. JR y Sattler (1982). Melatonin directly inhibits rat gonadotroph cells. *Endocrinology* 110:1079-1084.

Martinoli MG, Williams LM, Kah O, Titchener LT y Pelletier (1991). Distribution of central melatonin binding sites in the golfish (*Carassius auratus*). *Mol. Cell. Neurosci* 2:78-95.

Matsu H , Baba Y, Nair RMG, Arimura A y Shally AV (1971). *Biochem biophys Res Commun.* 43:1334.

Maywood ES y Hastings MH (1995). Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic

response of male Syrian hamsters of short photoperiod and melatonin. *Endocrinology* 136:144-153.

Maywood ES, Bittman EL, Ebling FJ, Barret P, Morgan P y Hasting MH (1995). Regional distribution of iodomelatonin binding sites within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster and the Siberian hamster. *J. Neuroendocrinol* 7:215-223.

Mcarthur AJ, Gillette MU y Prosser RA (1997). Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138:627-634.

McCord JM y Fridovich (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Biol. Chem* 244:6049-6055.

Mendoza A, Arimura A y Schally AV (1973). *Endocrinology* 92:1153-1160.

Menendez-Pelaez A y Reiter RJ (1993). Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res* 15:59-69.

Mikkelsen JD (1989). Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the circumventricular organs of the rat. *Cell Tissue Res* 255:307-313.

Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J y McArdle C (1995). Pituitary adenylate cyclase activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *J Neuroendocrinol* 7:47-55.

Miles A y Philbrick DRS (1988). Melatonin and Psychiatry. *Biol. Psychiatry* 23:405-425.

Mirouze J y Vlahovitch B (1967). Pinealome ectópique avec insuffisance antérieure hypophysaire, adipsie et hypernatremie neurogénique. *Endocrinol* 28, 39.

Mitsushima D, Hei DL y Terasawa E (1994). γ -Aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:395-399.

Moncada S (1979). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxanes A₂ and prostacyclin. *Pharmacol. Rev* 30:293-331.

Moncada S, Palmer RMJ y Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev* 43:109-134.

Moretto M, Lopez FJ, Negro-vilar A (1993). Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 133:2399-2402.

Morgan PJ, Barrett P, Howell E y Helliwell R (1994). Melatonin receptors: localization molecular pharmacology y physiological significance. *Neurochem. Int* 24: 101-146.

Morgan PJ, Davidson G, lawson W y Barret P (1990). Both pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins link melatonin receptor to inhibition of adenylate in the ovine pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol* 2:773-776.

Morgan PJ, Lawson W, Davidson G y Howell HE (1989). Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 50:359-362.

Morgan PJ, Lawson W, Davidson G y Howell HE (1989). Melatonin inhibits cyclic AMP in cultured ovine pars tuberalis cells. *J. Mol. Endocrinol* 5: R3-R8.
Morrey (1994)

Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD y Bakouche O (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. Immunol* 153:2671-2680.

Murthy KS, Coy DH y Makhlof GM (1996). Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C- β_3 by G- β_3 and inhibition of adenylyl cyclase by G α_i and G α_o . *J. Biol. Chem* 271: 23463-23463.

Nallar R y Mac Cann SM (1965). *Endocrinology* 76:272.

Nallar R, Grosvenor CE y Mac Cann SM (1965). *Endocrinology* 76:883

Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR y Lefkowitz JB (1986). Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem* 55:69-102.

Negro-Vilar A, Ojeda SR y MacCann SM (1979). Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. *Endocrinology* 104:1749-1757.

Nelson RJ, dumas GE Klein SL y kriegfeld LJ (1995). The influence of season, photoperiod and pineal melatonin on immune system function. *J. Pineal. Res* 19:149-165.

Niedermuller H (1986). Effects of aging on the recycling via the pentose cycle of the kinetics of glycogen and protein metabolism in various organs of the rat. *Arch. Gerontol. Geriatr* 5:305-316.

Niedermuller H (1986). Effects of aging on the recycling via the pentose cycle and on the kinetics of glycogen and protein metabolism in various organs of the rat. *Arch Gerontol Geriatr* 5(4):305-16.

Nikitowitsch, Wiener MB (1958). *Endocrinology* 63:917.

Niles LP (1989). High affinity binding sites for melatonin in hamster spleen. *Med. Sci. Res* 17:179-180.

Niles LP, Pickering DS (1989). 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster and chick exhibit differential sensitivity to prazosin. *J Pharm Pharmacol* 41(5):356-7

Olcese J y Moller M (1989). Characterization of serotonin N-acetyltransferase activity in the retina of the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Neurosci Lett* 102:235-240.

Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez R, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Acuña-Castroviejo D y Menendez-Pelaez (1995). Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J. Pineal Res* 19:11-115.

Pan SF y Allen AE (1986). Extra-pineal melatonin in the retina: its regulation and physiological function. *Pineal Res Rev* 4:55-95.

Pardridge WM y Mietus LJ (1980). Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J. Neurochem* 34:1761.

Pellegrino De iraldi A, Zieher L y DE Robertis E (1963). Ultrastructure and pharmacological studies on nerve endings of pineal gland. *Mesa Redonda internacional sobre epífisis*. Amsterdam.

Philips HS, Nikolics K, Branton D y Seeburg PH (1985). Immunocytochemical localization in the rat brain of a prolactin release-inhibiting sequence of gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 316:542-545.

Phillips HS, Nikolics K, Branton D y Seeburg PH (1985). Immunocytochemical localization in the rat brain of a prolactin release-inhibiting sequence of gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 316:542-545.

Pierrefiche G, Topall G, Henriët I y Laborit H (1991). Protective effects of gamma-hydroxybutyrate on alloxan induced diabetes in mice. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol* 71:309-319.

Pierpaoli W y Maestroni JM (1987). Melatonin: a principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: Its anti-aging effects. *Immunol. Letters* 16:355-362.

Pierrefiche G, Topall G, Curbain I y Henriët H (1993). Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol* 80:211-223.

Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1994). Melatonin, a mediator of electron transfer and repair reactions, acts synergistically with the chainbreaking antioxidants ascorbate, trolox and glutathione. *Neuroendocrinol. Lett* 17:87-92.

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JM y guerrero JM (1997). Inhibition of nitric oxide synthase and cyclic GMP production by physiological concentrations of melatonin in the rat cerebellum: a calmodulin-mediated mechanism. *J. Cell. Biochem* 65:430-442.

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR y Guerrero JM (1994). Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 55:PL455-PL460.

Prasad BM, Conover CD, Sarkar DK, Rabii J y Advis JP (1993). Feed restriction in prepubertal lambs: effect on puberty onset and on in vivo release of luteinizing-hormone-releasing hormone, neuropeptide Y and beta-endorphin from the posterior-lateral median eminence. *Neuroendocrinology*. 57:1171-1181.

Quay WB y Ma YH (1976). Demonstration of gastrointestinal-o-methyltransferase. *International reports on Clinical Sciences, medical Science* 4:563.

Raffii-El-Idrissi M, Calvo JR y Giordano M y Guerrero JM (1996). Specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by rat spleen crude membranes: Day-night variations and effect of pinealectomy and continuous light exposure. *J.Pineal Res* 20:33-38.

Rafii-El-Idrissi M, Calvo JR, Pozo D, Harmouch A Guerrero JM (1995). Specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by rat splenocytes: Characterization and role on regulation of cyclic AMP production. *J. Neuroimmunol* 57:171-178.

Rafii-El-Idrissi M, Calvo JR, Pozo D, Harmouch A, Guerrero JM Ramirez VD, Dluzen DE y Ke FC (1990). Effect of progesterone and its metabolites on neuronal membranes. En:Chadwick Dand Widow K, editores. *Steroids and neuronal activity*. Nueva YORK: Jhon Wiley and Sons 125-144.

Ramírez VD y Sawyer CH (1965). *Endocrinology* 72:282.

Raszkievicz JL, Linville DG, Kerwin JF, Wagennar F y Arneric SP (1992). Nitric oxide synthase is critical in mediating basal forbrain regulation of cortical cerebral circulation. *J Neurosci Res* 33:129-135.

Rebar R (1966). *J. Clin. Endocr* 36:10.

Redburn DA, Clement-Cormier Y and Lam DMK (1980). Dopamine receptors in the goldfish retina: ³H-spiroperidol and ³H-domperidone binding, and dopamine-stimulated adenylate cyclase activity. *Life Sci* 27:23-31.

Redding TW, Schally AV (1972). *Endocrinology* 90:764-770.

Reiter RJ (1973). Pineal control of a seasonal reproductive rhythm in golden hamsters exposed to natural day length and temperature. *Endocrinolgy* 92:423-430.

Reiter RJ (1985). Action spectra, dose-response relationships, and temporal aspects of light's effects on the pineal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 453:215-230.

Reiter RJ (1986). Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experiment animals.

Reiter RJ (1989). The pineal and its indole products; Basic aspect and clinical application. *The Brain as an endocrine org*, M. P. Cohen y P.P. Foa eds, Springer, Vienna 96-159.

Reiter RJ (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis of its physiological interactions. *Endocrin. Rev* 12:151-180.

Reiter RJ (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the again brain. *Faseb J* 9:526-533.

Reiter RJ (1996). Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced free radicals. *Eur. J. Endocrinol* 134:412-420.

Reiter RJ y Vaughan MK (1977). Pineal antigonadotropic substances: Polypeptides and indoles. *Life Sci* 21:159-172.

Reiter RJ, Blask DE y Johnson LY (1974). Melatonin: its inhibition of pineal antigonadotrophic activity in male hamsters. *Science* 185:1169-1171.

Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B Chen LD y Menendez-Pelaez (1993). Melatonin, free radicals and cancer initiation. In *advances in pineal Res* 8 London.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt y Gusella JF (1979). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel (1b) melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:295-301.

Reppert SM, Weaver DR y Ebisawa T (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177-1185.

Reppert SM, Weaver DR y Godson C (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Tends Pharmacol. Sci* 17:100-102.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD y Kolakowski (1996). JR. Cloning of melatonin-related receptor from human pituitary. *Febs Lett* 386:219-224.

Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG (1988). Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 242:78-81.

Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL Gimeno M y McCann SM (1990). Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:10130-10134.

Rettori v, Belova N, Dees WL, Nyberg CL y Gimeno M (1993). Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:10130-10134.

Rettori V, Gimeno M, Lyson K y McCann AM (1992). Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89:11543-11546.

Rettori V, Gimeno MF, Karara A, Gonzalez MC y McCann SM (1991). Interleukin 1 alpha inhibits prostaglandin E2 release to suppress pulsatile release of luteinizing hormone but not follicle-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2763-2767.

Reynnells EG, Bogdanov EM, Arimura A, Saito M y Schally AV (1971). 88:1318-1236.

Rivkees SA, Carlson LL y Reppert SM (1989). Guanine nucleotide-binding protein regulation of melatonin receptors in lizard brain. *Proc. Natl. Acad. USA* 86:3882-3886.

Rivkees SA, Cassone VM, Weaver DR y Reppert SM (1989). Melatonin receptors in chick brain: characterization and localization. *Endocrinology* 125:363-368.

Robinson JE (1991). Gamma Amino-butyric acid and the control of GnRH secretion in sheep. *J reproduction Fert* 49:221-230.

Robinson JE y Karsh FJ (1988). Timing the breeding season of the ewe: what is the role of day length? *Reprod. Nutr. Dev* 28:365-374.

Robinson JE, Wayne NL y Karsch FJ (1985). Refractoriness to inhibitory day lengths initiates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biol. Reprod* 32:1024-1030.

Ronnekleiv OK, Adelman JP, Weber E y Kelly MJ (1987). Immunohistochemical demonstration of proGnRH and GnRH in the preoptic-basal hypothalamus of the primate. *Neuroendocrinology* 45:518-521.

Rosengarten H, Meller E y Friedhoff AJ (1972). In vitro enzymatic formation of melatonin by human erythrocytes. *Research Communications in Chemical pathology and pharmacology* 4:457-465.

Rosie R, thomson E y Fink G (1990). Oestrogen positive feedback stimulates the synthesis of LHRH mRNA in neurons of the rostral diencephalon of the rat. *J Endocrinology* 124:285-289.

Rubio A, Guerrero JM, gonzalez MA, Lopez-gonzalez MA y Osuna C (1991). β - and α -adrenergic receptors are involved in regulating type II thyroxine 5'-deiodinase activity in the rat Harderian gland. *Life Sc* 49:1523-1530.

Rubio A, Guerrero JM, Reiter RJ y Osuna C (1993). Involvement of α - and β -adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase activity during development. *Endocrinology* 132: 393-398.

Rubio A, Osuna C, Jiménez J y Guerrero JM (1991). β - and α -adrenergic mechanisms are involved in regulation of rat pineal type II thyroxine 5'-deiodinase activity during development. *Endocrinology* 1991; 128: 1661-1667.

Rubio A, Osuna C, Jimenez J, Molinero C, Guerrero JM. In vivo activation of pineal N-acetyltransferase but not type II thyroxine 5'-deiodinase by phenylephrine in young rats. *Neuroscience Lett* 127: 13-15.

Sabatino FD, Collins P y McDonald JK (1999). Investigation of the effects of progesterone on neuropeptide Y-stimulated luteinizing hormone-releasing hormone secretion from the median eminence of ovariectomized and estrogen-treated rats. *Neuroendocrinology* 52:600-607.

Samuelsson B, Goldyne M, Granston E, Hamberg M, Hammarstrom S y Malmsten C (1978). Prostaglandins and thromboxanes". *Ann. Rev. Biochem.* 47: 997-1029.

Sarkar DK y Fink G (1980). Luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. *J. Endocrinol* 86:511-524.

Sarker DK y Fink G (1979). Effects of gonadal steroids on output of luteinizing hormone-releasing factor into pituitary stalk blood in the female rat. *J. Endocrinol* 80:303-313.

Schally A, Armura A, Baba, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, L Debeljuk L y White WF (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:393.

Schally AV (1966). *Endocrinology* 79:1087.

Schally AV (1967). *J. Clin. Endocr and metab* 27:755.

Schally AV, Arimura A y Bowers CY (1968). *Rec. Progr. Horm. Res* 24:497.

Schally AV, Armura A y Kastin AJ (1973). *Science*, 1973; 179:341.

Schally AV, Kastin AJ y Arimura A (1971). *Fertil and steril* 22:703.

Schally AV, Nair RMG, Redding TW y Armura A (1971). *J Biol Chem.* 246: 7230.

Scharenberg K, Liss L (1965). Structure and function epiphysis cerebri. *Progr. Brain Res* 10, 193.



Schwartz Wj (1991). Further evaluation of the tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Rhythms* 6:149-158.

Segura R (1983). Prostaglandinas y leucotrienos. *Medicina Clínica* 81: 678-687.

Shein H, Axelrod J y Wurtman RJ (1967). Serotonin synthesis in pineal gland in or organ culture. *Nature* 213, 730.

Shibata SK, Tominaga K, Hamada T y Watanabe S (1992). Excitatory effect of N-methyl-D-aspartate and kainate receptor on the 2-deoxyglucose uptake in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci. Lett* 139:83-86.

Shibuya H, Toru M y Watanabe S (1978). Glycine in the lizard retina: comparison to the GABA system. *Vis. Neurosci* 10:693-702.

Shivers BD, Harlan RE, Morrell JE y Pfaff DW (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304:345-347.

Sigal E (1991). The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am. J. Physiol* 260:L13.L28.

Silverman AJ (1988). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry. In Knobil E, Neil J (ed) *the Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York pp 1283-1304.

Silverman AJ (1988). the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry. In: Knobil E, Neil J (eds). *The Physiology of reproduction*. Raven Press, New York. 1283-1304.

Sitaram BR y Lees GJ (1978). Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J. Neurochem* 31:1021-1026.

Siuciak JA, Fang JM y Dubocovich ML (1990). Autoradiographic localization of 2- [¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the brains of C3H/HeN and C57BL/6J strains of mice. *Eur. J. Pharmacol* 180: 387-390.

Snyder SH y Brecht DS (1991). Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol. Sci.* 12:125-128.

Song T, Nikolics K, Seeburg PH y Goldsmith PC (1987). GnRH-prohormone-containing neurons in the primate brain: immunostaining for the GnRH-associated peptide. *Peptides* 45:518-521.

Soper BD y Weick RF (1981). Hypothalamic and extrahypothalamic discharges of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. *Endocrinology*, 106:348-352.

Spies HG y Niswender GD (1973). *Endocrinology* 93:814-821.

Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Fumagalli P, Scaglione F y Fraschini (1991). Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian Species: rabbit, horse and sheep. A comparative in vitro binding study. *Neuroendocrinology* 53:214-221.

Stankov B, Fraschini F y Reiter RJ (1991). Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res. Rev* 16:245-256.

Steinhilber D (1994). 5-Lipoxygenase; Enzyme expression and regulation of activity. *Pharm. Acta Helv* 69:3-14.

Stokes JB (1979). Effect of prostaglandin E₂ on chloride transport across the rabbit thick ascending limb of henle: Selective inhibition of the medullary portion. *J. Clin. Invest* 64:495-502.

Sudgen AL y Sugde D (1987). α_1 -adrenoreceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem* 262: 741-745.

Sudgen D y Klein DC (1984). Rat pineal α_1 -adrenoreceptors: identification and characterization using [¹²⁵I]Yodo-2- $[\beta$ -(4-hydroxyphenyl) ethylaminomethyl] tetralone (¹²⁵I-HEAT). *Endocrinology* 114: 435-440.

Sudgen D y Klein DC (1987). Inactivation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase by disulphide-containing compounds: *J Biol Chem* 262: 6489-6493.

Sudgen D, Grady RJ y Mefford ON (1989). Measurement of tryptophan hydroxylase activity in rat pineal glands and pinealocytes using an HPLC assay with electrochemical detection. *J. Pineal res* 6:285-292.

Sudgen D (1983). Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 227:587-591.

Sudgen D y Chong NW (1991). Pharmacological identity of 2- [¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res* 539:151-154.

Tamarkin L, Baird CJ y Almedia OFX (1985). Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction. *Science* 227:714-720.

Thieblot L y Le Bars H (1955). *La glande pineale*. Librairie maloine, Paris,

Vakkuri O, Leppaluoto J y Vuolteenaho O (1984). Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as a tracer. *Acta Endocrinol* 106:152-157.

- Vallance P, Leone A, Calvert A, Collier J y Moncada S (1992).** Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 339:572-575.
- Vallance P, Leone A, Calvert A, Collier J y Moncada S (1992).** Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339:572-575.
- Vane JR, Bunting S y Moncada S (1982).** Prostaglandin in physiology and pathophysiology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 23:161-207.
- Vanecek J (1988).** Melatonin binding sites. *J. Neurochem* 51:1436-1440.
- Vanecek J (1988).** Melatonin binding sites. *J. Neurochem* 51:1436-1440.
- Vanecek J y Jansky L (1989).** Short days induce changes in specific melatonin binding in hamster median eminence and anterior pituitary. *Brain res* 477:387-390.
- Vanecek J y Klein DC (1992).** Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca^{2+} in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 130:701-707.
- Vanecek J y Klein DC (1992).** Sodium-dependent effects of melatonin on membrane potential of neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 131:939-946.
- Vanecek J y Vollrath L (1989).** Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res* 505:157-159.
- Vanecek J y Vollrath L (1990).** Melatonin modulates diacylglycerol and arachidonic acid metabolism in the anterior pituitary of immature rats. *Neurosci. Lett* 110:199-203.
- Vanecek J, Pavlik A y Illnerova H (1987).** Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 435:359-362.
- Vanecek J, Sudgen D, Weller JL y Klein DC (1985).** Atypical synergistic α_1 - and β -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 116: 2167-2173.
- Vincens M, Li SY y Pelletier G (1994).** Inhibitory effect of 5- β -pregnan- α -o1-20-one on gonadotrophin-releasing hormone gene expression in the male rat. *Eur J pharm* 260:157-162.
- Viswanathan M, Laitinen JT y Saavedra JM (1990).** Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6200-6203.

Voisin P, Namboodiri MA y Klein DC (1984). Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J. Biol. Chem* 259:10913-10918.

Von Euler VS (1936). On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man certain animals (prostaglandins and vesiglandin)". *J. Physiol (London)* 88: 213-216.

Weaver DR y Reppert SM (1996). The Mel (1a) melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8:109-112.

Weaver DR, Liu C y Reppert SM (1996). Nature's knockout: the Mel (1b) receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol. Endocrinol* 10:1478-1487.

Weaver DR, Namboodiri MA y Reppert SM (1988). Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain. *Febs Lett* 228:123-127.

Weaver DR, Rivkees SA Reppert SM, y Stopa EG (1988). Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 242:78-81.

Weaver DR, Rivkees SA y Reppert SM (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. Neurosci* 9:2581-2590.

Weaver DR, Rivkees SC y Reppert SM (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. Neurosci* 9:2581-2590.

Wehrenberg WB, Corder R y Gaillar RC (1989). A physiological role for neuropeptide Y in regulating the estrogen/progesterone induced luteinizing hormone surge in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 49:680-682.

Weissbach H, Redfield BG y Axelrod J (1961). The enzymatic acetylation of serotonin and other naturally occurring amines. *Biochem Biophys Acta* 54: 190-191.

Wiechmann AF (1986). Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Exp. Eye Res* 42:507-527.

Wiechmann AF y Wirsig Wiechmann CR (1991). Localization and quantification of high-affinity melatonin binding sites in *Rana pipiens* retina. *J pineal Res* 10:174-179.

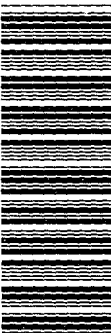
Wiechmann AF y Wirsig wiechmann CR (1994). Melatonin receptor distribution in the brain and retina of a lizard, *Anolis carolinensis*. *Brain Behav. Evol* 43:26-33.

- Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schröder M y Carlberg C (1995).** Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR α by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acid Res* 23:327-333.
- Wilkinson M, Arendt J, Bradtke J y Deziegler D (1977).** Determination of a dark-induced increase in pineal N-acetyltransferase activity and simultaneous radioimmunoassay of melatonin in pineal, serum and pituitary tissue of the male rat. *J. Endocrinol* 72:243-244.
- Williams LM (1989).** Melatonin-binding sites in the rat brain and pituitary mapped by in-vitro autoradiography. *J. Mol. Endocrinol* 3:71-75.
- Williams LM y Morgan PJ (1988).** Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J. Endocrinol* 119:1-3.
- Williams LM, Morgan PJ, Hastings MH, Davidson G y Howell HE (1989).** Melatonin receptor sites in the syrian hamster brain and pituitary. Localization and characterization using [¹²⁵I] iodomelatonin. *J. Neuroendocrinol* 1:315-329.
- Winters WD, Iakin ML, Giedt WR y Petit JR (1980).** Melatonin: pituitary action and naloxone reversed analgesia. *Proc. West. Pharmacol. Soc* 23:423-427.
- Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Santana C, Attia MA y Reiter RJ (1990b).** γ -interferon modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J. Interf. Res* 10:403-411.
- Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Santana C, Attia AM, Reiter RJ Woller MJ, McDonald JK, Reboussin DM y Tersawa E (1992).** Neuropeptide Y is a neuromodulator of pulsatile luteinizing hormone-releasing hormone release in the gonadectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 130:2333-2342.
- Wurtman RJ, Axelrod J y Kelly ED (1968).** The pineal. Academic Press. Nueva York.
- Wurtman RJ, Axelrod J y Toch (1964).** Demonstration HIOMT, melatonin and serotonin in a metastatic parenchymatous pinealome. *Nature* 204, 1-323.
- Wurtman RJ, Larin F, Axelrod J, Shein H y Rosasco Kb (1968).** Formation of melatonin and 5-hydroxyindolacetic from C-14 -Tryptophan by rat pineal gland in organ culture. *Nature* 217, 953.
- Yamashita K (1966).** *J. Of Endocr* 35:401.
- Yeates NTM (1949).** The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *J. Agric Sci* 11:1-43.

Yellon SM y Longo LD (1987). Melatonin rhythms in fetal and maternal circulation during pregnancy in sheep. *Am. J. Physiol* 252 (Endocrinol. Metab. 15):E799-E802.

Yu ZH, Yuan H, Lu Y y Pang SF (1991). [¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. *Neurosci. Lett* 125:175-178.

Yuan H, Lu Y y Pang SF (1991). Binding characteristics and regional distribution of [¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in the brain of the human fetus. *Neurosci Lett* 130:229-232.



600672260

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

ILHOM BETTAT
Darias de la secretaria de lepatolmas
de rata uediadas a tras de la ulei'si'ion
de la eside uivico 2 utasa
sobreniente au lank

10

Diciembre

99

D. Betto

Alme

Sofia Garcia Harro

Juan Carlos

Patricia

Bettahi I Pham

It