

G/207  
R.30.402

T.D  
6/207

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



80

90

25 MAYO 1999

*Pera Caffo*

**RECEPTORES DE MELATONINA  
EN SISTEMA INMUNE:  
CARACTERIZACIÓN  
Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL**

**TESIS DOCTORAL  
PRESENTADA POR  
D. ANTONIO GARCÍA-PERGAÑEDA SÁNCHEZ  
PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sevilla, 1999

**D. JUAN RAMÓN CALVO GUTIÉRREZ y D. JUAN MIGUEL GUERRERO MONTÁVEZ**, Profesor Titular y Catedrático respectivamente del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

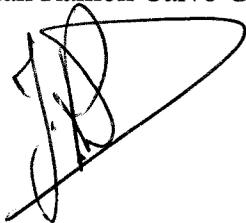
CERTIFICAN QUE: **D. ANTONIO GARCÍA-PERGAÑEDA SÁNCHEZ**, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su conjunta dirección y en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla el trabajo titulado: **“Receptores de melatonina en sistema inmune: caracterización y transducción de señal”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Sevilla, 20 de Mayo de 1999

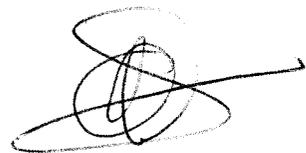
Vº Bº de los Directores

El interesado

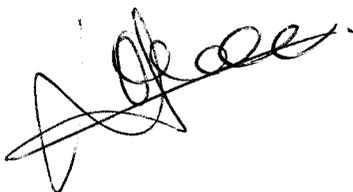
D. Juan Ramón Calvo Gutiérrez



Antonio García-Pergañeda Sánchez



D. Juan Miguel Guerrero Montávez



A mi familia

A Eva

Un hombre no puede hacerlo todo,  
pero siempre será capaz de hacer algo.  
*La Rochefoucauld*

Tómalo con calma,  
siempre con calma

## AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis doctoral suele ser un proceso largo y difícil, por lo que son muchas las personas que a lo largo de este periodo, en mayor o menor medida y ya sea en el plano profesional o personal, han echado una mano y prestado su apoyo para que “esto” sea lo que “es”.

En primer lugar me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis Juan Ramón y Juan Miguel por que me han permitido descubrir “de que va esto de” la Ciencia, al aceptarme en su laboratorio y haber iniciado mi formación como investigador.

Mi agradecimiento David, Raffi y Pepi por hacerme un sitio en el laboratorio, enseñarme lo que saben y siempre estar ahí para espantar los “chopes” que rondan a cualquier experimento.

A todos los demás compañeros del Departamento independientemente de que sean “prepersonas, propersonas o personas de pleno derecho” a los que tengo que agradecerles que hayan hecho que me encontrara en el laboratorio “como en mi casa” y permitirme participar y disfrutar de todos aquellos eventos “lúdico-aberregenerativos” que han organizado. En especial “muchas gracias” a Maripaz; por ser una amiga y superar su amistad las barreras de altura y anchura, Josemari “er máquina”, Karim “el amor de mi vida” y Antonio “el grande”; sin vosotros ¡¡qué habría sido de mí!! No me olvido de Paco “Sorensen”, Victor “el Crema”, Jose y Carmen “los amantes de Teruel...”, Juan Francisco “el hombre”, Carmen, Paty, Marisa, Sofía y al mundo árabe: Ahmed, Ilham y Soutto.

Quiero agradecer al Dr. Ulrich Siebenlist del *National Institute of Health* de Bethesda (Maryland, EE.UU.) el permitirme comprobar lo que es la investigación en el país de los guiris. Y “gracias” a Maylo, Pachi, Jose, Estefanía y Pepi por hacer que estar “allí” fuera como estar “aquí” y hacer que nuestra amistad continúe con la distancia.

Sin lugar a dudas este trabajo no se hubiera realizado sin el apoyo y comprensión de todas aquellas personas que si bien no están dentro de este mundo si pertenecen a mi vida. Por ello, quiero agradecer a Conchi, Miguel Ángel, Olga, Paco, Marta y muy especialmente a Carlos y Juan de los Reyes el ser mis “amigos”, con todo lo que esta palabra significa.

A mi familia: mis padres Antonio e Isabel, mi hermana Alicia y mi abuela Dolores “lagüela” no sólo su apoyo sino también el tener que aguantarme como soy.

Y por último, porque “los últimos serán los primeros”, todo mi agradecimiento a Eva. Este trabajo le pertenece tanto como a mí pues sin su “amistad”, paciencia, apoyo y confianza no creo que este trabajo existiera.

A todos los que están y a los que son,

¡Gracias!

## PUBLICACIONES

Los resultados de este trabajo de investigación han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. A. García-Pergañeda, D. Pozo, J.M. Guerrero and J. R. Calvo.  
Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein.  
*Journal of Immunology*, 159, 3774-3781, 1997.
2. A. García-Pergañeda, J.M. Guerrero, M. Raffi-El-Idrissi, M. Romero, D. Pozo and J. R. Calvo.  
Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein.  
*Journal of Neuroimmunology*, 95, 85-94, 1999.

Este trabajo ha sido financiado por la siguientes instituciones:

**A. Beca predoctoral:**

Beca de formación de Personal Docente e Investigador

Entidad financiadora: Consejería de Educación y Ciencia, Junta de Andalucía

Duración: 1995-1999 (Convocatoria de 1994)

**B. Estancia corta en el extranjero:**

Ayuda a estancias cortas en el extranjero

Entidad financiadora: Consejería de Educación y Ciencia, Junta de Andalucía

Duración: Septiembre-Noviembre 1998

**C. Proyectos de Investigación:**

Entidad financiadora: DGICYT

Duración: 1996-1998

Referencia: PM95-0159

Investigador principal: Dr. Juan Miguel Guerrero Montávez

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. La melatonina</b>	<b>4</b>
1.1. Breves antecedentes históricos sobre la glándula pineal	4
1.2. La glándula pineal	5
1.3. Síntesis de melatonina	8
1.4. Secreción de melatonina	10
1.5. Transducción de señal para la síntesis de melatonina	12
1.6. Biología molecular de la NAT	15
1.7. Regulación de la síntesis de melatonina	17
<b>2. Funciones biológicas de la melatonina</b>	<b>21</b>
2.1. La melatonina y la reproducción	21
2.2. La melatonina como sincronizador de los ritmos circadianos. El sueño	24
2.3. Melatonina y sistema inmune	26
2.3.1. La melatonina como modulador de la respuesta inmune	26
2.3.2. Melatonina y opioides	29
2.3.3. Melatonina y citocinas	31
2.3.4. Acciones indirectas de la melatonina	34
2.3.5. Efectos del sistema inmune sobre la glándula pineal	35
2.3.6. Sistema inmune y fotoperíodo	36
2.4. La melatonina y el cáncer	38
2.5. La melatonina como agente antioxidante	40
<b>3. Mecanismos de acción de la melatonina</b>	<b>45</b>
3.1. Receptores de membrana para melatonina	46
3.1.1. Sitios de unión para melatonina	46
3.1.1.1. Estudios de unión	46
3.1.1.2. Distribución de sitios de unión de alta afinidad	48
3.1.1.3. Regulación	50
3.1.1.4. Relación actividad-estructura de la melatonina	51
3.1.2. Caracterización molecular	52
3.1.3. Transducción de señales extracelulares	55
3.1.3.1. Receptores de membranas acoplados a proteínas G	55
3.1.3.2. Proteínas G	57
3.1.3.3. Activación de proteínas G	60
3.1.4. Transducción de señal por melatonina	62
3.1.4.1. Efectos sobre la adenilil ciclasa	63
3.1.4.2. Efectos sobre la fosfolipasa C	65
3.1.4.3. Efectos sobre la concentración de Ca <sup>++</sup> intracelular	66

3.2. Receptores nucleares de melatonina	67
3.2.1. Receptores nucleares	67
3.2.2. La familia RZR/ROR	69
3.2.3. RZR/ROR: unión al ADN	71
3.2.4. La melatonina como ligando de RZR/ROR	72
3.2.5. Receptores nucleares para melatonina	73
3.3. Melatonina-calmodulina	75
3.3.1. La calmodulina como mecanismo de acción de la melatonina	75
3.3.2. La melatonina, la calmodulina y el citoesqueleto	77
3.4. Melatonina-proteína quinasa C	78
3.5. Melatonina como neutralizador de radicales libres ( <i>Scavenger</i> )	79
3.5.1. Radicales libres de oxígeno	79
3.5.2. Protección contra los radicales libres	81
3.5.3. La melatonina como agente protector de radicales libres	82
<b>OBJETIVOS</b>	<b>85</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>89</b>
<b>1. Reactivos</b>	<b>91</b>
<b>2. Protocolos</b>	<b>92</b>
2.1. Aislamiento de linfocitos humanos	92
2.2. Aislamiento de macrófagos peritoneales de ratón	93
2.3. Preparación de membranas	94
2.4. Estudios de unión con [ <sup>125</sup> I]melatonina	95
2.5. Estudios de producción de AMP cíclico	96
2.6. Producción de diacilglicerol	97
2.7. ADP-ribosilación de proteínas G de membranas	98
2.8. Pretratamiento de membranas y células con PTx	99
2.9. Inmunodetección de subunidades de proteínas G	101
<b>RESULTADOS</b>	<b>103</b>
<b>1. Transducción de señal del receptor de membrana para melatonina en linfocitos humanos</b>	<b>105</b>
1.1. Modulación de la unión de [ <sup>125</sup> I]melatonina por nucleótidos de guanina	107
1.2. Efecto de la melatonina sobre la producción de segundos mensajeros	110
1.3. Mediación de proteínas G en la transducción de señal de melatonina	112

<b>2. Caracterización de receptores para melatonina en macrófagos peritoneales de ratón</b>	<b>117</b>
2.1. Estudios cinéticos	119
2.2. Estudios estequiométricos	122
2.3 Estudios farmacológicos	124
2.4. Unión específica de melatonina a membranas	126
2.5. Producción de AMPc	127
2.6. mediación de proteínas G en la transducción de señal de melatonina	129
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>133</b>
Transducción de señal del receptor de membrana para melatonina en linfocitos humanos	139
Caracterización de receptores de melatonina en macrófagos peritoneales de ratón	142
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>151</b>

**ABREVIATURAS UTILIZADAS**

<b><sup>125</sup>I-Mel</b>	2-[ <sup>125</sup> I]melatonina
<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina
<b>AC</b>	Adenilil ciclase
<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AMPc</b>	Adenosil monofosfato cíclico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosil trifosfato
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CRE</b>	Elemento de respuesta al AMPc
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DBD</b>	Domino de unión al ADN
<b>FLC</b>	Fosfolipasa C
<b>FSH</b>	Hormona estimuladora del folículo
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos
<b>G6PD</b>	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
<b>GM-CFU</b>	Unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
<b>GMPc</b>	Guanosil monofosfato cíclico
<b>GnHR</b>	Hormona liberadora de gonadotropina
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>Gpp(NH)p</b>	Imidodifosfato de guanililo
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>GTP</b>	Guanosil trifosfato
<b>HIOMT</b>	Hidroxiindol-O-metiltransferasa

## Abreviaturas

---

<b>HRE</b>	Elemento de respuesta hormonal
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración necesaria para inhibir un 50%
<b>ICER</b>	Proteína de respuesta temprana inducida por AMPc
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de disociación
<b>LBD</b>	Dominio de unión al ligando
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LH-RH</b>	Hormona liberadora de LH
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>MIO</b>	Péptidos opioides inducidos por melatonina
<b>NAT</b>	N-acetiltransferasa
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>NK</b>	Células T citotóxica o <i>natural killer</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD</b>	Pars distalis
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PI</b>	Fosfatidil-4,5-bifosfato
<b>PKA</b>	Proteína quinasa dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PMA</b>	Ácido fenilmercúrico
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PT</b>	Pars tuberalis
<b>PTx</b>	Toxina pertúsica
<b>ROR</b>	Receptor nuclear huérfano
<b>RZR</b>	Receptor Z retinoico
<b>SCN</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>Th</b>	Linfocito T colaboradores
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TRH</b>	Hormona liberadora de tirotrópina

# **INTRODUCCIÓN**

---

Desde su descubrimiento en 1958 el interés despertado por la melatonina, tanto en el ámbito científico como social, ha ido en aumento. Así ha pasado de ser una neurohormona involucrada en el control de procesos reproductivos de ciertos mamíferos a ser considerada una sustancia con propiedades mágicas, entre las que destacan la de ser la “hormona de la juventud”, “píldora del antienviejecimiento” o “la píldora del sueño”. Si bien los efectos beneficiosos de la melatonina en determinados campos concretos de estudio son aceptados por una gran parte de la comunidad científica, son aún muchos los estudios científicos que se requieren para poder obtener fundamentos racionales y científicos que nos permitan adoptar a la melatonina como la molécula endógena encargada de mejorar la calidad de vida.

La síntesis y secreción de melatonina por la glándula pineal sigue un ritmo circadiano, de forma que los niveles de melatonina circulante se ven aumentados por la noche y disminuidos durante el día. Esta sincronización de la liberación de melatonina con el ciclo luz-oscuridad ha hecho que se considere a la melatonina como el agente encargado de comunicar los diferentes cambios ambientales a todos los niveles del organismo para que éstos ajusten sus diferentes ritmos biológicos, ya sean circadianos o estacionales. Por tanto la glándula pineal, principal productora de melatonina, sería la encargada traducir los cambios en los periodos de luz-oscuridad que se producen en el exterior del organismo en una señal orgánica reconocible: la melatonina o la “expresión química de la noche”, como ha sido denominada.

La gran diversidad en las estrategias empleadas por las diferentes especies de mamíferos para adaptarse a las señales rítmicas proporcionadas por la melatonina llevan a respuestas específicas a dichas señales. Así, los efectos de la melatonina sobre las funciones fisiológicas son numerosos. Sus efectos sobre el sueño, reproducción, termorregulación y la ritmicidad de los ciclos biológicos endógenos han sido bien establecidos tanto en animales, como en humanos. Además, nuevas e importantes acciones de la melatonina están siendo estudiadas en la actualidad, como son sus efectos anticancerígenos, su acción como antioxidante y por tanto como factor antienviejecimiento, y su función reguladora del sistema inmune.

El carácter altamente lipofílico de la melatonina le permite entrar rápidamente en las células y es capaz de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y otras barreras morfofisiológicas. Sin embargo, se han establecidos cuatro diferentes mecanismos de acción por los cuales la melatonina puede llevar a cabo sus funciones fisiológicas. Estos son su interacción con receptores de membrana asociados a proteínas G, la interacción con receptores nucleares, la unión a proteínas citoplasmáticas reguladoras como la calmodulina, y su interacción directa con radicales libres.

## **1. La Melatonina**

### **1.1 Breves antecedentes históricos sobre la glándula pineal**

Los primeros pasos en el estudio de la glándula pineal se realizaron por el año 300 a.C. cuando Herófilo, anatomista de la Universidad de Alejandría, descubrió la pineal humana describiéndola como el órgano que regulaba el flujo de la “pneuma”, el espíritu, desde el tercer al cuarto ventrículo del sistema ventricular cerebral, donde había ubicado al alma. Galeno, en el siglo II d. J.C., describió su anatomía en detalle denominándola “konareion” por su semejanza, al menos en humanos, con una “piña de piñones”. Sin embargo, a diferencia de Herófilo, consideró que la pineal no podía ser la puerta que permitía el paso del alma de un ventrículo a otro pues se encontraba fuera del sistema ventricular. Galeno le dio carácter de glándula, es decir, órgano que comunica y sostiene los vasos sanguíneos y a sus ramificaciones. Una de las concepciones más conocidas sobre la función pineal es la postulada, en el siglo XVII, por René Descartes en su libro *De Homine*, al situar en la pineal la residencia del alma, desde donde ésta ejerce sus funciones de imaginación, sentido común y control del cuerpo y a donde llega la información procedente del cuerpo.

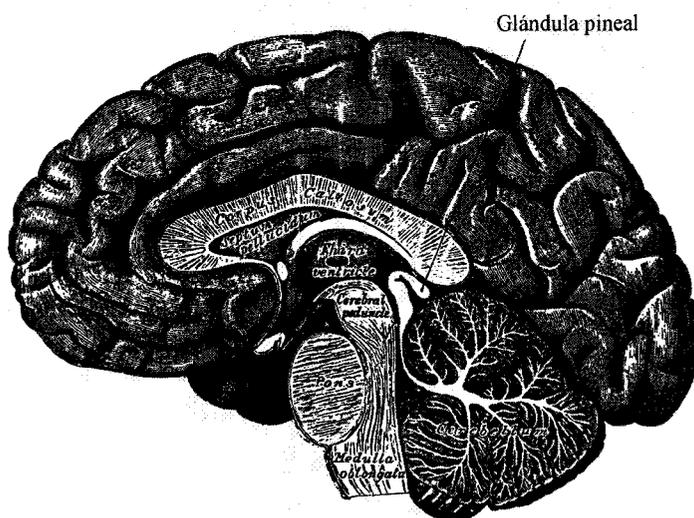
Los estudios que llevaron a la caracterización de la pineal en cuanto a su anatomía, histología y embriología comenzaron a mediados del siglo XIX, cuando se desarrollaron técnicas de disección y tinción más elaboradas. A principios del siglo XX, con la publicación del libro de Studnička, se establece el origen filogenético de la pineal como un órgano que se desarrolla a partir de uno fotorreceptor, y se postula su posible función secretora, liberando sus productos a la circulación sanguínea (Studnička, 1905). A mediados del siglo XX, en plena Segunda Guerra Mundial, Bargmann publica una revisión en la que se establece la posible función neuroendocrina de la glándula pineal, posiblemente regulando las funciones del hipotálamo (Bargmann, 1943).

La era actual del conocimiento pineal se inicia en 1954 con la publicación del libro “The Pineal Gland” por Kitay y Altschule, donde analizan un elevado número de trabajos publicados y en el que concluyen que podían atribuirse a la glándula pineal tres propiedades: a) intervención en el control de la función gonadal; b) participación, en vertebrados inferiores, en la respuesta cromática dérmica a los cambios de luz ambiental; y c) alguna vinculación con la conducta (Kitay y Altschule, 1954). En 1958, la melatonina es identificada por Lerner (Lerner et al., 1958), lo que permitió reproducir los efectos de extractos pineales y revertir las secuelas de la pinealectomía. Este

descubrimiento, junto con el desarrollo de técnicas como la microscopía de fluorescencia, radiografía, radioinmunoensayo y métodos finos de investigación bioquímica y farmacológica, han permitido la rápida evolución en el conocimiento de la glándula pineal así como de sus funciones fisiológicas. Teniendo en cuenta la gran cantidad de funciones fisiológicas que se atribuyen hoy en día a la pineal, la definición más completa que se ha formulado de este órgano es la realizada por Reiter y Hester, quienes la denominaron “el regulador de reguladores”: “La pineal es un órgano endocrino de origen neural, con múltiples funciones moduladoras de las funciones reguladoras de los sistemas endocrinos y probablemente no endocrinos, que sincroniza estas funciones con las condiciones internas y externas al organismo” (Reiter y Hester, 1966).

## 1.2 La glándula pineal

La glándula pineal o epífisis, denominada así por su situación respecto al cerebro en oposición a la hipófisis, pertenece al grupo de órganos circunventriculares; está situada en un surco entre los cuerpos cuadrigéminos superiores en la parte posterior del techo del diencéfalo, inmediatamente por debajo del cuerpo calloso (Fig. 1). Está envuelta por una membrana conjuntiva proporcionada por la piamadre, que forma tabiques ramificados y anastomosados entre sí, los cuales dividen la epífisis en celdas. En el hombre llega a pesar entre 100 y 200 miligramos, y se puede apreciar a partir del segundo mes de vida intrauterina.



**Figura 1. Localización de la glándula pineal en el cerebro humano.**  
Se representa una sección sagital medial del cerebro.

A través de la piamadre le llegan vasos sanguíneos y fibras nerviosas amielínicas. El flujo sanguíneo en la pineal es uno de los más elevados del cuerpo humano y su irrigación se produce por los vasos meníngeos. La inervación de la pineal tiene una especial importancia a la hora de comprender sus funciones fisiológicas. La pineal presenta terminaciones nerviosas postganglionares que se originan en el ganglio cervical superior y la alcanzan a través del nervio coronario (Kappers, 1976). Este tipo de inervación se originó en peces y se desarrolló progresivamente en anfibio, reptiles, aves y mamíferos. Por otra parte, ha sido descrita una inervación aferente procedente de neuronas sensoriales pineales, que es exclusiva de especies cuya pineal presenta células fotorreceptoras funcionales, estando ausente en mamíferos (Ueck, 1979).

Embriológicamente, la glándula pineal se origina como una evaginación del techo del diencefalo, del que surgen también los ojos laterales y el hipotálamo. Este origen común se refleja en el hecho de que comparten la propiedad fisiológica de responder a cambios cíclicos en la iluminación ambiental, desempeñando un papel esencial en el control de los ritmos biológicos.

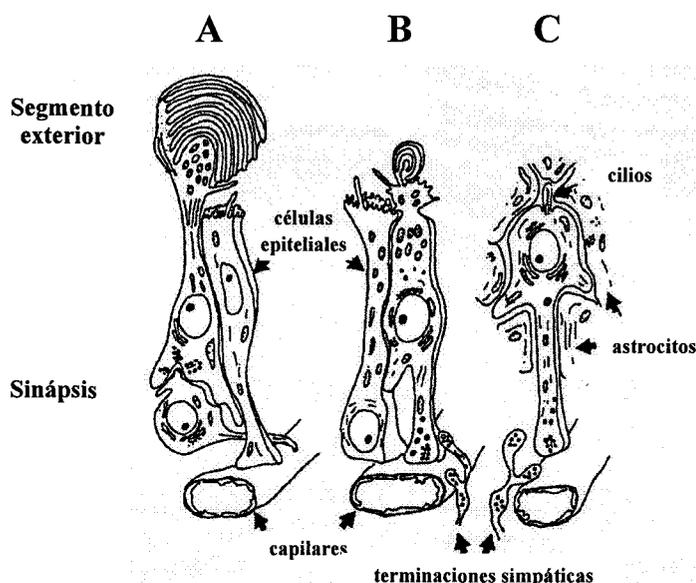
Desde el punto de vista evolutivo la pineal, o el tercer ojo de los vertebrados, forma parte de un sofisticado sistema fotoneuroendocrino formado por los ojos laterales, la propia glándula pineal y las formaciones supernumerarias vinculadas al tercer ojo; estas formaciones son: el órgano parapineal de lampreas y peces, el órgano frontal de los anfibios y el órgano parietal de los reptiles (Oksche y Hartwig, 1979).

Filogenéticamente se identifican tres estadios en la evolución de la glándula pineal. Una primera etapa como fotorreceptor en invertebrados inferiores, anfibios y peces, transformando la señal lumínica ambiental en una señal neural aferente hacia el sistema nervioso central a través del nervio pineal. Una segunda etapa en la que actúa como un transductor endocrino en los mamíferos, perdiendo la capacidad fotorreceptora y recibiendo la señal luminosa vía retina neural; las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior son la vía final común para el control fótico de la glándula pineal en la mayoría de los mamíferos. Se establece en tercer lugar un estadio intermedio como transductor fotoendocrino en las aves, donde fotorreceptores presentes en la glándula tienen cierta capacidad para transformar la energía lumínica en una respuesta secretora (Cardinali, 1974).

El pinealocito o célula parenquimatosa de la glándula pineal es el componente celular más abundante en la pineal de los mamíferos; células epiteliales y células gliales componen el resto de la masa celular. Estas células pineales son más o menos abundantes dependiendo de la especie, pero su presencia es constante en todos los vertebrados inferiores y superiores. Los pinealocitos derivan de

la línea endotelial del epitalamo; son células grandes, de núcleo voluminoso, que emiten prolongaciones citoplasmáticas que terminan en los espacios intercelulares o perivasculares. Se pueden distinguir dos tipos de células parenquimatosas, claras y oscuras, en función de la diferente densidad electrónica que presentan sus citoplasmas. Esta diferencia posiblemente se deba a diferentes estados funcionales de los pinealocitos (Karasek y Reiter, 1992).

Al igual que la pineal, el pinealocito ha evolucionado filogenéticamente desde una célula con capacidad fotorreceptora y/o secretora, como ocurre en anfibios, reptiles y peces, a la célula exclusivamente secretora de los mamíferos (Fig. 2). Esto se refleja en la evolución morfológica que presentan los pinealocitos. Las prolongaciones segmentadas exteriores, encargadas de la función fotorreceptora, y las estructuras que realizan la transmisión de la señal fótica transducida degeneran progresivamente a lo largo de la evolución, mientras que las encargadas de la actividad secretora se desarrollan progresivamente (Collin y Oksche, 1981).



**Figura 2. Representación esquemática de los pinealocitos de diversos vertebrados. A:** Los pinealocitos de peces y anfibios poseen segmentos externos muy desarrollados y fotorreceptivos y establecen sinápsis con neuronas que proyectan a núcleos del diencefalo y del mesencefalo. **B:** Los pinealocitos de reptiles y aves presentan un segmento exterior reducido pero aún con capacidad fotorreceptora y contactan directamente con los capilares sanguíneos. Presentan una mayor inervación simpática. **C:** Los pinealocitos de mamíferos han perdido su capacidad fotorreceptora y presentan cilios vestigiales.

### 1.3. Síntesis de melatonina

En 1958 Lerner y cols (Lerner et al., 1958), quienes estaban investigando la sustancia que causaba la formación de parches blancos en la piel de humanos, y partiendo de la ya conocida existencia de un factor aclarador de la piel de los anfibios contenido en la pineal de los mamíferos, consiguieron aislar y determinar la estructura de dicho factor aclarador pineal a partir de grandes cantidades de pineales bovinas. Esta sustancia fue identificada como *N*-acetil-5-metoxitriptamina, una indolamina, y debido a su efecto blanqueador de los melanóforos la denominaron melatonina. Seguidamente fue demostrada por Axelrod y cols la presencia en la glándula pineal de las enzimas necesarias para la síntesis de melatonina (Axelrod, 1974).

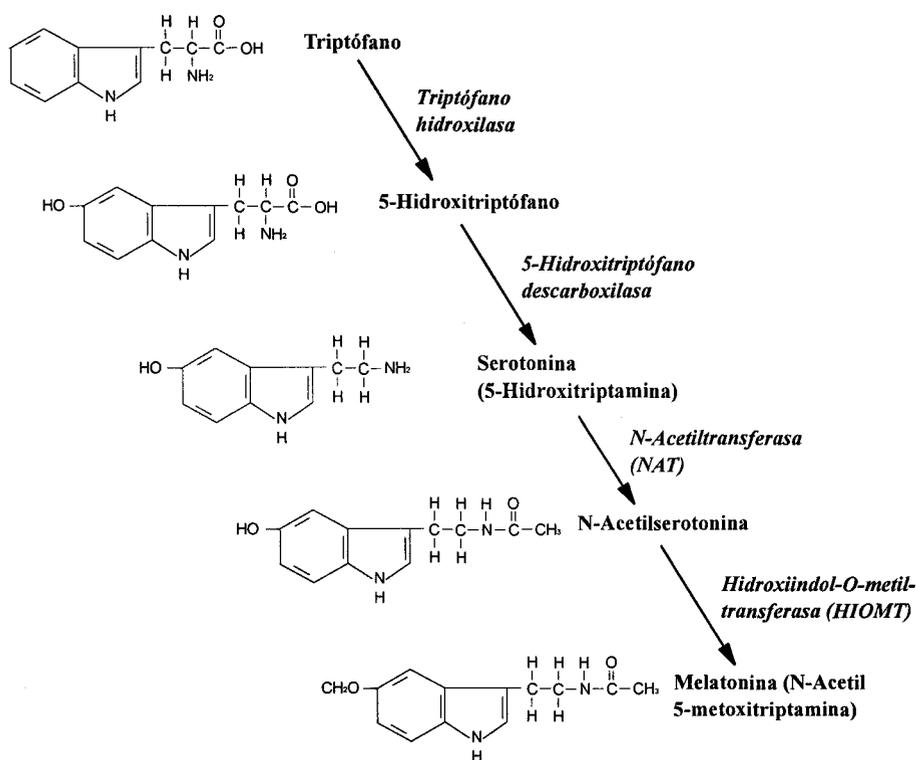
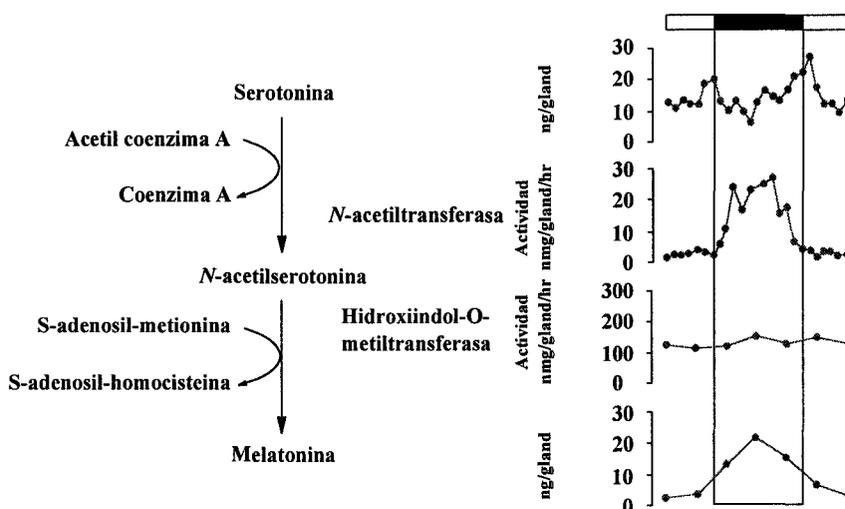


Figura 3. Ruta de biosíntesis de melatonina en la glándula pineal.

La biosíntesis de la melatonina por la glándula pineal está bien establecida (Sugden, 1989). Dicha biosíntesis (Fig. 3) se inicia con la captación de triptófano de forma activa por los pinealocitos, la mayor parte del cual se utiliza para la síntesis de indolaminas. El paso inicial es la oxidación del triptófano a 5-hidroxitriptófano por la acción de la triptófano hidroxilasa, reacción que requiere  $O_2$  y  $Fe^{2+}$ . El 5-hidroxitriptófano es decarboxilado a serotonina (5-hidroxitriptamina) por la 5-

hidroxitriptófano decarboxilasa. Una parte de la serotonina producida se deriva hacia la síntesis de melatonina, proceso se lleva a cabo en dos pasos. La serotonina es acetilada a *N*-acetilserotonina por acción de la enzima *N*-acetiltransferasa (NAT). Finalmente otra enzima, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), transfiere un grupo metilo, donado por la S-adenosilmetionina, a la posición 5-hidroxi de la *N*-acetilserotonina y se forma melatonina.

Las enzimas triptófano hidroxilasa y NAT presentan un ritmo luz-oscuridad de actividad, con un pico nocturno de máxima actividad (Klein y Weller, 1970; Sitaram y Lees, 1978; Binkley, 1993), que hace que la serotonina y la melatonina sigan un marcado ritmo circadiano de síntesis en la glándula pineal (Fig. 4). La biosíntesis de melatonina está principalmente controlada por la actividad de la NAT, cuya reacción se considera paso limitante en la producción de la melatonina. La actividad de la HIOMT no parece presentar una variación con el ciclo luz-oscuridad, aunque es más alta durante la noche (Sugden et al., 1989; Binkley, 1993), por lo que se piensa que la actividad de la HIOMT podría intervenir en la regulación de la síntesis de la hormona.



**Figura 4. Ritmo representativo de biosíntesis de melatonina.** Valores tomados en la glándula pineal de pollo (Modificado de Binkley, 1993).

La síntesis de melatonina no es exclusiva de la pineal, ya que tanto la melatonina como las enzimas implicadas en su síntesis se han encontrado en estructuras extrapineales (Binkley, 1981; Klein et al., 1996). La síntesis extrapineal se puso de manifiesto cuando se detectó la presencia de melatonina en la sangre y la orina de animales pinealectomizados. Se ha determinado la presencia de melatonina en retina, glándula harderiana, hipotálamo, cerebelo y células gastrointestinales, así como en diversas células del sistema inmune (Kvetnoy y Yuzhakov, 1994).

## **1.4 Secreción de melatonina**

Una vez la melatonina ha sido sintetizada es liberada directamente al espacio intercelular. Debido a su pequeño tamaño y al hecho de ser altamente lipofílica e hidrofóbica, y por tanto, altamente soluble en todos los ambientes, difunde pasivamente a través de la membrana celular de los pinealocitos sin ser almacenada en vesículas de secreción, siendo así rápidamente liberada.

Si bien se ha detectado la presencia de melatonina en casi todos los fluidos estudiados, comúnmente se acepta que la melatonina es liberada directamente al sistema vascular sanguíneo y de forma secundaria a otros fluidos corporales. Las elevadas concentraciones de melatonina presentes en el líquido cerebroespinal, superiores a veces a las presentes en sangre, hacen pensar que ésta podría ser una importante ruta secretora y probablemente la utilizada de forma preferentemente por la melatonina para alcanzar el cerebro.

La presencia de melatonina en el plasma de todos los animales estudiados es más elevada durante los periodos de oscuridad que durante el día debido a que la liberación de la hormona varía a lo largo del ciclo luz-oscuridad. Este aumento nocturno parece derivar principalmente, aunque no de manera exclusiva, de la glándula pineal. Tanto la pinealectomía como la denervación de la glándula por ganglionectomía cervical superior suprimen la aparición del incremento nocturno de melatonina en plasma. Además de la luz existen otros factores que parecen afectar a la producción de melatonina, como son la temperatura y los campos electromagnéticos.

La melatonina es transportada en el flujo sanguíneo unida a albúmina, aunque en el líquido cerebroespinal no está unida a proteínas. La vida media de la hormona es muy corta, entre diez y cuarenta minutos (28.4 minutos en humanos), lo que depende tanto de su difusión a otros fluidos como de su degradación metabólica, la cual se lleva a cabo en un 90% en el hígado. La melatonina captada por los hepatocitos es hidroxilada en un único paso a 6-hidroximelatonina, a continuación es conjugada con sulfato para formar 6-sulfatoximelatonina (70%), y en menor medida glucurónido (6%), escapando al metabolismo el 1% de la melatonina. En el cerebro la melatonina es metabolizada a *N*-acetil-5-metoxiquinuramina durante el proceso de eliminación de radicales libres. Todos estos metabolitos son excretados en la orina.

Se han encontrado concentraciones significativas de melatonina en diversos fluidos biológicos humanos. En la saliva se han encontrado altas concentraciones de melatonina, las cuales siguen un

ritmo similar al observado en la sangre; durante el día los niveles son similares en ambos fluidos, y por la noche aumenta aunque no alcanza las concentraciones que se encuentran en sangre (Laasko et al., 1990). Se ha detectado la presencia de melatonina en fluidos estrechamente relacionados con la reproducción como son fluido seminal (Bornman et al., 1989), el fluido folicular ovárico, donde las concentraciones son superiores a las sanguíneas (Brzezinski et al., 1987), en líquido amniótico, con un ritmo y concentraciones semejantes a las sanguíneas (Kivelä et al., 1989), y en la leche materna (Illnerova et al., 1993).

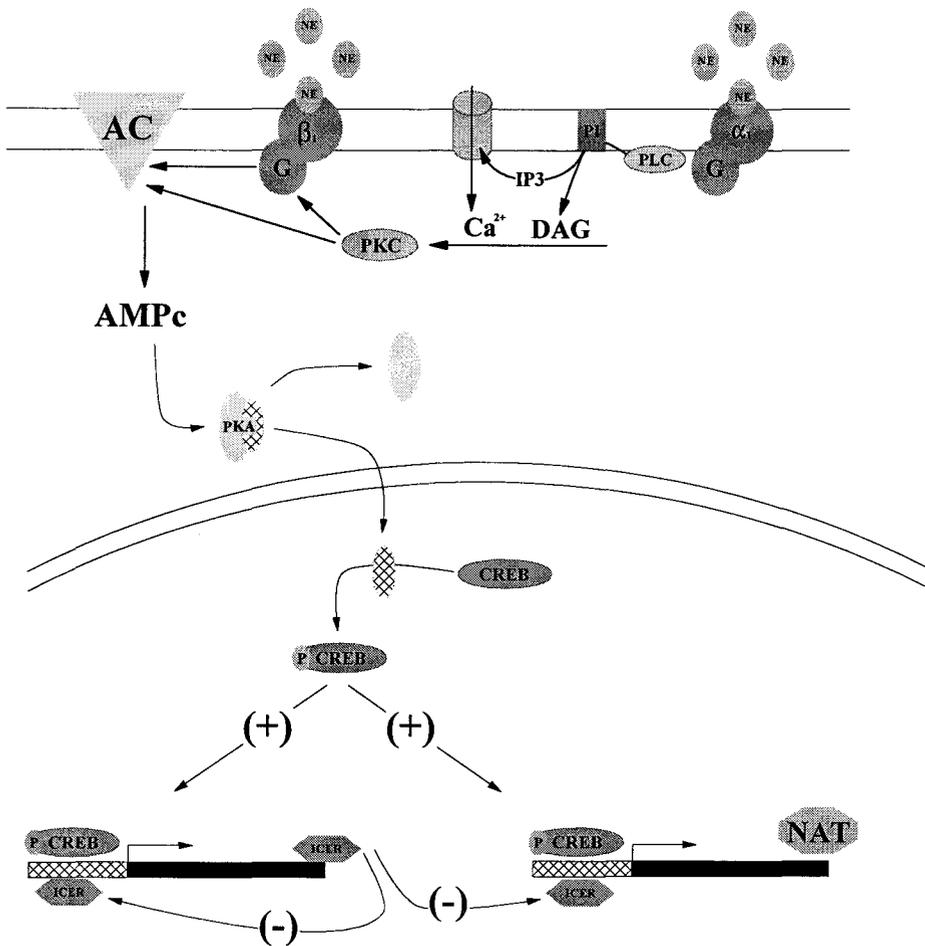
En relación con el crecimiento y desarrollo de los individuos, los estudios realizados en diversos mamíferos, incluido el hombre, muestran que la hormona no es sintetizada por el organismo durante el periodo fetal, ni en los individuos recién nacidos, no encontrándose un ritmo de secreción de melatonina hasta los 2-4 meses de vida. Durante este periodo la melatonina es suministrada por vía sanguínea través de la placenta o en la leche materna. Tras los primeros meses de vida la producción de melatonina se incrementa rápidamente durante el primer año, y alcanza los niveles nocturnos más elevados entre el primer y tercer año. Los niveles de melatonina empiezan a disminuir hacia el principio de la pubertad, momento a partir del cual, la producción de melatonina decae sustancialmente con el envejecimiento fisiológico (Sack et al., 1986; Reiter, 1994).

La disminución de la funcionalidad de la glándula pineal con el envejecimiento se pone de manifiesto de manera evidente en la gradual reducción de la amplitud del pico nocturno de producción de melatonina. El mecanismo que lleva a la disminución gradual de la síntesis de melatonina con el envejecimiento parece estar relacionado con la reducción del número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana de los pinealocitos (Henden et al., 1992) y el daño causado a células del NSC y del hipotálamo inducido por la formación de radicales libres que acompaña al envejecimiento (Poeggeler et al., 1993). Por otra parte, la gran variabilidad existente entre los individuos de un mismo grupo de edad en cuanto a los niveles de melatonina está relacionada con una serie de factores condicionantes como son la predisposición genética, estado de salud y condiciones ambientales.

La melatonina circulante, al ser muy lipofílica, puede ser rápidamente transferida a otros fluidos, alcanzar todos los tejidos corporales y pasar a través de las membranas celulares. Así, se puede decir que todas las células del organismo reciben información acerca de los cambios del fotoperiodo.

### 1.5. Transducción de señal para la síntesis de melatonina

La transducción de señal para la síntesis de melatonina (Fig. 5) se inicia con la liberación de norepinefrina (NE) por las terminaciones nerviosas de las fibras simpáticas, que inervan la glándula pineal, procedentes de células postganglionares del ganglio cervical superior, y su unión a receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos en la membrana de los pinealocitos. La unión de NE al receptor activa una adenilil ciclasa, (AC) por medio de una proteína de unión a nucleótidos de guanina estimuladora (proteína  $G_s$ ), induciendo un aumento en los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPC) (Axelrod, 1974).



**Figura 5. Transducción de señal de la síntesis de melatonina.** Se representa la inducción de la activación de la NAT por los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos y su potenciación por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, así como el posible mecanismo de regulación por ICER.

Aunque la población de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos es predominante en la membrana de los pinealocitos, existe una pequeña población de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Fig. 5). La activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos por NE amplifica la respuesta de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos ya activados, al aumentar la producción de AMPc. Esta amplificación se debería a un aumento de la eficiencia de la actividad adenilil ciclasa por medio de la fosforilación, por acción de proteínas quinasas C (PKC), de la propia adenilil ciclasa o de la proteína  $G_s$ . La activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos incrementa los niveles intracelulares de diacilglicerol y de  $Ca^{2+}$ , posiblemente por la activación de la fosfolipasa A, la fosfolipasa C (FLC) y la proteína quinasa dependiente de fosfolípidos (Ho y Klein, 1987; Ho et al., 1988). El aumento de estos segundos mensajeros permite la translocación a la membrana y la activación de PKC (Sugden, 1989).

El aumento de los niveles intracelulares de AMPc conlleva el incremento de la producción de melatonina. Este incremento en la síntesis de melatonina coincide con el aumento de la actividad de la NAT. La velocidad a la cual el AMPc incrementa la actividad de la NAT y la magnitud de este aumento varían según las diferentes especies (Reiter, 1991a). Sin embargo, existen excepciones en las cuales el incremento de la síntesis de melatonina no conlleva un aumento significativo de la actividad de la NAT (Menéndez-Peláez et al., 1990). El aumento de AMPc produce además un incremento de los niveles de ARNm de la NAT (Roseboom et al., 1996).

El mecanismo por el cual se produce el aumento de la actividad y de los niveles de ARNm de la NAT son poco conocidos. Estudios recientes sugieren que el AMPc aumentaría los niveles de ARNm de la NAT a través de la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) para formar la proteína activa, fosforilada, de este factor de transcripción (PCREB). La fosforilación la llevarían a cabo proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) que una vez activadas se translocan al núcleo fosforilando a CREB. Una vez activada PCREB se une a su diana específica de unión CRE (elemento respuesta a AMPc) en el promotor de la NAT en su activando la transcripción (Roseboom y Klein, 1995) (Fig 5.).

Por otra parte, la sola activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos eleva los niveles de ARNm de la NAT (Roseboom et al., 1996) pero sin alterar el estado de fosforilación de CREB (Roseboom y Klein, 1995), sugiriendo un mecanismo alternativo mediado por elementos de respuesta a  $Ca^{2+}$  o proteínas quinasas dependientes de fosfolípidos.

Se ha establecido la existencia de un mecanismo regulador de la transcripción de la NAT. Los niveles de ARNm de la NAT decaen gradualmente después de alcanzar el pico de máxima expresión.

Sin embargo, este efecto no tiene lugar cuando se bloquea la síntesis de proteínas, lo que indica que se debe producir la síntesis de uno o más factores inhibidores e inducibles que inhiban gradualmente el aumento de los niveles de ARNm de la NAT (Roseboom et al., 1996). Un candidato sería una ARNasa dirigida contra el ARNm de la NAT, o algún factor de transcripción inhibidor. Dos factores de transcripción han sido propuestos, el antígeno 2 relacionado con Fos (Fra-2) (Baler y Klein, 1995) y la proteína de respuesta temprana inducida por AMPc (ICER) (Stehle et al., 1993). La expresión de ARNm de ambos factores presenta fluctuaciones circadianas equivalentes a las del ARNm de la NAT; además, ambos factores están bajo el control de señales adrenérgicas.

Se ha sugerido un mecanismo por el cual ICER regula la ritmicidad de la expresión de ARNm de la NAT (Fig. 5). El aumento de AMPc activaría la PKA, que fosforilaría CREB, de forma que PCREB aumentaría la síntesis del ARNm de la NAT y la expresión de ICER al unirse a los promotores de los genes que codifican para ambas proteínas. Por otra parte ICE regula negativamente su propia expresión, de tal forma que el balance entre las proporciones de PCREB e ICER es quien determina la actividad de la transcripción del gen de la NAT (Foulkes et al., 1996).

En la regulación de la actividad *N*-acetiltransferasa, los mecanismos postranscripcionales parecen tener una función importante. Esta idea se basa en el hecho de que la presencia de luz durante periodos de oscuridad disminuye la actividad de la NAT sin afectar a los niveles de ARNm, y como en condiciones de iluminación constante el ritmo de actividad de la NAT se suprime, mientras que el ritmo de síntesis de ARNm no se ve afectada (Roseboom et al., 1996).

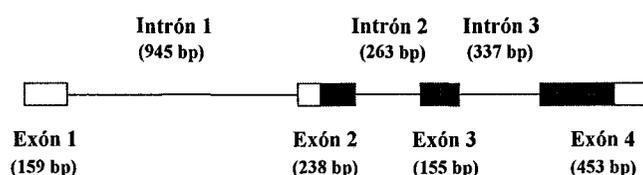
De todos estos datos podemos interpretar que la relación entre la síntesis de ARNm de la NAT y su actividad enzimática durante los primeros instantes de la noche, cuando la actividad enzimática se incrementa, difiere de la que se da en los últimos momentos de la noche, momento en que la actividad enzimática disminuye. Al principio del periodo de oscuridad, la síntesis de ARNm y la actividad de la NAT incrementan en paralelo; esto sugiere que el incremento de ARNm es necesario para el aumento de la actividad, determinando así la tasa de incremento de la actividad de la NAT. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el tratamiento con actinomicina D, que inhibe la transcripción, bloquea tanto el aumento de ARNm como la actividad (Roseboom et al., 1996). Por otra parte, la actividad de NAT puede decrecer sin que disminuyan los niveles de ARNm, sugiriendo la existencia de mecanismos post traduccionales que modificarían dicha actividad (Roseboom et al., 1996). En este sentido, se ha demostrado cómo la disminución de AMPc y la presencia de agentes reductores de grupos tioles, que rompen puentes disulfuro, inhiben la actividad de la NAT (Klein et al., 1978; Namboodiri et al., 1980).

Además de los receptores  $\alpha_1$ - y  $\beta_1$ -adrenérgicos se ha encontrado una población relativamente abundante de receptores  $\sigma$  en la glándula pineal (Jansen et al., 1990). La activación de receptores  $\sigma$  por agonistas específicos potencian la actividad de la NAT y la síntesis de melatonina previamente estimuladas por agonistas de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos durante el día, o por NE endógena durante periodos de oscuridad (Steardo et al., 1996).

## 1.6. Biología molecular de la NAT

Como se ha visto, la *N*-acetiltransferasa es la enzima que controla el ritmo diario de síntesis de melatonina en la glándula pineal. La clonación del ADNc que codifica para la NAT (Borjigin et al., 1995; Coon et al., 1995) ha permitido un rápido avance en el conocimiento de su regulación y síntesis, así como de la ritmicidad de la síntesis de melatonina.

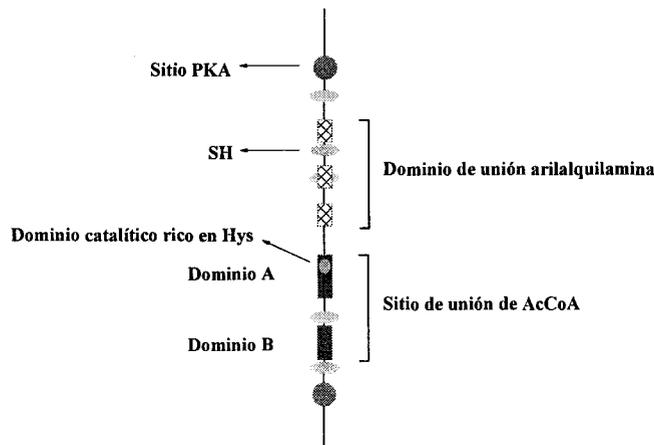
El gen humano para la NAT, de unos 2.5 kb, está localizado en el cromosoma 17q25. Presenta cuatro exones y transcribe un único ARNm de diferentes tamaños en función de la especie, que tiene una longitud de 0.95 kb (Fig. 6).



**Figura 6. Organización del gen humano de la *N*-acetiltransferasa.**  
Las áreas en negro muestran la pauta abierta de lectura.

El gen de la NAT representa una nueva familia dentro de la superfamilia de las acetiltransferasas. La NAT (~25 kDa) se caracteriza por tener una alta especificidad de sustrato, al ser muy selectiva para algunas arilalquilaminas como la serotonina y la triptamina, tener muy baja selectividad para otras como la histamina y la norepinefrina, y no tener afinidad por la arilaminas. Esta selectividad limita la función biológica de la NAT a la acetilación de la serotonina.

La NAT (Fig. 7) presenta dos dominios, denominados A y B, que contienen varios aminoácidos conservados, que se localizan entre los residuos 122-141 y 166-178 respectivamente (Coon et al., 1995). El sitio de unión de la arilalquilamina se localiza en un dominio de 50 aminoácidos que presenta tres secuencias (49-59, 73-86, 91-101) completamente conservadas en todas las NAT clonadas.

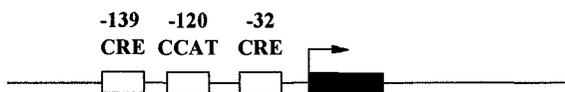


**Figura 7. Promotor de la *N*-acetiltransferasa de pinealocitos de rata.** Se representa la posible caja TATA, el posible sitio CRE y la caja CCAAT.

La secuencia de aminoácidos es muy similar entre los diferentes vertebrados, con un 82 % de similitud. Dicha secuencia de aminoácidos presenta una serie de características altamente conservadas como son sitios susceptibles de fosforilación tanto para PKC como para PKA, sitios para la unión de acetilcoenzima A y para la transferencia del grupo acetilo, una región rica en histidinas que podría participar en la *N*-acetilación de la serotonina, y grupos de unos cinco residuos de cisteína que pueden intervenir en la inactivación química mediada por compuestos que contengan grupos disulfuro (Fig. 7).

El promotor del gen de la NAT (Fig. 8) presenta tres puntos de iniciación de la transcripción. El principal de ellos, situado a 38 pb corriente abajo de una secuencia semejante a la caja TATA, se encuentra situado dentro de una posible secuencia consenso iniciadora y da lugar a la secuencia líder más larga (173 nucleótidos). La traducción se ve afectada por las estructuras secundarias que adoptan las secuencias líder. A su vez, en el promotor se han encontrado un posible sitio de unión para AP-1, una secuencia que se asemeja mucho (siete de ocho nucleótidos) a la secuencia consenso CRE, y una

caja CCAAT invertida. Tanto el sitio CRE como la caja CCAAT invertida mostraron ser capaces de unir sus proteínas ligando específicas, CREB y proteínas de unión a secuencias CAAT, y ser necesarias para la transcripción; mutaciones en estas secuencias bloqueaban la transcripción (Baler et al., 1997).



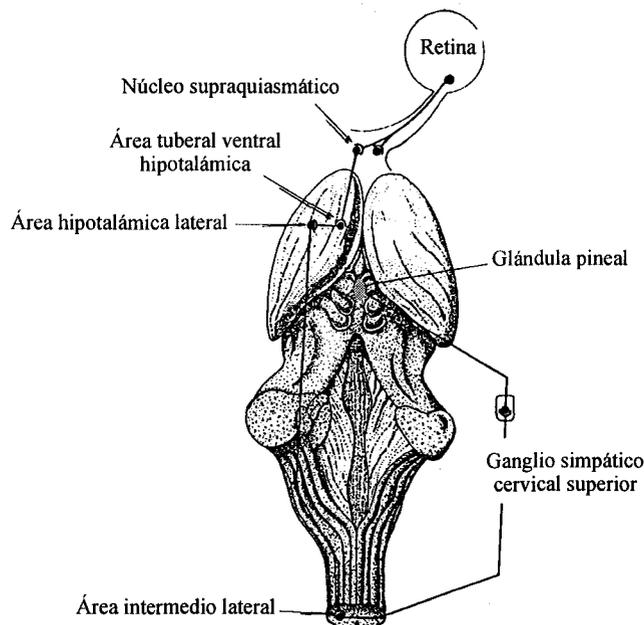
**Figura 8. Dominios conservados en la *N*-acetiltransferasa.** Los dominios son comunes a las secuencias de aminoácidos de la NAT en humano, rata, oveja y pollo.

Todas estas propiedades que caracterizan molecularmente a la NAT sirven como base para confirmar, o al menos no descartar, las hipótesis formuladas sobre la regulación de su síntesis y actividad.

## 1.7 Regulación de la síntesis de melatonina

La glándula pineal es el lugar donde la información sobre los periodos de luz-oscuridad se traduce a la señal química reconocible por el organismo que es la melatonina (Reiter, 1991a). La síntesis de melatonina sigue un marcado ritmo circadiano, de forma que se inicia a última hora de la tarde y se va incrementando progresivamente hasta alcanzar valores máximos a mitad de la noche para, a partir de aquí, ir decayendo hasta alcanzar niveles basales a primera hora de la mañana.

Las vías neuronales por las cuales se regula la actividad de la glándula pineal (Fig. 9) están perfectamente establecidas (Moore, 1978). La luz que se percibe a través de la retina es convertida en impulsos eléctricos que alcanzan el núcleo supraquiasmático (SCN) a través del tracto retinohipotalámico. Desde el SCN salen proyecciones hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo; las neuronas de este núcleo se proyectan hacia el hipotálamo lateral, de donde emergen axones que conectan directamente con neuronas preganglionares simpáticas de la columna intermediolateral de los segmentos torácicos superiores. Los axones de las neuronas preganglionares alcanzan el ganglio cervical superior, donde se origina la inervación postganglionar simpática de la glándula pineal.



**Figura 9. Esquema de la vía de transmisión de la información lumínica desde los ojos hasta la glándula pineal de un mamífero. Únicamente se representa el diencéfalo.**

La producción de melatonina en la pineal de los mamíferos viene determinada por la actividad de las neuronas de SCN. En ausencia de activación por la luz de las células fotoeléctricas de la retina el SCN induce la estimulación de los pinealocitos mediante la liberación de NE por las células postganglionares del ganglio cervical superior.

El ritmo circadiano de la síntesis de melatonina se origina en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. En animales que son mantenidos en condiciones de oscuridad continua el ritmo de melatonina permanece sin alteraciones, aunque disminuido. Por otro lado, la ruptura neural en cualquier punto situado entre los ojos y el SCN estimula la síntesis de melatonina, mientras que la eliminación de los ganglios cervicales superiores abole el ritmo circadiano de la síntesis. Esto sugiere que es el SCN, actuando como un reloj endógeno, quien marca el ritmo circadiano de la síntesis de melatonina con una periodicidad ligeramente superior a 24 horas, y adaptaría la síntesis a este periodo de 24 horas en base a las variaciones en la duración de los periodos de luz-oscuridad.

La regulación circadiana de la síntesis de melatonina se pone de manifiesto en cada uno de los pasos que conducen a su secreción por la glándula pineal. La actividad de las enzimas implicadas

en su síntesis presenta ritmos circadianos. En las células postganglionares simpáticas la actividad de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de NE, aumenta durante la noche (Craft et al., 1984). En los pinealocitos, al igual que la actividad de la NAT, la actividad de la triptófano hidroxilasa aumenta durante la noche (Shibuya et al., 1977) y los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos en las membranas presentan un ritmo circadiano de 24 horas, aumentando su número en las últimas fases de luz o en el periodo de oscuridad (Pangerl et al., 1990).

Por otro lado, la expresión de la NAT, que sigue un ritmo circadiano, parece ser controlada por factores de transcripción tanto estimuladores (CREB) como inhibidores (Fra-2 e ICER). En concreto, los factores inhibidores presentan a su vez ritmos circadianos semejantes a los de la melatonina, lo que permite postular que la caída en la síntesis de melatonina hacia el final del periodo de oscuridad se puede deber a estos factores represores, y representaría el mecanismo a través del cual se limitaría la producción nocturna de la melatonina (Stehle et al., 1993).

La regulación de la actividad de la NAT se puede llevar a cabo por medio de dos mecanismos, uno que actuaría a nivel de su transcripción, interpretado como un aumento de la cantidad de enzima, y un segundo, llevado a cabo por medio de modificaciones postraduccionales de activación e inactivación de la enzima. No podemos descartar la posibilidad de una degradación proteolítica de la enzima, lo que podría explicar el porqué de la dificultad que se encuentra para volver a estimular la actividad de la NAT después de haber sido bloqueada por exposición a la luz en periodos de oscuridad (Illnerova et al., 1979). Se podría añadir un tercer mecanismo que actuaría a nivel de la estabilidad del transcrito, que presenta una disminución dependiente del tiempo en su tamaño como resultado de una reducción en la longitud de la cola de adeninas (Roseboom et al., 1996). Esta disminución en la longitud de la cola de adeninas parece afectar a la estabilidad del transcrito y a la eficiencia de la transcripción.

La luz tiene un efecto muy marcado sobre la síntesis de melatonina. En mamíferos, la luz inhibe la actividad eléctrica de las neuronas postganglionares simpáticas, y por tanto la liberación de NE, y disminuye la actividad de la NAT (Reiter, 1985). Por la noche, por contra, se produce un incremento de la actividad de la NAT, de 10 a 100 veces mayor que durante el día, aumentando así la concentración de *N*-acetilserotonina y disminuyendo la concentración de serotonina. Como consecuencia la concentración de melatonina aumenta; la actividad de la HIOMT se ve levemente incrementada (Binkley, 1993). Por otro lado, las fluctuaciones diarias de la actividad de las enzimas de la glándula pineal disminuyen rápidamente en presencia de luz, desapareciendo en condiciones de

## ***Introducción***

---

iluminación continua; el cambio a la inversa de las condiciones de iluminación produce una inversión de dichas actividades y de la síntesis de melatonina.

Es importante destacar que la intensidad lumínica, la longitud de onda de la luz y la duración de la exposición son factores importantes para conseguir la inhibición de la síntesis de melatonina. La intensidad de luz necesaria para inhibir la liberación nocturna de melatonina varía según las especies. En humanos se necesitan 2500 luxes para inhibir totalmente la síntesis de melatonina, mientras que 100 luxes durante 60 minutos la reducen un 33% (Lewy et al., 1980; McIntyre et al., 1989).

## **2. Funciones biológicas de la melatonina**

### **2.1. La melatonina y la reproducción**

El papel de la melatonina como un transductor de la información fotoperiódica para la reproducción animal fue establecido hace mucho tiempo. En estudios experimentales, su eficacia para modificar las funciones reproductivas varía dependiendo de la especie, la edad de los animales en estudio, y del momento en el que se suministra la indolamina con relación al ciclo luz-oscuridad.

Se han realizado estudios en los cuales diferentes especies de animales se sometieron a cambios en el fotoperiodo, pinealectomía y/o suministro exógeno de melatonina, a diferentes tiempos en relación con el ritmo circadiano de su síntesis; los resultados han demostrado que la glándula pineal y la melatonina están involucradas en la transmisión del fotoperiodo al sistema reproductivo y que, en su ausencia, el aparato reproductivo es incapaz de responder a cambios en la duración del día.

Las modificaciones en la producción nocturna de melatonina son las señales mediante las cuales la melatonina influye en la reproducción de los animales. Entre las diferentes propiedades que definen la señal de la melatonina (fase, duración y amplitud), parece ser que es la modificación en la duración de la producción nocturna de melatonina, la que transmite la información acerca del fotoperiodo al sistema reproductor (Reiter, 1991b; Cagnacci y Volpe, 1996).

El mecanismo más aceptado como responsable de esta función de la melatonina como mediador de la fisiología reproductiva es su efecto sobre el eje hipotálamo-adenohipófisis-gonadal. La melatonina modifica la actividad y la frecuencia de disparo del mecanismo generador de impulsos eléctricos hipotalámico, el cual regula la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnHR). Una prolongada secreción nocturna de melatonina inhibe la secreción de GnHR en algunos roedores, y disminuye la respuesta de la glándula pituitaria a la estimulación por la GnHR en ratas recién nacidas. Además, la integridad del hipotálamo ventromedial es esencial para el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la secreción de gonadotropinas y se han localizado receptores para melatonina en la glándula pituitaria, concretamente en la pars tuberalis (PT) (Weeb y Puig-Domingo, 1995).

Que la melatonina ejerce una determinada influencia sobre la fisiología reproductiva en animales que muestran un ciclo reproductivo marcadamente estacional ha sido claramente establecido. En aquellos animales que se reproducen cuando los días son largos, como es el caso del hámster, una mayor duración en la secreción nocturna de melatonina induce la regresión gonadal (que ocurre en invierno), mientras que en aquéllos que se reproducen cuando los días son más cortos, como las ovejas, induce una estimulación del desarrollo gonadal (primavera-verano).

En el hámster (*Mesocricetus auratus*) los cambios en la longitud del fotoperiodo son especialmente importantes al controlar la actividad gonadal. Los órganos reproductores son muy sensibles a la iluminación ambiental y a la actividad de la glándula pineal. Un fotoperiodo corto o un caso extremo como la ceguera llevan a la atrofia de los órganos reproductores. En los machos se observa una pérdida completa de la actividad espermatogénica testicular y se reducen las gónadas en un 80%, así como los órganos reproductores secundarios. Esta atrofia se produce por una disminución en la secreción de LH y FSH por la hipófisis. En las hembras se observa una disminución en las concentraciones plasmáticas de GnRH y una pérdida de peso del útero, debida posiblemente a una disminución en la producción de estrógenos. La pinealectomía evita la regresión gonadal que se produce al mantener los animales en condiciones de fotoperiodo cortos (Reiter, 1991b).

Se puede establecer, por tanto, un claro efecto antigonadotrópico de la melatonina en el hámster. Durante los días cortos, se produce un aumento en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario al efecto de retroalimentación (*feedback*) negativa ejercido por las hormonas esteroideas. Los machos castrados muestran una mayor sensibilidad al *feedback* negativo producido por testosterona exógena en los días cortos que animales expuestos a días largos. Este incremento en la sensibilidad es bloqueado o reducido por la pinealectomía. Además, la administración de melatonina durante los días largos induce el mismo grado de regresión gonadal que se observa en animales expuestos a días cortos. Por tanto, durante los días cortos aumenta la actividad pineal, favoreciéndose el efecto negativo de las hormonas esteroideas que retraen las gónadas, mientras que en los días largos la actividad pineal decae y el efecto inhibitorio de las hormonas esteroideas desaparece, regenerándose las gónadas.

El hámster es un animal hibernante; conforme se acerca el fin del periodo de hibernación, se regeneran las gónadas. Esta restauración ocurre de manera espontánea, pues si bien los días se van acortando, la regeneración gonadal ocurre mientras aún están hibernando, es decir, en condiciones de total oscuridad. En animales que son mantenidos en un estado de ceguera durante unas 27 semanas, se observa también una regeneración espontánea de las gónadas. La regeneración espontánea parece

deberse a que el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal se vuelve refractario a la melatonina, lo cual hace que se regeneren las gónadas. La base celular de la regeneración espontánea se desconoce.

El primer indicio de que la glándula pineal pudiera estar relacionada con la reproducción en humanos surgió de los estudios de Heubner (1898), quien describió el caso de un niño de cuatro años que presentaba una pubertad precoz y un tumor que había destruido la glándula pineal. Tumores que destruyen la glándula pineal son asociados con una pubertad precoz, mientras que aquellos tumores hiperactivos, que secretan melatonina en exceso, producen un retraso en la aparición de la pubertad, aunque no se ha establecido una clara relación entre los niveles de melatonina y la aparición de la pubertad. Sin embargo, hoy en día se acepta que si la glándula pineal afecta de alguna manera al desarrollo de la pubertad en humanos es a través de cambios en los niveles de melatonina (Cavallo, 1993). La entrada en la pubertad está relacionada con la disminución en la secreción de melatonina que acontece con el crecimiento infantil.

Una vez alcanzada la madurez sexual, el ritmo de melatonina no parece variar. Existen sin embargo varias patologías que relacionan a la glándula pineal y la melatonina en la madurez. En mujeres con amenorreas, cuyos niveles de estrógenos son muy bajos, la concentración de melatonina suele estar elevada, estrógenos exógenos inhiben la secreción nocturna de melatonina en estas mujeres. Además, la supresión de la síntesis de estrógenos en mujeres sanas eleva los niveles de melatonina circulante. Estos datos sugieren la existencia de un control negativo de los estrógenos sobre la actividad de la glándula pineal. Por otra parte, hombres adultos con oligospermia o aspermia presentan niveles nocturnos elevados de melatonina; en mujeres adultas que presentan ciclos menstruales alterados o sin ovulación, los niveles de melatonina circulante están más elevados. En conjunto, estos datos sugieren que la elevación de los niveles de melatonina puede desencadenar anomalías reproductivas (Reiter, 1998).

Aunque la especie humana no se considera como reproductor estacional, existe un comportamiento estacional en cuanto a la concepción con respecto a las diferentes áreas geográficas. Además, es posible que la melatonina actúe sobre el eje reproductivo e intervenga de forma significativa en el ritmo estacional de la concepción. En la fase folicular del ciclo menstrual, la secreción de GnRH y el ritmo pulsátil de secreción de LH se incrementan por la noche. La administración de melatonina durante el día en esta fase del ciclo menstrual aumenta la amplitud de los pulsos de LH y su respuesta a la estimulación por GnRH. En base a esto, se ha sugerido que la secreción circadiana de la melatonina ayudaría a sincronizar la secreción de LH preovulatoria, que ocurre por la noche, con el periodo nocturno (Cagnacci y Volpe, 1996).

## **2.2 La melatonina como sincronizador de los ritmos circadianos. El sueño.**

La melatonina tiene una función sincronizadora de los diferentes ritmos circadianos que se generan en el organismo con los ciclos diarios de luz-oscuridad, adaptando el organismo a las modificaciones del medio ambiente (Reiter, 1981). Así, actúa como un cronobiótico, es decir, una sustancia capaz de reajustar los ritmos circadianos desincronizados o bien de prevenir que se den estos se desajusten por alteraciones medioambientales.

En vertebrados, mamíferos y no mamíferos, la melatonina está implicada en el control de los ritmos circadianos. Se ha demostrado que la melatonina es capaz de ajustar el ritmo de actividad locomotora en hámster y rata. Sin embargo, no se ha clarificado aún el mecanismo por el cual la melatonina lleva a cabo esta función cronobiótica (Steinlechner, 1996).

Los mecanismos por los cuales la melatonina lleva a cabo esta función cronobiótica no han sido completamente establecidos. Sin embargo, se sabe que es la interacción directa entre la glándula pineal, a través de la secreción de melatonina, y el SCN la que regula los ritmos circadianos. Estos ritmos están bajo el control de un reloj circadiano endógeno que se localiza en el SCN del hipotálamo, y que es ajustado a un periodo de 24 horas por factores medioambientales, de los que el ciclo de luz-oscuridad parece ser el más importante. Lesiones en este núcleo eliminan la ritmicidad circadiana de diferentes funciones fisiológicas como son la alimentación, ingestión de agua, los ciclos de vigilia sueño y los niveles plasmáticos de melatonina. El SCN, mediante la actividad circadiana de sus neuronas, con un pico de máximo descarga durante el día, controla la liberación circadiana de melatonina por la glándula pineal. A su vez el SCN expresa receptores para la melatonina, y ésta puede cambiar de fase el ritmo de actividad del SCN, pudiendo así regular los ritmos circadianos (Steinlechner, 1996).

Los estudios sobre las funciones cronobióticas de la melatonina se han centrado principalmente en las alteraciones en el ritmo circadiano de los ciclos vigilia-sueño. El efecto cronobiótico de la melatonina solo se observa cuando es suministrada siguiendo un protocolo determinado. La melatonina puede avanzar o retrasar la fase de sueño dependiendo del momento en que sea suministrada. En humanos, su administración en las primeras horas de la mañana produce un retraso de fase, mientras que a últimas horas del día produce un adelanto de fase (Sack et al., 1998).

La melatonina ha resultado ser eficiente en el tratamiento de diferentes alteraciones del sueño en humanos como son: 1) adelanto o retraso de la fase de sueño; 2) insomnio en ciegos con ciclos de

vigilia-sueño iguales o superiores a 24 horas pero que no se ajustan al ciclo luz-oscuridad; 3) *jet-lag*, desajustes entre el ritmo interno y el tiempo real externo como consecuencia de vuelos transoceánicos; 4) alteraciones como consecuencia del cambio en la pauta vigilia-sueño en trabajadores con turno de noche (Sack et al., 1998).

Aparte del efecto de la melatonina sobre la sincronización de los ritmos circadianos, se han descrito otros efectos de la hormona sobre el sistema nervioso central. En vertebrados, tanto reptiles como mamíferos, la administración de melatonina inhibe la actividad motora y aplaca los comportamientos agresivos. En humanos, la melatonina tiene un efecto inductor del sueño que se acompaña de sedación, y disminuye la capacidad de atención y de manipular objetos.

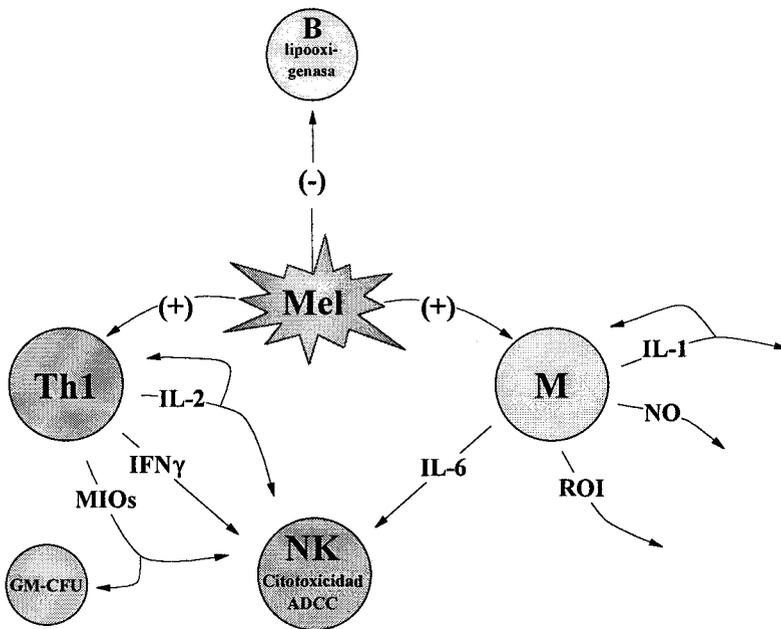
La ingestión de melatonina afecta tanto a la aparición del sueño, tiempo requerido para quedarse dormido, como a la calidad y duración del mismo, y tiene un efecto hipnótico. Los primeros estudios que mostraron el efecto de la melatonina sobre el sueño en humanos se llevaron a cabo con concentraciones farmacológicas (1 mg-1,2 g). Recientemente se ha visto que la administración de concentraciones bajas de melatonina (0,1-0,3 mg), que permiten que la concentración sérica de la hormona se aproxime los niveles de melatonina en adultos (50-120 pg/ml), facilita la inducción del sueño en individuos sanos. La respuesta ocurre en menos de una hora tras la administración de la hormona, independientemente del momento en que se suministre, lo que parece excluir la posibilidad de que el efecto sea debido a un cambio de fase en la aparición del sueño (Dollins et al., 1994). La melatonina mejora además las condiciones del sueño en pacientes con insomnio que presentan déficit en sus niveles de melatonina, generalmente ancianos, así como en pacientes con Alzheimer (Haimov et al., 1995).

Los mecanismos que median la inducción del sueño y el efecto hipnótico de la melatonina no están claros, pero parecen estar relacionados con los efectos hipotérmicos de la misma (Cagnacci et al., 1992).

## 2.3. Melatonina y sistema inmune

### 2.3.1. La melatonina como moduladora de la respuesta inmune

En los últimos años se ha puesto de manifiesto, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro*, la función inmunomoduladora de la melatonina. Los mecanismos por los que la melatonina actúa sobre el sistema inmune abarca interacciones directas e indirectas con células inmunocompetentes. Por otra parte, el sistema inmune puede, a través de la síntesis y secreción de determinados factores solubles, afectar a la función de la glándula pineal. Esta interacción mutua sugiere la existencia de una regulación recíproca entre la glándula pineal, un órgano neuroendocrino, y el sistema inmune. En la figura 10 se representa un esquema de las principales funciones de la melatonina sobre células del sistema inmune en mamíferos.



**Figura 10. Modulación del sistema inmune por la melatonina en mamíferos.** Se representa un esquema hipotético de los principales efectos de la melatonina sobre diferentes células inmunes. Basado en García-Mauriño y cols (1997), con algunas modificaciones.

La primera evidencia de la existencia de una relación funcional entre la glándula pineal y el sistema inmune fue la observación de que la administración de extractos pineales llevaba a un incremento en el peso del timo, presentando una hiperplasia celular en las zonas medular y cortical de la glándula (Milcu y Pitis, 1943). Más tarde se observó, en ratas recién nacidas pinealectomizadas, una desorganización estructural del timo (Devecerski, 1963) y un deterioro de la respuesta inmune, puesto de manifiesto por la disminución de la producción de anticuerpos (Csaba et al., 1966).

El primer resultado en firme que demostraba un claro efecto de la melatonina sobre la función del sistema inmune fue proporcionado por Maestroni y Pierpaoli, quienes realizaron una pinealectomía funcional al mantener ratones durante varias generaciones bajo una iluminación constante, suprimiendo así la producción de melatonina, y observaron cómo en la tercera y cuarta generación los ratones crecían con dificultad y presentaban una disminución en la producción de anticuerpos en respuesta a antígenos T-dependientes, así como una atrofia de los tejidos linfoides de bazo y timo (Maestroni y Pierpaoli, 1981).

De igual forma, la inhibición farmacológica de la función pineal por la inyección por la tarde del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propanolol, que disminuye el pico nocturno de síntesis de melatonina, o la inyección diaria de p-clorofenilalanina, un inhibidor de la síntesis de serotonina, disminuyó igualmente la producción de anticuerpos en la respuesta primaria a la exposición con eritrocitos de carnero, usados como antígeno timo-dependiente, y medida como el número de células formadoras de placa hemolíticas (PFC).

La prueba definitiva que corroboraba la existencia de una interacción entre la glándula pineal y el sistema inmune se obtuvo cuando la función inmune, disminuida por el propanolol o la p-clorofenilalanina, fue restablecida por la administración a última hora del día de melatonina (Maestroni et al., 1986). En los animales control se observó también un efecto inmunoestimulador de la melatonina, suministrada a últimas horas de la tarde, al aumentar la producción de anticuerpos en la respuesta inmune primaria y secundaria a la exposición a eritrocitos de carnero, no observándose ningún efecto en animales no inmunizados. Este efecto fue dependiente de la dosis a concentraciones fisiológicas de  $10^{-10}$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso (Maestroni et al., 1987).

Son múltiples los trabajos en los que se demuestra la relación entre la melatonina y el sistema inmune. En ratones, la melatonina contrarresta el efecto inmunosupresor de corticosteroides y condiciones de estrés agudo sobre el timo, y previene la parálisis y muerte de ratones infectados con agentes víricos (Maestroni et al., 1988, 1989; Ben-Nathan et al., 1995). Maestroni y cols demostraron

el efecto protector de la melatonina sobre la apoptosis en células hematopoyéticas de médula osea inducida *in vivo* o *in vitro* por drogas quimioterapéuticas. Este efecto protector viene determinado por el aumento de la producción de factores estimuladores de la formación de colonias de macrófagos y granulocitos (Maestroni, 1995). También se ha observado que la melatonina protege *in vivo* e *in vitro* contra la apoptosis en timocitos de rata (Sainz et al, 1995).

Otros autores han corroborado el efecto inmunoestimulador de la melatonina. En 1989, del Gobbo y cols demostraron que la pinealectomía en ratones reducía significativamente la producción de IL-2 y la actividad asociada de las células T citotóxicas o *natural killer* (NK), mientras que el tratamiento con concentraciones farmacológicas de melatonina revertía ambos efectos (Del Gobbo et al., 1989). Giordano y Palermo demostraron cómo la inyección de melatonina en ratones aumentaba la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de los esplenocitos, posiblemente aumentando la producción de IL-6 e interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (Giordano y Palermo, 1991). Posteriormente se demostró que la melatonina inducía un incremento en la producción de IFN $\gamma$  en esplenocitos de ratón (Colombo et al., 1992). Por otra parte, se ha demostrado que la melatonina inhibe la producción de IFN $\gamma$  y la proliferación de linfocitos estimulada por fitohemaglutinina en linfocitos humanos (Finocchiaro et al., 1988).

En ratones viejos o inmunodeprimidos, la administración de melatonina potenció la respuesta inmune humoral a través de estimulación de la actividad de las células T colaboradoras (Th) y el aumento de la producción de IL-2, estimuló la respuesta a mitógenos de linfocitos T y B (Caroleo et al., 1992) y aumentó la presentación de antígenos por los macrófagos a los linfocitos T en bazo, al incrementar las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y la producción de IL-1 y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Pioli et al., 1993).

En humanos también se ha observado un efecto estimulador de la melatonina sobre la respuesta inmune. La melatonina estimula la secreción de IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$  (Barjavel et al., 1998), así como la síntesis de ARNm de IL-1 y la actividad citotóxica (Morrey et al., 1994), al aumentar la producción de óxido nítrico y compuestos derivados del oxígeno en monocitos. Los linfocitos Th1 son activados por la melatonina incrementando la producción de IL-2 y IFN $\gamma$ , la producción de IL-6 se ve también estimulada en células mononucleares de sangre periférica, posiblemente por la activación de monocitos más que de linfocitos Th2 (García-Mauriño et al., 1997). En linfocitos B humanos la melatonina inhibe la expresión del ARNm del gen 5-lipooxigenasa, enzima implicada en la formación de leucotrienos (compuestos relacionados con mecanismos inmunes inflamatorios), mediante su unión

a receptores nucleares, lo que hace suponer que la melatonina ejerce una función moduladora de los procesos inflamatorios e inmunes (Steinhilber et al., 1995).

La melatonina puede también proteger a las células inmunes contra el estrés adrenérgico. El tratamiento continuo con adrenalina o noradrenalina de ratas *in vivo* tiene un efecto supresor, a través de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, sobre la respuesta mitogénica de linfocitos de sangre periférica. Este efecto sólo se observó con el tratamiento conjunto con agentes  $\beta$ -bloqueantes como el propanolol (Felsner et al., 1995). Tanto la pinealectomización funcional, por exposición constante a la luz durante 24 horas, como el  $\beta$ -bloqueo aumentaron el efecto inmunosupresor de la noradrenalina, mientras que el tratamiento con melatonina o la exposición a un ciclo normal de luz-oscuridad lo contrarrestaba. En función de estos datos se ha propuesto que la melatonina endógena protege de la inmunosupresión causada por el estrés adrenérgico, y que el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos aumenta el efecto supresor adrenérgico a través de la inhibición de la liberación de melatonina (Liebman et al., 1996)

Por último, la melatonina reduce el crecimiento de tumores potenciando la actividad de la IL-2 en la respuesta antitumoral en humanos, así la administración conjunta de melatonina e IL-2 durante la inmunoterapia del cáncer mejora los resultados del tratamiento permitiendo además una disminución en la cantidad de IL-2 administrada y los efectos secundarios (Conti y Maestroni, 1995). También se ha demostrado que el tratamiento durante 30 días con melatonina en pacientes con cáncer incrementa los niveles séricos de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-2,  $\text{IFN}\gamma$  comparado con los niveles anteriores al tratamiento (Neri et al., 1995).

Por otra parte, también se ha descrito el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la función inmune. En humanos, la actividad de linfocitos T citotóxicos, la síntesis de  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  por linfocitos, y la proliferación de linfocitos T y líneas celulares de linfoblastos fueron inhibidos por la melatonina en estudios realizados *in vitro* (Lewinski et al., 1989; Persengiev y Kyurkchiev, 1993; Di Stefano y Paulesu, 1994).

### **2.3.2. Melatonina y Opioides**

Los péptidos opioides han sido propuestos como mediadores en el mecanismo de acción de la melatonina sobre el sistema inmune.

Inicialmente la mayoría de los datos que relacionaban a la melatonina con el sistema inmune procedían de estudios *in vivo*, y no eran confirmados por estudios *in vitro*. Esto, unido al hecho de que los experimentos de unión a células inmunocompetentes por radiloligandos de la melatonina tampoco demostraban la presencia de sitios de unión, hizo pensar a Maestroni y cols que el efecto de la melatonina debía estar mediado por algún o algunos factores no identificados.

Se habían publicado una serie de trabajos que sugerían una relación entre la glándula pineal y el sistema de opioides endógenos (Lakin et al., 1981; Lissoni et al., 1986). Maestroni y cols confirmaron dicha relación al demostrar que los efectos inmunológicos de la melatonina (estimulación de la producción de anticuerpos en la respuesta primaria y el efecto anti estrés sobre la respuesta inmune de ratones inmunizados) eran contrarrestados por el antagonista opioide naloxona (Maestroni et al., 1987, 1988) y observaron que otros péptidos opioides ( $\beta$ -endorfina y dinorfina 1-13) reproducían el efecto inmunoestimulador y anti estrés de la melatonina, al menos en parte (Maestroni y Conti, 1989).

Por otra parte, los efectos inmunológicos de la melatonina y los péptidos opioides sólo eran observados cuando eran inyectados a últimas horas de la tarde, lo que confería a sus funciones inmunológicas un carácter circadiano. Sin embargo, a diferencia de la melatonina, la  $\beta$ -endorfina y la dinorfina 1-13 eran efectivos para contrarrestar los efectos del estrés en animales no inmunizados. Por otra parte, se sabía que las células inmunocompetentes activadas, murinas y humanas, presentan receptores opioides y son capaces de producirlos. Maestroni y cols plantearon entonces la hipótesis de que la melatonina podría actuar estimulando la liberación de opioides por células inmunocompetentes previamente activadas.

Para comprobar dicha hipótesis, incubaron esplenocitos de ratón activados con concentraciones de melatonina en el rango de nM; tras la incubación tomaron el sobrenadante y comprobaron cómo éste era capaz de restablecer el peso del timo en ratones inmunodeprimidos que no habían sido inmunizados. A su vez, en ratones inmunizados con eritrocitos de cordero, el sobrenadante actuaba como un factor inmunoestimulador y anti estrés con relación a la celularidad del timo y la producción de anticuerpos. Este efecto no se observó con el sobrenadante de linfocitos no activados. De nuevo, este efecto ejercido por el sobrenadante fue sensible a la incubación con naloxona. Además, el sobrenadante desplazó unión específica de [ $^3$ H]naloxona en membranas de cerebro de ratón (Maestroni y Conti, 1990).

La depleción selectiva de las diferentes subpoblaciones de células T de esplenocitos activados mediante anticuerpos monoclonales demostró que las células estimuladas por la melatonina para producir los supuestos agonistas opioides eran células T CD4<sup>+</sup> (Th1) (Maestroni y Conti, 1990). Finalmente, la unión específica de los factores liberados por las células Th tras ser estimuladas por la melatonina a receptores opioides del timo, y la supresión del efecto recuperador del timo (peso, celularidad y producción de anticuerpos) ante el estrés inducido por corticosteroides al ser incubados con anticuerpos anti $\beta$ -endorfina y anti-metaencefalina, demostró el carácter opioide de estos factores (Maestroni y Conti, 1991).

Estos resultados obtenidos por Maestroni y cols en ratones y otros similares en humanos, menos consistentes éstos, demostraron que concentraciones fisiológicas de melatonina estimulaban la liberación de péptidos opioides endógenos, demoninados MIO (opioides inmunes inducidos por melatonina), por células Th activadas.

### **2.3.3. Melatonina y citocinas**

La melatonina puede llevar a cabo esta función inmunológica a través de la inducción de la síntesis y liberación de diversas citocinas por determinadas células inmunes.

Los primeros datos que demostraban que la melatonina podía estimular la liberación de citocinas por las células inmunes surgieron de los estudios de Del Gobbo y cols. Estos autores comprobaron que la pinealectomía reducía la producción de IL-2, linfocina liberada por las células Th1 que activa a las células NK y la consiguiente actividad de las mismas en ratones. El tratamiento con melatonina revertía los efectos de la pinealectomía (Del Gobbo et al., 1989).

La demostración de la acción estimuladora de la melatonina sobre la ADCC en ratones y el hecho de que ésta no fuera inhibida por la naltroxona sugirieron que este efecto podía estar mediado por la producción de determinadas citocinas (Giordano y Palermo, 1991). El ADCC es un proceso lítico en el que la célula es recubierta por anticuerpos específicos, cuya fracción constante (Fc) es reconocida por receptores específicos de leucocitos, entre ellos las células NK, activando su capacidad citolítica y destruyendo a la célula. Este proceso lítico es estimulado por diversas citocinas como IL-2, IFN $\gamma$  e IL-6.

Se ha demostrado que la melatonina es capaz de estimular la producción de citocinas. Así, en ratones inmunodeprimidos o ratones viejos la melatonina estimula la producción de IL-2, IL-1, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en esplenocitos (Caroleo et al., 1992, 1994; Pioli et al., 1993).

En monocitos humanos la melatonina es capaz de inducir la producción de IL-1, así como la producción de los intermediarios reactivos del metabolismo de oxígeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y óxido nítrico. Además, la melatonina es capaz de sensibilizar a los monocitos para una posterior estimulación con LPS (Morrey et al., 1994).

Recientemente García-Mauriño y cols han demostrado que concentraciones fisiológicas de melatonina estimulan en humanos la producción de IL-2 e IFN $\gamma$  en células Th1, así como la producción de IL-6 por monocitos. Este efecto estimulador de la melatonina sólo se observa cuando las células no han sido activadas, cuando han sido levemente activadas con PHA o por incubación con células previamente por irradiadas. Por otra parte, estos autores no observaron estimulación de la producción de IL-4 por melatonina, lo que sugiere que las células Th2 no son activadas por la melatonina (García-Mauriño et al., 1997).

La acción de la melatonina sobre la producción de IL-4 ha sido también estudiada. En un primer estudio, Maestroni y cols vieron cómo en la médula ósea de ratón la melatonina “rescataba” células hematopoyéticas, en concreto las denominadas unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (GM-CFU), de la apoptosis inducida por drogas quimioterapéuticas al estimular la producción del factor estimulador de la formación de colonias de granulocito-macrófago, posiblemente a través de células T. A continuación estudiaron si este efecto era mediado por las células T a través de la producción de IL-4; para ello, añadieron anticuerpos monoclonales anti IL-4 y observaron cómo quedaban inhibidos los efectos de la melatonina. Comprobaron a su vez cómo la melatonina estimula a las células Th2 para producir IL-4, la cual induce a las células estromales adherentes de la médula ósea a producir GM-CSF (Maestroni et al., 1994a,b).

A partir de los resultados de los experimentos anteriores, Maestroni y cols propusieron que la melatonina actuaba estimulando la producción de IL-4 por las células Th2 en la médula ósea. Si embargo, en estudios posteriores no pudieron encontrar una relación directa entre la melatonina y la producción de IL-4. Además, encontraron que la naltroxona, al igual que el anticuerpo anti-IL4, inhibía parcialmente el efecto de la melatonina. Descubrieron entonces la presencia de dos proteínas liberadas por las células Th al ser estimuladas por la melatonina, las cuales eran reconocidas tanto por el anticuerpo monoclonal anti-IL4 como por un anticuerpo monoclonal dirigido contra una secuencia

común de péptidos opioides. Establecieron así cómo la melatonina actuaba sobre células Th para producir la liberación de péptidos opioides semejantes a IL-4 y dinorfina (Maestroni et al., 1996).

La acción directa de la melatonina sobre el sistema inmune se ve fuertemente apoyada por la presencia de receptores de melatonina en los tejidos linfoides y en células inmunes. La confirmación de la existencia de dichos receptores viene dada por la presencia de sitios de unión específicos para el radioligando [<sup>125</sup>I]melatonina en homogenados de órganos linfoides primarios y secundarios de diversas especies de aves y mamíferos (Tabla I).

**Tabla I. Características de los receptores de melatonina en células linfoides.** Valores tomados de Poon y cols, 1994; Maestroni y cols, 1994a; Morrey y cols, 1994; Calvo y cols, 1995; González-Haba y cols, 1995; Raffi-El Idrissi y cols, 1995.

		Número	K <sub>d</sub> (nM)
Mamíferos	Linfocitos humanos	2	1.01/208
	Granulocitos humanos	1	2100
	Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	1	0.27
	Monocitos humanos	1	0.270
	Linfocitos Th <sub>2</sub>	1	0.346
	Timo de rata	2	0.47/1226
	Bazo de rata	1	0.34
	Bazo de cerdo	1	0.049
Aves	Bazo de pato	1	0.073
	Timo de pato	1	0.040
	Bazo de pollo	1	0.041
	Bolsa de Fabricio pollo	1	0.043
	Bolsa de Fabricio de paloma	1	0.073
	Bolsa de Fabricio de codorniz	1	0.035

K<sub>d</sub>, constante de disociación

En mamíferos se han descrito sitios de unión específicos para melatonina en linfocitos de sangre periférica, neutrófilos, células T CD4<sup>+</sup> y monocitos humanos, timo y bazo de rata, linfocitos Th2 de médula ósea de ratón, bazo de hámster y bazo de cerdo de Guinea (Calvo et al., 1995; Maestroni, 1995; González-Haba et al., 1995; Barjavel et al., 1998). Por otra parte, en aves se han identificado sitios de unión en timo y bolsa de Fabricio de pato, pollo, codorniz y paloma, así como en bazo de pato, pollo, paloma (Poon et al., 1994).

### **2.3.4. Acciones indirectas de la melatonina**

A los efectos directos de la melatonina sobre la función inmune hay que añadir la posible existencia de mecanismos indirectos mediante la modulación de la síntesis, liberación y acciones de otras hormonas, por los cuales la melatonina podría modular la función inmune. En este sentido, se ha propuesto que la melatonina podría interactuar con los ejes hipotálamo-hipófisis-gonadal e hipotálamo-hipofisario-adrenal para llevar a cabo su función moduladora del sistema inmune.

Los días cortos y el tratamiento con melatonina inducen la regresión de las gónadas en muchas especies. La regresión gonadal en machos coincide con una disminución de la concentración de testosterona circulante, que generalmente suprime la función inmune. El tratamiento con testosterona de ratones o ratas, castrados o intactos, suprime la inmunidad humoral y celular (Schuur y Veheul, 1990). Por otra parte, se ha descrito la existencia de receptores de andrógenos en timo, pero no se han encontrado en linfocitos circulantes (Mc Cruden y Stimson, 1991). Teniendo en cuenta que los niveles de andrógenos disminuye en los días con periodos de luz cortos, se ha sugerido que la melatonina podría modular la acción inmunosupresora de los andrógenos sobre el sistema inmune (Nelson et al., 1995). Esta hipótesis se ve apoyada por la existencia de sitios de unión para melatonina en los tejidos gonadales (Cohen et al., 1978).

La lesión del área hipotalámica anterior causa la involución del timo y una disminución del número de linfocitos circulantes; este efecto fue revertido por el tratamiento con la hormona liberadora de tirotrinas (TRH) o con melatonina. Por otra parte, la melatonina estimula la liberación de TRH. Esto ha permitido sugerir que la melatonina podría ejercer su acción inmunomoduladora a través de la regulación de la síntesis y/o secreción de la hormona liberadora de tirotrinas (Pierpaoli y Yi, 1990; Lesnikov et al., 1992).

El tratamiento de ratas con melatonina disminuyó la liberación basal de prolactina (PRL) y, sin embargo, potenció el incremento de PRL inducido por condiciones de estrés. En función de estos datos se ha sugerido que la acción anti estrés que la melatonina ejerce sobre el sistema inmune podría estar mediada por la PRL (Skwarło-Soñta, 1996). Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la PRL antagoniza la inmunosupresión causada por los glucocorticoides y su liberación es inducida por el estrés (Bernton et al., 1992), y porque la PRL es un reconocido modulador de la función inmune. Así por ejemplo, la eliminación de la hipófisis en ratas lleva a un estado de supresión de la función inmune humoral y dependiente de células, que se recupera por la administración de PRL; además, se han encontrado receptores para la PRL en membranas de células linfoides (Reber, 1993), aunque también se ha publicado que la melatonina aumenta los niveles plasmáticos de PRL (Lu y Meites, 1973).

La melatonina y los esteroides adrenales pueden interactuar para modular las funciones inmunes. La melatonina antagoniza el efecto inmunosupresor de los corticosteroides (Maestroni et al., 1986). Además, los receptores de hormonas corticoideas en el timo de rata son regulados por la melatonina, y esta regulación depende de la concentración de glucocorticoides circulantes. Basándose en estos datos, se ha sugerido que la modulación del sistema inmune por la melatonina, a nivel del timo, podría llevarse a cabo mediante la regulación de los receptores de corticosteroides y se vería influida por las concentraciones de glucocorticoides circulantes (Persengiev et al., 1991a, b).

### **2.3.5. Efectos del sistema inmune sobre la glándula pineal**

Aparte de la ya establecida función moduladora de la melatonina sobre el sistema inmune, son varios los estudios que muestran cómo productos inmunes afectan a su vez a la función pineal, poniendo de manifiesto la posible existencia de una regulación recíproca entre la glándula pineal y el sistema inmune.

En cultivos de glándulas pineales de ratas estimuladas con isoproterenol, un agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos que activa a la NAT, el IFN $\gamma$ , por un lado estimula la producción de melatonina, mientras que por otro inhibe la actividad de la NAT (Withyachumnarnkul et al., 1990a, b). Este efecto estimulador de la producción de melatonina podría ocurrir por una vía independiente de la estimulación de la NAT que consistiría en la inhibición por IFN $\gamma$  de la degradación de la 5-hidroxitriptamina (5-HT), lo que incrementaría la disponibilidad del precursor de la síntesis de

melatonina, que sería dirigido hacia la síntesis de ésta aumentando así su producción (Withyachumnarnkul et al., 1991).

El efecto inhibitorio del IFN $\gamma$  sobre la actividad de la NAT parece deberse a que el aumento de la 5-HT causado por el IFN $\gamma$  hace que ésta difunda al exterior y se una a sus receptores en la membrana del pinealocito, lo que inhibe la actividad de la NAT. Este efecto requiere que los terminales simpáticos de la glándula pineal estén íntegros, lo que sugiere que el aumento y difusión de la 5-HT podría tener lugar también en los terminales simpáticos (Withyachumnarnkul et al., 1991).

La transmisión de información entre el sistema inmune y los pinealocitos puede ocurrir también por una interacción a través de receptores específicos en los pinealocitos. La liberación de melatonina es inhibida de una forma dependiente de la dosis por la administración a ratas de IL-1 $\beta$  recombinante humana, efecto que se inhibe por la administración de anticuerpos anti receptores de IL-1 humanos (Mucha et al., 1994). Por otra parte, el tratamiento con IL-2 elimina el pico nocturno de liberación de melatonina en humanos (Lissoni et al., 1990).

Se ha demostrado también un efecto estimulador de la producción y liberación de melatonina por la administración a ratas del factor estimulador de la formación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y del factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos (G-CSF). Además, el efecto estimulador de ambos factores en cultivos de glándulas pineales fue dependiente de la dosis (Zylinska et al., 1995).

Por otra parte, la existencia de una relación recíproca entre la melatonina y el sistema inmune se ve apoyada en el hecho de que las células inmunes pueden sintetizar y liberar melatonina. Se ha demostrado que los linfocitos y macrófagos de sangre periférica humana tienen la capacidad de sintetizar melatonina y como la incubación de pinealocitos con IFN $\gamma$  aumenta la captación de triptófano por las células, así como la síntesis de serotonina y melatonina (Finocchiaro et al., 1988).

### **2.3.6. Sistema inmune y fotoperiodo**

Los animales usan el fotoperiodo como fuente de información para realizar adaptaciones estacionales específicas, como la reproducción, con el fin de mantener un balance de energía positivo que les permita sobrevivir, en las mejores condiciones posibles, a las fluctuaciones medioambientales de temperatura, disponibilidad de alimentos, etc.

Entre las funciones fisiológicas que requieren de ese balance positivo y que contribuyen a la supervivencia del animal se encuentra la resistencia inmunológica. La cadena de eventos celulares que se dan durante la fase aguda de la respuesta inmune, la inflamación y la elevación de temperatura requieren energía. Un déficit energético general puede incrementar el riesgo de infección y muerte, por no poder el organismo suministrar la energía requerida por el sistema inmune.

Muchas de las condiciones medioambientales conocidas como estrés pueden afectar al sistema inmune. El estrés por falta de alimentos puede provocar la secreción de glucocorticoesteroides, que disminuyen la respuesta inmune. Algunas de estas condiciones acontecen mediante ciclos estacionales, lo que lleva a una fluctuación estacional de la función inmune (Lochmiller et al., 1994).

La influencia de ciclos estacionales en el desarrollo, regresión y regeneración de los órganos linfáticos ha sido descrita en varias especies de mamíferos. En ratones, ratas y ardillas se ha descrito que el número total de leucocitos circulantes, así como la masa celular de timo e hígado, se encuentran más elevados durante el otoño y el invierno comparado con los animales estudiados en primavera y verano (Nelson et al., 1995).

Hay evidencias que sugieren que los animales podrían utilizar el fotoperiodo para combatir la disminución de la función inmune provocada por el estrés estacional (Nelson et al., 1995). Así, por ejemplo, ratones sometidos a bajas temperaturas presentan elevadas concentraciones de corticoesteroides, una pérdida de peso del bazo y una disminución de inmunoglobulinas G, independientemente del periodo de luz al que sean sometidos. Sin embargo esta inmunosupresión es mayor en aquellos sometidos a periodos de luz más largos, lo que apoya el concepto de que el sistema inmune es estimulado en los días cortos para contrarrestar la supresión del sistema inmune causada por el estrés invernal (Demas y Nelson, 1996).

La glándula pineal es uno de los posibles candidatos que podrían regular el ritmo diario y estacional de la función del sistema inmune. La glándula pineal transforma la información fotoperiódica en la señal endógena que es la melatonina, cuyo patrón de secreción circadiana dependiente de la luz que ha sido descrito en la mayoría de las especies. Lo que permite a los animales interpretar los diferentes momentos del año y anticiparse así a los previsibles cambios ambientales estacionales (Reiter, 1991a).

La melatonina parece estar implicada también en la regulación de la actividad circadiana y estacional del sistema inmune. En este sentido, se ha demostrado que la melatonina aumenta la

citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en verano, pero no en invierno. Este efecto parece debido a diferencias en la sensibilidad de los animales a la melatonina a lo largo del año, ya que es necesario administrar dosis de melatonina mayores en invierno que en verano para inducir el aumento de la actividad ADCC (Giordano et al., 1993).

Se ha observado además, que la liberación rítmica de melatonina es la que determina el proceso de proliferación circadiano de las células hematopoyéticas progenitoras de granulocitos y macrófagos (Kuci et al., 1987), y que la actividad circadiana observada en células NK desaparece cuando los animales son pinealectomizados (McNulty et al., 1990).

### **2.4. La melatonina y el cáncer**

Son numerosos los trabajos que muestran la función anticancerígena de la glándula pineal y la melatonina. Los estudios con animales demostraron que la administración de melatonina inhibía el crecimiento de tumores, espontáneos, transplantados o inducidos por agentes cancerígenos en ratones, ratas y hámsteres. La pinealectomía aumento el desarrollo de los tumores, y la administración posterior de melatonina previno este desarrollo. Estos efectos de la melatonina se observaron con concentraciones farmacológicas más que fisiológicas.

Los estudios *in vitro* demostraron que tanto concentraciones farmacológica como fisiológicas de melatonina mostraban un efecto antiproliferativo sobre el crecimiento de células cancerígenas. Sin embargo, los efectos oncostáticos de la melatonina *in vivo* dependen de la relación entre el momento en que se administra y el ritmo circadiano de su síntesis, pudiendo ser oncostático, oncogénico o no tener efecto alguno. Además, la melatonina puede tanto inhibir como estimular la acción de diferentes hormonas endógenas que promueven la formación de tumores, como factores de crecimiento e interleucinas (Blask, 1993).

El efecto antiproliferativo de la melatonina ha sido demostrado en una gran variedad de cultivos celulares neoplásicos, entre los que se incluyen el efecto sobre el cáncer de mama, melanomas, carcinomas ováricos, cáncer de vejiga y neuroblastomas (Blask, 1993).

La mayoría de los experimentos antiproliferativos se desarrollaron en cultivos de células cancerígenas de mama humanas MCF-7 que responden a los efectos mitogénicos de los estrógenos. En estas células la susceptibilidad al efecto inhibitorio de la melatonina presentan determinadas

propiedades: 1) es más efectivo a concentraciones fisiológicas (1 nM y 10 pM) de melatonina que farmacológicas o subfisiológicas. (Hill y Blask, 1988); 2) se da preferentemente en células con una rápida tasa de proliferación (Cos y Sánchez-Barceló, 1995); 3) depende de la expresión de receptores para estrógenos, células sin dichos receptores no son inhibidas (Molis et al., 1994); 4) depende de la presencia de hormonas y factores de crecimiento en el medio de cultivo (Cos y Blask, 1994).

Son varios los mecanismos de acción, directos e indirectos, que parecen estar involucrados en la función oncostática de la melatonina. Sin embargo la relación entre estos mecanismos y el efecto antiproliferativo no está bien establecida.

Entre los mecanismos directos que median en la acción antiproliferativa de la melatonina se encuentran: 1) la modulación de la expresión de receptores de estrógenos, concentraciones fisiológicas suprimen la transcripción disminuyendo la síntesis de ARNm de ER, siendo el efecto independiente de la síntesis de proteínas (Molis et al., 1994); 2) su acción sobre el ciclo celular, concentraciones fisiológicas producen un retraso en la transición G<sub>1</sub>-S, efecto mediado en parte por estrógenos (Cos et al., 1991); 3) la interferencia en la acción de factores de crecimiento, la melatonina bloquea la liberación y/o la acción de factores de crecimiento inducidos por estradiol y estimula la liberación de factores de crecimientos inhibitorios autocrinos o paracrinos (Cos y Blask, 1994); 4) la interacción con calmodulina, concentraciones fisiológicas incrementan el tamaño de los microtúbulos, al bloquear la formación del complejo calmodulina-tubulina en células cancerígenas (Benítez-King y Anton-Tay, 1993), lo que podría provocar la muerte de la célula cancerígena; 5) el favorecer la comunicación intracelular entre células normales y cancerígenas, concentraciones fisiológicas incrementan las uniones gap (Ubeda et al., 1995) lo que permitiría el paso de moléculas inhibitorias del crecimiento de unas células a otras..

Los mecanismos indirectos hacen relación al efecto antioxidante de la melatonina y a su efecto inmunomodulador. La melatonina parece interactuar con el metabolismo de glutatión a la hora de llevar a cabo la inhibición de la proliferación celular. La inhibición de la síntesis de glutatión bloquea el efecto oncostático de la melatonina, el cual es revertido por la adición de glutatión. En células cancerígenas que normalmente no responden a la melatonina, como aquellas que no presentan ER, si se aumenta la concentración intracelular de glutatión pueden responder a la indolamina. Esto sugiere que aparte de actuar inhibiendo la expresión de ER la melatonina inhibiría la proliferación celular por otros mecanismos independientes de receptores de estrógenos (Blask et al., 1997).

El efecto oncostático a través de la función inmunomoduladora de la melatonina se basa en su capacidad para estimular la respuesta inmune celular y humoral. Células inmunocompetentes pueden sintetizar melatonina y presentan receptores para la melatonina. Células tumorcidas son activadas por la melatonina aumentando la respuesta humoral primaria y aumentando la producción de determinadas citocinas, lo que contribuiría a su acción anticancerígena (Conti y Maestroni., 1995).

Parece ser que tanto los niveles de melatonina como el ritmo circadiano de melatonina se ven afectados en pacientes con cáncer, aunque los resultados no son muy concluyentes. Los niveles de melatonina medida durante la mañana en pacientes con cáncer de mama, con o sin metástasis, son mayores que en individuos normales. Cuando los pacientes son divididos en dos grupos, con o sin metástasis, los niveles de melatonina son dos o tres veces más altos en los que presentan metástasis (Esposti et al., 1988). Por otra parte, el pico nocturno de melatonina en estos pacientes disminuye (Tamarkin et al., 1982; Bartsch et al., 1991).

Los ensayos clínicos con pacientes con cáncer parecen indicar que la melatonina disminuye la progresión de la enfermedad y mejora la calidad de vida de muchos de ellos (Lissoni et al., 1992). Diversos estudios han demostrado que la melatonina mejora la eficacia y disminuye la toxicidad de los tratamientos de quimioterapia e inmunoterapia (Lissoni et al., 1994, 1995), lo que acompañado con los “no”, hasta ahora, demostrados efectos dañinos de la melatonina, hacen que la administración de melatonina esté siendo considerada como un posible tratamiento en combinación con la quimioterapia y la inmunoterapia.

Podemos decir por tanto, a pesar de la existencia de resultados contradictorios, que existe una clara relación entre la melatonina y el cáncer. La validez de la melatonina como un agente oncostático natural viene determinada por la correlación de los niveles de melatonina con la actividad neoplásica, por su mecanismo de acción como agente anticancerígeno y los resultados positivos obtenidos por la administración terapéutica de melatonina en ensayos clínicos.

### **2.5. La melatonina como agente antioxidante**

A las ya bien conocidas funciones de la melatonina hay que añadir la recientemente demostrada función antioxidante. Esta nueva función se basa en la capacidad neutralizadora de radicales libres (*scavenger*) de la melatonina. Su naturaleza liposoluble le permite atravesar con suma facilidad las membranas celulares, incluso la barrera hematoencefálica, y acceder a aquellos

compartimientos celulares en los que se originan los radicales libres, producidos como consecuencia del metabolismo aeróbico. Por todo ello, hoy en día se considera a la melatonina como uno de los componentes esenciales del sistema de defensa antioxidante de los organismos (Tabla II), y quizás el mejor de todos los agentes antioxidantes conocidos (Poeggeler et al., 1993; Reiter et al., 1993).

**Tabla II. Características que definen a la melatonina como un eficaz antioxidante.**

---

<b>Melatonina como antioxidante</b>
producción endógena
no tóxica
altamente difusible
atraviesa todas la barreras fisiológicas
acción ubicua
no requiere receptor de membrana
proporciona protección <i>in situ</i>
puede acceder al núcleo
neutralizador potente y específico de $\bullet\text{OH}$
carece de acción prooxidante
fácil de administrar

---

Cuando los sistemas fisiológicos de defensa contra los efectos oxidantes de los radicales libres (enzimas específicas y neutralizadores biológicos) se saturan por una excesiva producción de radicales libres (exposición a ciertas drogas, radiación ionizante o ultravioleta, reacciones agudas de inflamación) o por una baja actividad enzimática (recién nacidos con sistemas de defensa no desarrollados, dietas deficientes o problemas asociados con el envejecimiento), los radicales libres atacan a los diferentes constituyentes celulares como membranas, ácidos nucleicos y proteínas, lo que puede desembocar en la muerte de la célula. Al conjunto de los daños que pueden producir los radicales libres a las diferentes biomoléculas se le denomina “estrés oxidativo”. Este estrés oxidativo puede provocar el deterioro de las membranas celulares, un metabolismo deficitario y modificaciones del ADN, que pueden conducir a situaciones más o menos graves como pueden ser la carcinogénesis

(Faber, 1982), neurodegeneración (Poeggeler et al., 1993) o envejecimiento (Rice, 1993; Poeggeler et al., 1993).

La función protectora de la melatonina ante el estrés oxidativo causado por agentes oxidantes ha sido demostrada a nivel celular y molecular, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La melatonina disminuye el daño causado por diferentes agentes pro-oxidantes sobre el ADN nuclear. El safrol, un agente cancerígeno, induce la producción de radicales libres que dañan el ADN nuclear y mitocondrial (Reiter et al., 1993). Tanto la administración de concentraciones farmacológicas (Tan et al., 1993) como de concentraciones similares a la endógena (Tan et al., 1994) de melatonina disminuyeron el daño producido por safrol. Además, la hormona mostró tener una mayor eficacia radioprotectora ante el daño causado por radiaciones ionizantes que otros compuestos radioprotectores conocidos como el dimetilsulfóxido (Tan et al., 1993; Vijayalaxmi et al., 1995).

Se ha demostrado asimismo que la melatonina atenúa el efecto dañino de los radicales libres en las reacciones de peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados causada por diferentes agentes tóxicos como el paraquat, un herbicida que daña los pulmones (Melchiorri et al., 1995), LPS (Seweryneck et al., 1995), que suministrado en exceso daña tejidos y órganos (pulmón, hígado y cerebro), o ácido kaínico en cultivos de neuronas de cerebelo (Giusti et al., 1995).

La melatonina parece proteger también a las proteínas citosólicas del ataque de los radicales libres. La inducción de cataratas en ratas recién nacidas, hecho que se asocia a la degradación de proteínas citosólicas por radicales libres, es bloqueada por la administración de melatonina (Abe et al., 1994).

Por otra parte, diversas enzimas con actividad antioxidante pueden ser reguladas por la melatonina. La actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa hepática y cerebral de ratones se ve estimulada por la hormona (Pierrefiche y Laborit, 1995). La actividad de la glutatión peroxidasa es estimulada por concentraciones farmacológicas de melatonina en cerebro de rata (Barlow-Walden et al., 1995); se ha observado también que su actividad incrementa por la noche en cerebro de pollo, incremento que desaparece al inhibirse la producción de melatonina por condiciones de iluminación nocturna (Pablos et al., 1995). Los niveles de ARNm de la superóxido dismutasa en glándula harderiana de hámsters (Antolín et al., 1996) y de la glutatión peroxidasa en córtex cerebral de ratas (Kotler et al., 1998) se incrementan tras la administración de melatonina.

A su vez, enzimas con actividad pro-oxidante son inhibidas por la melatonina. La actividad de la enzima óxido nítrico sintasa controla la producción del neurotransmisor gaseoso óxido nítrico, que favorece la formación de los radicales peroxinitrito y hidroxilo; esta enzima es inhibida por concentraciones fisiológicas de melatonina en cerebelo (Pozo et al., 1994) e hipotálamo (Bettahi et al., 1996) de rata . La melatonina también inhibe la actividad de la 5-lipooxigenasa (Steinhilberg et al., 1995), enzima presente sólo en células del sistema inmune (granulocitos, monocitos/macrófagos, células cebadas y linfocitos B), que interviene en procesos inflamatorios e inmunes.

La gran importancia de la función antioxidante de la melatonina se pone de manifiesto cuando analizamos su posible implicación en diferentes enfermedades neurodegenerativas. En los procesos de envejecimiento y enfermedades relacionadas con los mismos la melatonina podría desempeñar un papel determinante. El envejecimiento y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer están relacionadas con el estrés oxidativo y la formación de radicales libres (Owen et al., 1997). Por otra parte, la producción de melatonina por la glándula pineal disminuye con la edad, de forma que en personas de edad avanzada la cantidad de melatonina en sangre se ve muy disminuida. El hecho de que ningún otro antioxidante endógeno se deteriore tan drásticamente como la melatonina permite pensar que la pérdida de melatonina durante el envejecimiento hace que células y macromoléculas sean más vulnerables al ataque oxidativo, especialmente en el cerebro, donde no hay un sistema antioxidante de defensa muy desarrollado, lo que contribuiría al desarrollo de dichas enfermedades (Reiter, 1995).

Se están llevando a cabo numerosos estudios que sugieren que la administración de melatonina puede paliar en algún grado las consecuencias de los procesos degenerativos que producen Parkinson (Acuña- Castroviejo et al., 1996; Mayo et al., 1998) y Alzheimer (Pappolla et al., 1997). En este sentido, no está claramente establecido si esta función antioxidante puede ser realizada por concentraciones fisiológicas de melatonina. Por otra parte, existen datos que demuestran como concentraciones fisiológicas de melatonina protegen contra el daño producido por los radicales libres (Tan et al., 1994; Pablos et al., 1995) y cómo las concentraciones de melatonina pueden alcanzar niveles mayores en el interior de la célula que los medidos normalmente en el suero (Menéndez-Peláez et al., 1993).

Aun considerando que el efecto antioxidante de la melatonina solo se observara a concentraciones farmacológicas, no se podría descartar la posibilidad de utilizar la administración de melatonina como un tratamiento válido para prevenir o paliar las consecuencias de determinadas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, puesto que a las propiedades

de molécula antioxidante, capacidad para atravesar cualquier barrera fisiológica y rápida absorción por el organismo, hay que añadir la de no tener, hasta la fecha, efectos tóxicos ni secundarios descritos, y las no despreciables propiedades de ser fácilmente producible y no ser un tratamiento costoso.

### 3. Mecanismos de acción de la melatonina

Los estudios iniciales que pretendían establecer los mecanismos por los cuales la melatonina llevaba a cabo sus funciones biológicas, como su efecto regulador de los ciclos circadianos actuando sobre el SCN, en los que se utilizaban análogos radioactivos de la melatonina, como [<sup>125</sup>I]melatonina, para realizar experimentos de unión de ligando o autorradiográficos, mostraron la existencia de sitios de unión de alta afinidad para la melatonina localizados, en su mayor parte, en tejidos cerebrales de una amplia variedad de especies de vertebrados. Muchos de estos sitios de unión fueron encontrados en preparaciones de membranas, o en su defecto fueron asociados a éstas.

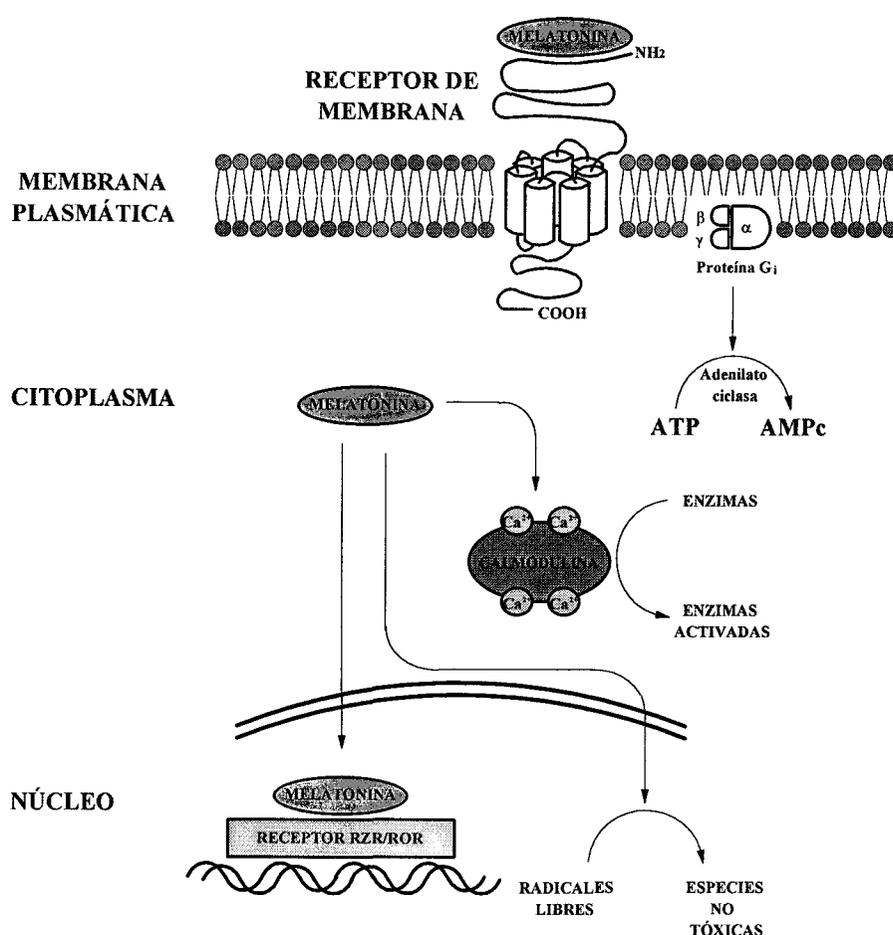
Hoy en día, se acepta la existencia de dos clases de receptores para melatonina, si nos basamos en sus características farmacológicas, denominados ML<sub>1</sub> y ML<sub>2</sub>, de alta y baja afinidad por la hormona respectivamente (Dubocovich, 1995). Ebisawa y cols en 1994 clonaron por primera vez un receptor para melatonina a partir de melanóforos de *Xenopus*, demostrando así la existencia de un receptor de membrana para melatonina cuya estructura molecular presenta siete dominios transmembrana. En función de la estructura molecular se han establecido tres clases de receptores de membrana: Mel<sub>1a</sub>, Mel<sub>1b</sub> y Mel<sub>1c</sub>, los cuales son de alta afinidad y tienen semejantes características farmacológicas (Reppert et al., 1994, 1995a, b). Se ha demostrado también que estos receptores de melatonina con siete dominios transmembrana están acoplados a diferentes efectores a través de proteínas de unión a nucleótidos de guanina.

Sin embargo, atendiendo a la estructura lipofílica de la melatonina que le permite atravesar por simple difusión la membrana plasmática, y en base a estudios inmunocitoquímicos que demostraban una distribución intracelular de melatonina (tanto citoplasmática como nuclear), así como estudios que mostraron nuevas acciones de la melatonina, no relacionadas con la actividad circadiana, sobre células en las que no se habían descrito receptores de membrana para la hormona, se iniciaron estudios para establecer una relación entre la melatonina y la fisiología intracelular que fuera mediada por mecanismos independientes de los receptores de membrana.

Como resultado de estos estudios, se ha demostrado que la melatonina puede actuar como un potente neutralizador de radicales libres interactuando directamente con éstos (Tan et al., 1993), así

como la existencia de receptores nucleares específicos para la hormona (Acuña-Castroviejo et al., 1994; Becker-André et al., 1994; Carlberg et al., 1994) y su interacción con proteínas reguladoras citoplasmáticas como la calmodulina o la proteína quinasa C (Huerto-Delgadillo et al., 1994; Benítez-King y Antón-Tay, 1996).

Por tanto, hasta la fecha son cuatro los mecanismos de acción por los cuales la melatonina puede llevar a cabo sus funciones biológicas: unión a receptores de membrana plasmática o a receptores nucleares, interacción con proteínas citosólicas y su acción directa como neutralizador de radicales libres. Sin embargo, se desconoce la posible interacción funcional entre los diferentes mecanismo de acción de la melatonina (Fig. 11).



**Figura 11. Mecanismos de acción descritos para la melatonina.**  
Tomado de Brzezinski, 1997 con algunas modificaciones.

Se ha especulado con la posible existencia de una competencia entre los diferentes mecanismos por la hormona, o bien si se excluyen unos a otros. Los receptores de membrana parecen tener una mayor afinidad por la melatonina que los receptores nucleares, por lo que en competición directa por el ligando tendrían preferencia los receptores de membrana. Se ha sugerido que una parte los sitios de unión para la melatonina en la membrana celular podrían actuar como un sistema regulador de la concentración de la concentración intracelular de melatonina, en particular en el núcleo donde parece ser que la melatonina se puede acumular alcanzando concentraciones superiores a las sanguíneas (1nM) (Acuña-Castroviejo et al., 1994). Posiblemente este mismo efecto regulador podría ser llevado a cabo por la calmodulina o otras proteínas citosólicas. Por otra parte, no se puede descartar que la activación de los receptores de membrana y la consiguiente cascada de transducción de señal pueda regular la actividad de los receptores nucleares mediante modificaciones covalentes. A esto hay que añadir el posible efecto que podrían tener sobre la concentración intracelular de melatonina la formación de radicales libres dentro de la célula.

### **3.1. Receptores de membrana para melatonina**

#### **3.1.1. Sitios de unión para melatonina**

El descubrimiento de la existencia de sitios de unión específicos para melatonina se ha alcanzado principalmente gracias a la utilización de la molécula radiactiva 2-[<sup>125</sup>I]melatonina (<sup>125</sup>I-Mel) como ligando (Vakkuri et al., 1984a, b). La mayoría de los estudios de caracterización (por estudios típicos de unión a receptores) y de distribución (por estudios autorradiográficos) de sitios de unión para melatonina se ha llevado cabo con <sup>125</sup>I-Mel, debido a que la iodación no altera la actividad biológica de la molécula, y ésta muestra una alta especificidad y afinidad de unión.

##### **3.1.1.1. Estudios de unión**

Mediante los estudios de unión se han identificado dos sitios de unión para melatonina, (Tabla III) uno de alta afinidad y otro de baja afinidad, que han sido denominados como receptores ML<sub>1</sub> y ML<sub>2</sub> respectivamente en función de sus características cinéticas y farmacológicas (Dubocovich, 1995).

El sitio de unión de alta afinidad, ML<sub>1</sub>, es el mejor caracterizado. La unión de <sup>125</sup>I-Mel es reversible, saturable, y con una afinidad en el rango de picomolar, con una K<sub>d</sub> entre 10 y 300 pM. Las

cinéticas de asociación y disociación son lentas y dependientes de temperatura, incrementándose su afinidad paralelamente al aumento de temperatura.

**Tabla III. Características de los sitios de unión para 2-[<sup>125</sup>I]melatonina.**

Tomado de Dubocovich, 1995 con modificaciones.

	ML <sub>1</sub>	ML <sub>2</sub>
<b>Denominación</b>	Alta afinidad	Baja afinidad
<b>Estado de afinidad</b>	Alta (10-300 pM) Baja (0.3-5 nM)	Alta (0.9-10 nM)
<b>Cinética: asociación</b>	Lenta (t <sub>1/2</sub> = 9-60 min)	Rápida (t <sub>1/2</sub> = 1-2 min)
<b>disociación</b>	Lenta (t <sub>1/2</sub> = <40 min)	Rápida (t <sub>1/2</sub> = 1-2 min)
<b>Regulación: GTP</b>	Sí	No
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Sí	No
<b>T<sup>a</sup></b>	Sí (1 afinidad)	Sí (1 afinidad)
<b>Farmacología</b>	<sup>125</sup> IMel ≥ Mel > 6-OHMel» NA5-HT	2-Imel > NA5-HT ≥ 6-OHMel ≥ Mel

<sup>125</sup>I-Mel, 2-[<sup>125</sup>I]melatonina; Mel, melatonina; 6-OHMel, 6-hidroximelatonina; NA5-HT, *N*-acetil-5-hidroxitriptamina.

Este sitio de alta afinidad puede coexistir en dos estados de afinidad, uno de mayor afinidad en el que el sitio de unión se encuentra acoplado a proteínas G, y un segundo estado de menor afinidad (K<sub>d</sub> = 0,3-5 nM) en el que el sitio de unión y la proteína G se han disociado. En determinadas condiciones experimentales (temperatura, concentración del ligando, y presencia de cationes y GTP endógenos) y en función del tejido es posible la detección de ambos estados de afinidad. La unión del ligando es sensible a nucleótidos de guanina y sus análogos no hidrolizables (Gpp(NH)P, GTP-γ-S), de forma que la unión de éstos a la proteína G induce su disociación del receptor, el cual pasa a un estado de menor afinidad (Morgan et al., 1989a; Rivkees et al., 1989a; Laitinen et al., 1990; Laitinen y Saavedra, 1990).

El sitio de unión de baja afinidad o  $ML_2$ , inicialmente descrito en membranas de cerebro de hámster mostrando una amplia distribución (Duncan et al., 1988, 1989; Pickering y Niles, 1990), presenta una afinidad en el rango de nanomolar, con una  $K_d$  entre 1-10 nM; sus cinéticas de asociación y disociación son rápidas y no es sensible a nucleótidos de guanina, presentado un único estado de afinidad.  $ML_2$  se ha localizado en cerebro de hámster y ratón, testículo y riñón de hámster y en la línea celular de melanoma RPMI 1846 (Morgan et al., 1994). No se le ha descrito mediación en respuesta biológica alguna, aunque una pequeña proporción de la población de  $ML_2$  existente podría ser ocupada por la melatonina dependiendo de sus concentraciones nocturnas circulantes. Por otra parte,  $ML_2$  ha sido asociado a un mecanismo de transducción de señal mediado por proteínas G (Popova y Dubocovich, 1995).

Los estudios farmacológicos muestran diferencias en las afinidades entre  $ML_1$  y  $ML_2$  por los diferentes ligandos, esta diferencia en los perfiles farmacológicos de ambos sitios de unión sugieren la existencia real de dos tipos diferentes de receptores para melatonina.

### 3.1.1.2. Distribución de sitios de unión de alta afinidad

Aunque el patrón de distribución varía de unas especies a otras, se pueden considerar algunas constantes en su distribución. En mamíferos, se ha encontrado una distribución muy discreta de los receptores de melatonina, mientras que en vertebrados no mamíferos son mucho más abundantes (Morgan et al., 1994).

Concretamente, en la mayoría de las especies de mamíferos los receptores de alta afinidad se localizan en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y *pars tuberalis* de la pituitaria (Vanecek, 1988a; Williams y Morgan, 1988; Weaver et al., 1989). En roedores se localizan en el núcleo paraventricular del tálamo de la mayoría de las especies incluidas ratones, ratas y hámsters (Williams, 1989; Weaver et al., 1989, 1990). También se ha detectado unión específica de  $^{125}I$ -Mel en el área preóptica media, hipotálamo anterior, núcleos dorsomedial y ventromedial del hipotálamo, *pars distalis* (PD) de la pituitaria anterior, núcleo anteroventral del tálamo, hipocampo, córtex cerebral y cerebelar, área postrema y retina (Vanecek, 1988a, Duncan et al., 1989; Weaver et al., 1989; Williams et al., 1989; Siuciak et al., 1990; Blazynski y Dubocovich, 1991; Deveson et al., 1992; Stankov et al 1991a, b; Lindroos et al., 1993). En humanos se ha detectado unión específica no sólo en el SCN sino también en cerebelo medio y córtex cerebral (Reppert et al., 1988; Yuan et al., 1991).

Una mayor distribución de los sitios de unión de melatonina ha sido descrita en vertebrados inferiores, especialmente en las estructuras de los sistemas visual, auditivo y límbico. En muchas especies de aves, reptiles, anfibios y peces se ha encontrado unión específica en retina, estructuras de hipotálamo, tálamo y mesencéfalo relacionadas con la visión, así como en la región cerebral auditiva del pollo y la carpa (Rivkees et al., 1989b; Martinoli et al., 1991; Ekstrom y Vanecek, 1992; Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1991, 1993, 1994; Cassone et al., 1995; Vernadakis et al., 1998).

La caracterización de sitios de unión alta afinidad ajenos al sistema nervioso central y retina se ha realizado en la mayoría de los casos por estudios de unión a membranas. Así, se han detectado sitios de unión para melatonina en arterias del anillo de Willis, arteria caudal y en diferentes vasos sanguíneos cerebrales de ratas y primates (Viswanathan et al., 1990; Stankov et al., 1993); en el tracto gastrointestinal como el yeyuno de pato, duodeno de pollo, y colon y yeyuno humanos (Lee y Pang, 1992; Pontoire et al., 1993; Poon et al., 1996); en glándula harderiana de rata (López-González et al., 1991); en ovario y testículo de pollo y espermatozoides y próstata humanos (Ayre et al., 1992; Van Vuuren et al., 1992; Laudon et al., 1996).

En órganos del sistema inmune se han descrito sitios de alta afinidad en bazo de paloma, pato, pollo, cerdo, hámster y ratón (Niles, 1989; Yu et al, 1991); en timo y bolsa de Fabricio de pato, y en timo, bazo y esplenocitos de rata (Liu y Pang, 1992a, b; Martín-Cacao et al., 1993; López-González et al., 1993a; Raffi-El Idrissi, 1995, 1996), así como en células del sistema inmune como monocitos, linfocitos de sangre periférica, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y granulocitos (López-González et al., 1992a, b, 1993b; González-Haba et al., 1995; Barjavel et al., 1998).

En función de su localización, a los receptores de melatonina se les ha implicado en la mediación de diferentes funciones biológicas. Los receptores localizados en la retina y colículos superiores regulan la función visual, los receptores en el SCN del hipotálamo están relacionados con los efectos de la melatonina sobre los ritmos circadianos, los receptores en el núcleo paraventricular del tálamo regulan probablemente la función límbica, los localizados en la PT regulan la función reproductiva en especies con reproducción marcadamente estacional, y aquéllos situados en las arterias caudal y cerebral posiblemente regulen la función cardiovascular y la temperatura.

### **3.1.1.3. Regulación**

El marcado ritmo circadiano que presentan las concentraciones circulantes de melatonina proporciona un excelente modelo fisiológico para estudios de regulación del receptor de melatonina. Estudios realizados utilizando membranas de hipotálamo que incluían al SCN muestran un ritmo diurno en la densidad de los sitios de unión de melatonina que, además, muestran una correlación inversa entre la densidad de receptores y la concentración de melatonina (Tenn y Niles, 1993). Así, los niveles mayores de unión de melatonina se encontraron en la fase luminosa, seguidos por una disminución continuada, alcanzándose los niveles más bajos durante el periodo de oscuridad cuando las concentraciones de melatonina, al ser más elevadas, producen una disminución del número de sitios de unión o *down regulation* del receptor. Se ha encontrado que la eminencia media de ratas sacrificadas al final del día presenta una mayor unión de melatonina que la de ratas sacrificadas durante la mañana (Vanecek et al., 1990). De forma similar, la supresión o depleción de la melatonina circulante por exposición constante a la luz o por pinealectomía provoca un aumento en la densidad de sitios unión en PT de rata y hámster (Gauer et al., 1992). De forma contraria, la administración de melatonina revierte el efecto de la luz constante o la pinealectomía sobre los sitios de unión de melatonina (Gauer et al., 1993).

En conjunto, la mayoría de los trabajos demuestran que la melatonina está implicada en la regulación de sus sitios de unión, y los resultados indican que sólo el estado de alta afinidad del receptor de melatonina puede ser detectado durante el periodo de luz, mientras que ambos estados, de alta y baja afinidad, pueden detectarse durante el periodo de oscuridad (Tenn y Niles, 1993). Estos autores sugieren que la proteína G, esencial para la alta afinidad del receptor, puede exhibir un ritmo circadiano con un pico durante la fase de luz, manteniendo al receptor en su estado de alta afinidad. Esta posibilidad se ve apoyada por la evidencia de que las proteínas G pueden disminuir su expresión tras la unión a los receptores de sus agonistas (Milligan y Green, 1991).

La densidad de receptores también varía con el desarrollo. Los cambios más drásticos se han descrito en la PD de la pituitaria anterior de rata, donde la densidad del receptor disminuye unas 10 veces a los 30 días del nacimiento respecto a la que se encuentra en estado embrionario (Vanecek, 1988b). Los factores que provocan esta disminución o su significado biológico no están bien establecidos; en base al efecto inhibitorio de la melatonina sobre la liberación de LH y FSH, se ha sugerido que puede deberse a una disminución en el número de receptores de las células gonadotrofas relacionado con la pubertad. Se ha observado también una disminución dependiente de la edad en la densidad de receptores en arterias de ratas, con una pérdida del 98% desde el día nueve tras el

nacimiento hasta el año de vida, si bien la densidad de receptores permanece constante a lo largo de la vida en SCN y área postrema (Laitinen et al., 1992). Cambios similares durante el desarrollo se han observado en el hámster (Vanecek y Kosar, 1994).

#### **3.1.1.4. Relación actividad-estructura de la melatonina**

Los conocimientos sobre la relación entre la estructura-afinidad y la estructura-actividad mediante el estudio de la unión de análogos de melatonina a receptores de membrana no están muy bien establecidos. Sin embargo, se sabe que el grupo metoxi en el carbono 5 del anillo indólico y la cadena *N*-acetil son importantes para la afinidad de la unión y la actividad del receptor. Así, tanto la eliminación del grupo metoxi (*N*-acetiltriptamina) como de la cadena *N*-acetil (metoxitriptamina) disminuyen drásticamente la afinidad de la unión (Sugden y Chong, 1991). El anillo indólico no parece ser necesario para la unión o la activación, parece más probable que sirva para mantener la disposición de los grupos 5-metoxi y *N*-acetil en la forma correcta para la unión y la activación (Yous et al., 1992; Dubocovich et al., 1992). El aumento en la longitud de la cadena *N*-acetil parece mejorar la afinidad y la potencia agonista; lo mismo sucede con la adición de un yodo en la posición C2 del anillo (Sugden, 1991; Sugden y Chong, 1991).

Recientemente se han sintetizado diferentes compuestos no indólicos, como el derivado naftalénico S20098 (Dubocovich et al., 1993) que compite con la <sup>125</sup>I-Mel por la unión al receptor de alta afinidad y actúa como agonista, al igual que la 2-amino-8 metoxitetralina (Copinga et al., 1993). Se han sintetizado también algunos antagonistas, como el 4-fenil-2-acetamidotetralina (Dubocovich, 1993) y el luzindol (Dubocovich, 1988); este último se forma por la sustitución en la posición C2 del anillo indólico de la *N*-acetiltriptamina por un grupo lipofílico benzil.

También se han descrito varios análogos con alta afinidad por el receptor ML<sub>2</sub> como el prazosín, la *N*-acetilserotonina y el 5-metoxicarbonilamino-*N*-acetiltriptamina (Pickering y Niles, 1990, 1992; Molinari et al., 1996).

### 3.1.2. Caracterización molecular

La biología molecular ha confirmado la existencia de diferentes receptores de melatonina. La clonación de los diferentes receptores ha supuesto un importante avance en el estudio de su estructura y actividad.

El primer ADNc de un receptor de melatonina fue clonado por Ebisawa y cols en 1994 utilizando una genoteca de expresión realizada a partir del ARNm de una línea inmortalizada de melanóforos de piel de *Xenopus laevis*, que fue transfectada y expresada en células COS-7. Los estudios de unión mostraron que este receptor une  $^{125}\text{I}$ -Mel con alta afinidad ( $K_d = 63 \text{ pM}$ ) y con una especificidad y características funcionales (inhibición de la producción de AMPc estimulada por forskolina) similares a las que presentan los receptores de alta afinidad endógenos de melanóforos epidérmicos de anfibios.

La secuencia de este fragmento de 2,2 k codifica una proteína de 420 aminoácidos con un peso molecular estimado de 47,424 ka, que mostró 7 segmentos hidrofóbicos que representan 7 segmentos transmembrana. El análisis de los transcritos por *Northern blot* mostró la existencia de tres transcritos comprendidos entre 2,4 y 4,4 kb, que pueden representar diferentes modificaciones postranscripcionales. La proteína puede estar glicosilada, ya que el extremo amino-terminal tiene una secuencia consenso para *N*-glicosilación, una característica común para la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G. Contiene también dos residuos Cys, situados en el primer y segundo segmentos extracelulares, que se cree pueden formar puentes disulfuro que estabilizarían la estructura del receptor. En los segmentos transmembrana 4, 5 y 6 presenta residuos de Pro que introducen giros en  $\alpha$ -hélice que parecen importantes en la formación del sitio de unión del ligando. El extremo carboxi-terminal tienen una longitud de 119 aminoácidos, y contiene varias secuencias consenso de fosforilación por PKC que pueden estar implicadas en su regulación.

Estructuralmente, el receptor de melatonina parece ser miembro de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G; su mayor identidad es de aproximadamente un 25% con los receptores de somatostatina tipo 2 y receptores  $\mu$  opioides. En consecuencia, se ha sugerido que este receptor de melatonina define un nuevo grupo de receptores dentro de esta superfamilia.

Mediante PCR y utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados a partir del receptor de melatonina descrito en *Xenopus laevis* por Ebisawa, receptores de alta afinidad de melatonina fueron clonados en varias especies de mamíferos, incluido el hombre (Reppert et al., 1994; Roca et al., 1996;

Weaver y Reppert, 1996). Estos receptores mostraban una identidad en la secuencia de aminoácidos de un 60% con el de *Xenopus*, y superior a un 80% entre ellos. De esta manera, estos receptores parecen ser especies homólogas de un mismo receptor, al que se le ha denominado Mel<sub>1a</sub> (Slaugenhaupt et al., 1995). Este receptor de mamíferos Mel<sub>1a</sub> presenta una alta afinidad de unión ( $K_d = 20-40$  pM) y unas características farmacológicas y funcionales (acoplado a proteínas G<sub>i</sub>) similares a sus endógenos respectivos.

Un segundo receptor de melatonina, llamado Mel<sub>1b</sub>, ha sido clonado en retina y cerebro humano (Reppert et al., 1995a). El ADNc del receptor Mel<sub>1b</sub> humano codifica para una proteína de 362 aminoácidos que muestra un 60% de identidad con el receptor Mel<sub>1a</sub> humano. Los estudios de unión con <sup>125</sup>I-Mel muestran un receptor de alta afinidad ( $K_d = 160 \pm 30$  pM), con unas características farmacológicas y funcionales iguales al receptor Mel<sub>1a</sub>.

Los receptores Mel<sub>1a</sub> y Mel<sub>1b</sub> muestran cada uno un 60% de identidad en sus secuencias de aminoácidos con el receptor de *Xenopus*. Así, es posible que este receptor represente un tercer subtipo. En este sentido, se ha clonado un receptor de alta afinidad de melatonina en pollos que muestra un 80% con el de *Xenopus* y sólo un 60% con los receptores Mel<sub>1a</sub> y Mel<sub>1b</sub>. A este nuevo subtipo de receptor se le ha denominado Mel<sub>1c</sub>; presenta también una alta afinidad de unión ( $K_d = 20-60$  pM) y tiene propiedades farmacológicas y funcionales similares a los receptores Mel<sub>1a</sub> y Mel<sub>1b</sub> de mamíferos (Reppert et al., 1995b).

Los tres subtipos del receptor de melatonina descritos tienen una estructura génica similar. La pauta abierta de lectura consta de dos exones separados por un intrón (> 8 kb). La región intrónica de procesamiento del primer segmento citoplasmático está muy conservada en los receptores Mel<sub>1a</sub> y Mel<sub>1b</sub>, y sugiere la formación por procesamiento alternativo de diferentes transcritos. Los dos receptores de melatonina humanos se localizan en diferentes cromosomas; el gen para Mel<sub>1a</sub> se encuentra en 4q35.1 y el gen Mel<sub>1b</sub> en 11q21-22 (Reppert et al., 1995a, b).

Presentan asimismo propiedades semejantes (Tabla IV): muestran una unión de alta afinidad en el rango de picomolar y median la transducción de señal a través de proteínas G<sub>i</sub> acopladas a una adenilil ciclase, inhibiendo la producción de AMPc estimulada por forskolina, la cual parece ser una vía de señalización común para los tres subtipos.

Sin embargo los tres subtipos difieren en cuanto a su distribución. Mel<sub>1a</sub> se expresa en cerebro de mamíferos y pájaros, Mel<sub>1b</sub> principalmente en retina de mamíferos, y Mel<sub>1c</sub> en melanóforos

epidérmicos, cerebro y retina de anfibios, y en cerebro de pájaros y peces. En base a esta distribución se cree que los efectos de la melatonina sobre la sensibilidad de los fotorreceptores a la luz en la retina son mediados por el receptor  $Mel_{1b}$ . El receptor  $Mel_{1a}$  representaría a la mayoría de los receptores de melatonina descritos en cerebro de mamíferos incluyendo *pars distalis* de la pituitaria y el núcleo supraquiasmático, se cree que este subtipo media los efectos estacionales y circadianos de la melatonina. Esta hipótesis se ve apoyada por la existencia de hámsters *knock-out* naturales para  $Mel_{1b}$ , los cuales mantienen una reproducción estacional y una respuesta circadiana a la melatonina (Weaver et al., 1996). Trabajos realizados por Liu y cols (1997) con ratones *knock-out* para  $Mel_{1a}$  indican que, si bien este receptor parece esencial para inhibir la actividad neuronal del SCN (su tasa de disparo), la capacidad de la melatonina para adelantar de fase el pico de actividad del SCN parece independiente de este receptor; estos autores han demostrado la existencia de expresión de  $Mel_{1b}$  en el SCN de ratón, por lo que sugieren que sería este receptor quien realizaría esta función.

**Tabla IV. Características de los receptores de membrana acoplados a proteínas G que han sido clonados.**

	$Mel_{1a}$	$Mel_{1b}$	$Mel_{1c}$
	mamíferos y aves	mamíferos	anfibios y aves
<b>K<sub>d</sub> (pM)</b>	20-40	160	20-60
<b>Efactor</b>	AMPC	AMPC	AMPC
<b>Localización</b>	SCN, PT, cerebro arteria caudal	retina, cerebro	melanófors cerebro de pollo
<b>Farmacología</b>	$^{125}I$ -Mel > Mel ≥ 6ClMel >NA5-HT	$^{125}I$ -Mel > Mel = 6ClMel » NA5-HT	$^{125}I$ -Mel > Mel ≥ 6ClMel »NA5-HT

$^{125}I$ -Mel, 2-[ $^{125}I$ ]melatonina; Mel, melatonina; 6ClMel, 6-cloromelatonina; NA5-HT, *N*-acetil-5-hidroxitriptamina.

Sin embargo los tres subtipos difieren en cuanto a su distribución.  $Mel_{1a}$  se expresa en cerebro de mamíferos y pájaros,  $Mel_{1b}$  principalmente en retina de mamíferos, y  $Mel_{1c}$  en melanóforos epidérmicos, cerebro y retina de anfibios, y en cerebro de pájaros y peces. En base a esta distribución se cree que los efectos de la melatonina sobre la sensibilidad de los fotorreceptores a la luz en la retina son mediados por el receptor  $Mel_{1b}$ . El receptor  $Mel_{1a}$  representaría a la mayoría de los receptores de

melatonina descritos en cerebro de mamíferos incluyendo *pars distalis* de la pituitaria y el núcleo supraquiasmático, se cree que este subtipo media los efectos estacionales y circadianos de la melatonina. Esta hipótesis se ve apoyada por la existencia de hámsters *knock-out* naturales para Mel<sub>1b</sub>, los cuales mantienen una reproducción estacional y una respuesta circadiana a la melatonina (Weaver et al., 1996). Trabajos realizados por Liu y cols (1997) con ratones *knock-out* para Mel<sub>1a</sub> indican que, si bien este receptor parece esencial para inhibir la actividad neuronal del SCN (su tasa de disparo), la capacidad de la melatonina para adelantar de fase el pico de actividad del SCN parece independiente de este receptor; estos autores han demostrado la existencia de expresión de Mel<sub>1b</sub> en el SCN de ratón, por lo que sugieren que sería este receptor quien realizaría esta función.

También se ha detectado la expresión del receptor Mel<sub>1a</sub> en órganos periféricos como linfocitos T y B de timo y bazo de rata, así como de Mel<sub>1a</sub> y Mel<sub>1b</sub> en riñón de fetos humanos (Pozo et al., 1997a; Drew et al., 1998).

### **3.1.3. Transducción de señales extracelulares**

La presencia de señales extracelulares que no pueden atravesar la barrera física que supone la membrana plasmática de las células es detectada por receptores en la superficie de éstas. Los receptores de membrana actúan como intermediarios que convierten la información extracelular en una información intracelular que permita a la célula desencadenar una respuesta fisiológica. En este mecanismo de acción intervienen varios componentes: ligando, receptor y efector. La unión del ligando al receptor lleva a la activación de éste, que a su vez activa al elemento respuesta o efector, quien finalmente desencadena una serie de procesos intracelulares que originan una respuesta celular concreta. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor; esta alteración se considera como una señal que activa al receptor y se denomina “activación del receptor”. La transferencia de la señal desde el sitio de unión al ligando hacia el sitio de unión del receptor con su efector es lo que se conoce como “transducción de señal”.

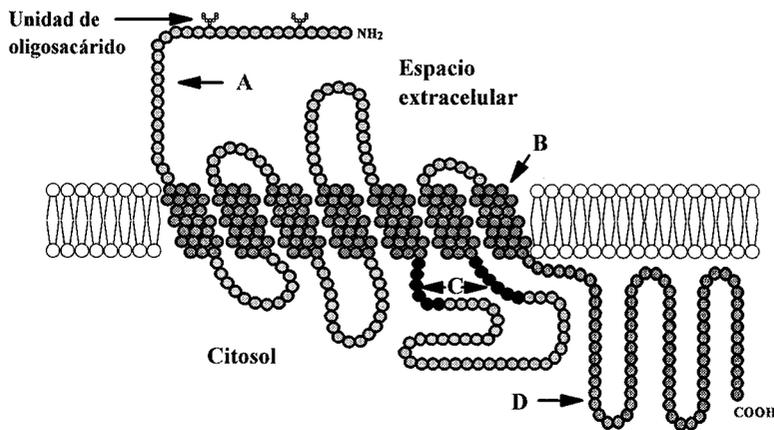
#### **3.1.3.1. Receptores de membrana acoplados a proteínas G**

Los receptores de membrana se pueden dividir en cuatro familias principales: receptores que tienen actividad enzimática quinasa intrínseca, receptores que son canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y receptores que no tienen descrito mecanismo alguno. Los GPCRs se caracterizan por llevar a cabo la interacción del receptor con el efector por medio de su

acoplamiento con las proteínas G, las cuales tienen la capacidad de unir nucleótidos de guanina. Entre los efectores de los GPCRs se encuentran la adenilil ciclasa, fosfolipasa C y A2, fosfodiesterasas y canales iónicos de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{K}^{+}$ .

Los GPCRs constituyen una gran superfamilia de receptores que incluye receptores de hormonas y neurotransmisores, sustancias paracrinas y mediadores inflamatorios, pequeños péptidos e incluso moléculas relacionadas con los olores y sabores, así como pigmentos visuales y fotones. Estos receptores son proteínas integrales de membrana cuya principal característica es la de presentar siete segmentos hidrofóbicos transmembrana.

A pesar de la gran variedad de subtipos de receptores, los GPCRs (Fig. 12) presentan una gran homología estructural (Savarese y Fraser, 1992; Strader et al., 1994). Presentan siete secuencias de unos 20-25 residuos hidrofóbicos de aminoácidos con estructura en  $\alpha$ -hélice que se corresponden con los siete segmentos transmembrana; éstos se disponen formando un bolsillo para la unión del ligando. Se han localizado varias regiones muy conservadas, implicadas en la interacción con el ligando, dentro de los segmentos transmembrana de determinadas familias de receptores, que constituyen el dominio de unión al ligando.



**Figura 12.** Estructura general de los receptores acoplados a proteínas G. **A:** Dominio extracelular de unión al ligando, que se sitúa en el extremo amino-terminal; **B:** Segmentos transmembrana; **C:** Principales regiones del receptor responsable de la interacción con las proteínas G heterotriméricas; **D:** Dominio sensible a fosforilación durante el proceso de desensibilización del receptor.

El extremo N-terminal se sitúa en el exterior celular. Varía en longitud (11-350 aminoácidos) y presenta al menos una secuencia consenso para *N*-glicosilación; la modificación por glicosilación parece ser necesaria para una normal expresión de los GPCRs en la membrana plasmática. Este dominio es imprescindible para la unión del ligando sobre todo en aquellos receptores que unen grandes glicoproteínas.

El extremo C-terminal queda en el interior celular y en muchos GPCRs se localiza un residuo de Cys que es un sitio de posible palmitoilación, la unión covalente de un residuo de ácido palmítico que sirve como anclaje de la cola C-terminal a la membrana plasmática para formar un cuarto giro intracelular.

Los dominios transmembrana están conectados entre sí por segmentos intra- y extracelulares alternados. La presencia de dos residuos de Cys muy conservados localizados uno en el extremo carboxilo del primer dominio extracelular, cercano a la unión con el tercer dominio transmembrana, y el otro hacia la mitad del segundo dominio, permite formar un puente disulfuro que tiene un papel importante en la interacción con agonistas y antagonistas y en la conformación estructural. Parece ser que los dominios intracelulares, especialmente dos secuencias de 8 y 12 residuos de aminoácidos del tercer dominio, tienen una gran importancia en la especificidad de la interacción con las diferentes proteínas G y en la transducción de la señal producida por diferentes agonistas.

Una característica importante de los receptores es que su número y capacidad para transducir señales puede ser regulada. La principal forma de regulación de los receptores es la “desensitización” o capacidad de atenuar la respuesta, de una manera más o menos rápida, debido a la exposición continua a un estímulo. Muchos receptores GPCR presentan residuos de Ser y Thr en el tercer dominio intracelular y el extremo C-terminal de la proteína que forman parte de las secuencias consenso para PKA y PKC; una vez fosforilados los receptores, se induce el desacoplamiento de la proteína G. Por otra parte, los GPCRs pueden ser regulados también por procesos de sequestración y regulación negativa o *down-regulation* (Logsdon, 1994).

### **3.1.3.2. Proteínas G**

Las proteínas G son miembros de una gran familia de proteínas que unen nucleótidos de guanina, con capacidad para hidrolizar el GTP, y que tienen una función principal en la transducción de señal de una amplia variedad de agentes biológicos activos que incluye hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento (Spiegel, 1992). La superfamilia de proteínas que unen

nucleótidos de guanina incluye a proteínas de bajo peso molecular (*ras*, proteínas relacionadas con *ras* y factores de elongación e iniciación de la síntesis de proteínas) y proteínas G heterotriméricas.

Las primeras evidencias que sugerían que las proteínas G estaban implicadas en los mecanismos de transducción de señal surgieron de los estudios de Rodbell y cols (1971a, b, 1974), en los que se describía la necesidad del GTP para la activación de la adenilil ciclasa. Pfeuffer y Helmreich aislaron en 1975 una proteína con capacidad para unir GTP de un complejo de adenilil ciclasa y, en 1976, Maguire y cols describieron que los nucleótidos de guanina reducían la afinidad del receptor por el agonista. Las observaciones realizadas por Cassel y Selinger (1976, 1977) permitieron interpretar el posible mecanismo de acción de los sistemas asociados a proteínas G. Éste consistiría en que receptores acoplados a proteínas que unen GTP desencadenan, tras la unión del ligando, un mecanismo de activación por la unión de GTP y la subsiguiente inactivación por la hidrólisis del GTP quedando unido el GDP, cuya disociación sería controlada por el receptor y constituiría el paso limitante de la reacción. Tanto la solubilización del receptor como la construcción de modelos *in vitro* han sido esenciales para el conocimiento que se tiene actualmente sobre las proteínas G.

Por definición, las proteínas G son heterotrímeros compuestos por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; estas dos últimas se encuentran fuertemente asociadas formando el complejo funcional  $\beta\gamma$  (Kaziro et al., 1991). En la actualidad hay descritas 23 subunidades  $\alpha$  (39-52 kDa) codificadas por 17 genes diferentes (Gudermann et al., 1996) y diferentes isoformas de procesamiento o *splicing*; 5 subunidades  $\beta$  (35-36 kDa) y 10 subunidades  $\gamma$  (7-10 kDa) (Watson et al., 1994; Ray et al., 1995). En función de la semejanza en la secuencia de aminoácidos de las subunidades  $\alpha$ , las proteínas G se dividen en cuatro familias (Tabla V):  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{12}$  (Simon et al., 1991). Las tres subunidades pueden combinarse dando lugar a la formación de una amplia variedad de heterotrímeros diferentes (Hepler y Gilman, 1992).

La subunidad  $\alpha$  muestra una homología estructural y funcional con el resto de las proteínas de la superfamilia (Spiegel et al., 1992; Neer, 1995; Hamm y Gilchirst, 1996); presenta un sitio de alta afinidad y especificidad de unión por nucleótidos de guanina y un sitio intrínseco de actividad GTPasa. Ciertas regiones están altamente conservadas en todas las subunidades  $\alpha$  (> 90% de identidad) y presuntamente contienen funciones comunes a todos los subtipos, como la unión y la hidrólisis del GTP. En la secuencia de aminoácidos se pueden identificar 5 dominios (G1-G5) altamente conservados no sólo en la subfamilia de subunidades  $\alpha$  sino a lo largo de la superfamilia de proteínas que unen GTP. G1 contiene una secuencia consenso que se sabe que está relacionada con la unión de

fosfato, y se cree que participa en la unión de iones magnesio; G2 presenta un residuo de Thr que puede interactuar con  $Mg^{++}$  unido a los grupos  $\beta$ - y  $\gamma$ -fosfatos de los nucleótidos de guanina; G3 podría estar implicada en los cambios conformacionales inducidos por la sustitución de GDP por GTP y en la hidrólisis del GTP; G4 está relacionado con la unión específica de anillos de purina; y G5 podría interactuar indirectamente con los nucleótidos de guanina.

**Tabla V. Clasificación de las proteínas G heterotriméricas: propiedades de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G de mamíferos. Se expresa también la sensibilidad a toxinas bacterianas y sus efectores conocidos.**

Familia	subtipo	Toxina	Efactor
$G_s$	$\alpha_{sS}, \alpha_{sL}$	CTx	↑ adenilil ciclase, ↑ canales de $Ca^{++}$
	$\alpha_{olf}$	CTx	↑ adenilil ciclase
$G_{i/o}$	$\alpha_{gust}$	---	?
	$\alpha_{t-r}, \alpha_{t-c}$	PTx/CTx	↑ fosfodiesterasa de GMPC
	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$	PTx	↓ adenilil ciclase, ↑ canales de $K^+$
	$\alpha_{o1}, \alpha_{o2}$	PTx	↓ canales de $Ca^{++}$
	$\alpha_g$	PTx	?
	$\alpha_z$	---	?
$G_q$	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15/16}$	---	↑ fosfolipasa $C_\beta$
$G_{12}$	$\alpha_{12}, \alpha_{13}$	---	?

Existen otras regiones de la secuencia de aminoácidos de las subunidades  $\alpha$  características de un determinado subtipo (< 60% de identidad) y parecen estar implicadas en interacciones proteína-proteína como el acoplamiento al receptor y al efector. Mutaciones cercanas al extremo C-terminal sugieren que éste podría estar relacionado con la interacción con el receptor, mientras que la interacción con el efector parece localizarse, al menos en la subunidad  $\alpha_s$ , en la región situada entre G3 y G4. En la interacción con el complejo  $\beta\gamma$ , el extremo amino terminal parece ser esencial, pues la delección parcial del extremo N-terminal bloquea la formación del heterodímero. Los extremos amino- y carboxi-terminal se disponen próximos entre sí y orientados hacia la membrana plasmática, y esta disposición parece ser importante para la interacción con el complejo  $\beta\gamma$ .

Son varias las funciones asociadas al complejo  $\beta\gamma$ : favorece la unión del GDP a la subunidad  $\alpha$  manteniéndola en su estado inactivo, es necesario para la afinidad de unión de la proteína G al receptor, está implicado en la regulación directa de ciertos efectores y une la proteína G a la membrana plasmática.

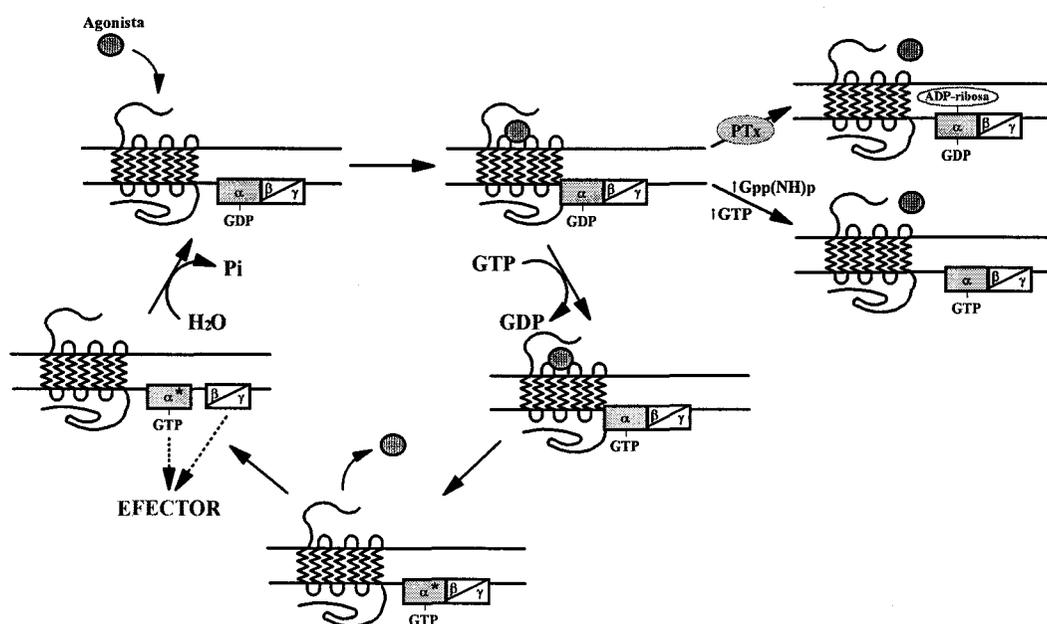
Las proteínas G se sitúan en la cara citoplasmática de la membrana celular y se unen a ésta principalmente por el complejo  $\beta\gamma$ . Tanto el complejo  $\beta\gamma$  como las subunidades  $\alpha$  pueden unirse de forma independiente a la membrana plasmática. Algunas subunidades  $\alpha$  están miristoiladas en su extremo N-terminal; esta modificación parece necesaria para la unión a la membrana y al complejo  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\gamma$  sufre varias modificaciones postraduccionales en su extremo C-terminal que son imprescindibles para la unión del complejo  $\beta\gamma$  a la membrana.

### **3.1.3.3. Activación de las proteínas G**

En su estado basal e inactivo la subunidad  $\alpha$  está unida a GDP y asociada al complejo  $\beta\gamma$  formando un heterodímero inactivo (Fig.13). La unión del ligando al receptor induce un cambio conformacional en éste que hace que se active, y esta activación hace que la afinidad de la subunidad  $\alpha$  por el GDP disminuya, con lo que el GDP se libera y es sustituido por GTP. La unión del GTP activa la subunidad  $\alpha$ , que se disocia del complejo  $\beta\gamma$  y del receptor, el cual pasa a un estado de baja afinidad por el ligando. La subunidad  $\alpha$  con el GTP unido interacciona de forma directa con un determinado efector, regulando su función. El complejo  $\beta\gamma$  puede también interactuar con algunos efectores. El estado activado se mantiene hasta que el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad  $\alpha$  que lleva a su disociación del efector, y dicha subunidad se vuelve a unir con el complejo  $\beta\gamma$  en un proceso que parece ocurrir en dos etapas (Neubig et al., 1994).

Ciertas toxinas bacterianas pueden modificar la función de las proteínas G. La toxina colérica es una proteína de 87 kDa, producida por la bacteria Gram-negativa *Vibrio cholerae*. Esta toxina cataliza la transferencia de un grupo ADP-ribosa del  $\text{NAD}^+$  al residuo de Arg<sup>201</sup> de la subunidad  $\alpha_s$ , bloqueando su capacidad para hidrolizar el GTP a GDP, lo que lleva a una activación permanente de la proteína G y de su efector, la adenilil ciclasa. La toxina pertúsica (PTx) es producida por la bacteria responsable de la tos ferina *Bordetella pertussis*. Esta toxina cataliza la ADP-ribosilación de un residuo de Cys próximo al extremo C-terminal de la subunidad  $\alpha_i$ , modificación que lleva a la disociación de la proteína G del receptor, lo que mantiene a la proteína G en su forma unida a GDP, que queda bloqueada en su estado inactivo y le impide activar al efector. Por otra parte, la disociación

de la proteína G del receptor disminuye la afinidad de éste por el ligando. La sensibilidad de las diferentes subunidades  $\alpha$  de las proteínas G a estas toxinas puede ser utilizada para discernir entre los diferentes subtipos de proteínas G.



**Figura 13. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas G.** Se representa también el efecto de la fosforilación por toxina pertúsica y nucleótidos de guanina sobre las proteínas G.

### 3.1.3.4. Regulación de efectores por proteínas G

Son varias las familias de proteínas efectoras que pueden ser reguladas por las proteínas G. De todas ellas, la regulación de la actividad de la adenilil ciclasa es la más estudiada. La AC cataliza la conversión de ATP al segundo mensajero intracelular AMP cíclico. Los efectos biológicos del AMPc son mediados por la activación de PKA dependientes de AMPc. Presenta una distribución ubicua, y se han identificado al menos ocho isoformas con diferentes características funcionales (Taussig y Gilman, 1995); la mayoría de ellas pueden ser estimuladas directamente por el diterpeno forskolina (Seamon et al., 1981). Todas las isoformas de AC son activadas por  $G_{\alpha_s}$  (Tan y Gilman, 1992). El complejo  $\beta\gamma$  inhibe la AC tipo I, mientras que estimula en presencia de subunidades  $\alpha_s$  activadas a la AC tipos II y IV (Tang y Gilman, 1991), además, la AC tipo II es activada por complejos  $\beta\gamma$  derivados de proteínas  $G_i$  (Federman et al., 1992). Las proteínas  $G_{\alpha_i}$  inhiben la actividad de la AC, pero el mecanismo no está bien caracterizado. Un posible modelo sugiere que los complejos  $\beta\gamma$

liberados por la activación de  $\alpha_i$ , se asocian a  $\alpha_s$  formando heterotrimeros inactivos, disminuyendo así la actividad de la AC (Reithmann et al., 1991). Existe un segundo modelo que sugiere una interacción directa de la subunidad  $\alpha_i$  con la AC inhibiendo su actividad.

La fosfolipasa C (PLC), como la AC, puede ser modulada por la subunidad  $\alpha$  y el complejo  $\beta\gamma$ . La PLC cataliza la hidrólisis del fosfatidil-4,5-bisfosfato para generar los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 activa la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  al unirse a los receptores específicos intracelulares; el DAG media la activación de PKC junto con el  $\text{Ca}^{++}$ . Se han descrito unas 16 isoenzimas de la PLC, que se dividen tres familias: PLC $\beta$ , PLC $\gamma$  y PLC $\delta$  (Rhee y Choi, 1992). La familia PLC $\beta$ , formada por al menos cuatro isoformas, es regulada por proteínas G. De manera similar a las AC, la regulación de las PLC por las proteínas G es característica para cada isoforma de PLC. Todas las isoformas de PLC $\beta$  pueden ser estimuladas por los miembros de la familia  $G\alpha_q$  insensible a toxina pertúsica (Smrcka y Sternweis, 1993). También existe una activación de la PLC $\beta$  sensible a PTx que es mediada por el complejo  $\beta\gamma$ , posiblemente liberado por miembros de la familia  $G\alpha_i$  (Exton, 1994).

Si bien las proteínas G pueden regular las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  modulando la actividad de las PLC, se ha descrito la activación directa de canales de  $\text{Ca}^{++}$  por proteínas  $G\alpha_s$  (Mattera et al., 1989; Birnbaumer et al., 1990). Los canales de  $\text{K}^+$  pueden ser también activados por varios miembros de las proteínas  $G\alpha_i$  sensibles a PTx (Yatani et al., 1988), y los subtipos de proteínas  $G\alpha_o$  pueden tanto inhibir canales de  $\text{Ca}^{++}$  (Hescheler et al., 1987) como activar canales de  $\text{K}^+$  (Van Dogen et al., 1988).

Otros posibles efectores para las proteínas G son las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAP), implicadas en diferentes vías de transmisión de señal inducidas por receptores mitogénicos (Blumer y Johnson, 1994; Hawes et al., 1995), la fosfodiesterasa de GMPc que es regulada por  $G\alpha_i$  (Chabre y Deterre, 1989), la 3-fosfoinosítido quinasa y varias fosfolipasas (Ofermanns y Simon, 1996).

### **3.1.4. Transducción de señal por melatonina**

La relación de la melatonina con una amplia variedad de procesos biológicos se conoce desde hace mucho tiempo; sin embargo, muchos de los efectos biológicos descritos no tienen asociada una descripción de los sitios diana ni de los mecanismos implicados. No obstante, durante la última década

se ha realizado un considerable avance en la caracterización y localización de los sitios de unión de la melatonina, así como de los mecanismos de transducción de señal y efectos celulares, en particular en lo que se refiere a los receptores de alta afinidad (Tabla VI).

#### **3.1.4.1. Efectos sobre la adenilil ciclasa**

En los primeros estudios de los efectos celulares de la melatonina, Vacas y cols (1981) observaron que la melatonina (10 nM-10  $\mu$ M) y análogos relacionados inhibían la producción basal de AMPc en la región mediobasal del hipotálamo de rata. En un estudio posterior la melatonina (0,1-10  $\mu$ M) inhibió la acumulación de AMPc inducida por la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Vacas et al., 1984a). Estudios centrados en el efecto de la melatonina sobre la AC revelaron que, en presencia de GTP, concentraciones nanomolares de la hormona suprimían la función enzimática en hipotálamo y retina de rata (Niles, 1985). Estos primeros estudios fueron corroborados por la demostración del efecto inhibitorio de la melatonina sobre la dispersión de los pigmentos en *Xenopus laevis* inducida por forskolina y dependiente de AMPc; el efecto agregante de la melatonina fue bloqueado por el pretratamiento con PTx (White et al., 1987).

El efecto inhibitorio de la melatonina sobre la AC se observó también en diferentes zonas del sistema nervioso central. En la pituitaria de ratas recién nacidas (Vanecek y Vollrath, 1989), la melatonina (10 nM) suprime los niveles basales de AMPc e inhibe el aumento de la producción inducido por forskolina así como el inducido por LH-RH de una forma dosis-dependiente ( $EC_{50} = 150$  pM). El efecto de la melatonina en hipotálamo de hámster sirio sobre la estimulación de la AC inducida por forskolina resultó ser doble; concentraciones entre 10 pM y 1 nM inhibían la actividad enzimática, mientras que concentraciones superiores eran inefectivas (Niles y Hashemi, 1990). Este efecto bifásico puede ser explicado por el hecho de que los sitios de baja afinidad, que no inhiben a la AC, están presentes en mayor cantidad que los de alta afinidad, de forma que a concentraciones elevadas de melatonina se activan los receptores de baja afinidad contrarrestando el efecto inhibitorio de los receptores de alta afinidad, posiblemente mediante una estimulación de la AC o un bloqueo de la señal inhibitoria a través de otros sistemas de transducción de señal. Esta otra vía por la que actuarían los receptores de baja afinidad podría ser la activación de PLC, la cual induciría la fosforilación por PKC de la proteína  $G_i$ , que inhibe la AC, inactivándola (Summers et al., 1988). Esta hipótesis se ve apoyada por estudios que muestran que sitios de unión para melatonina de baja afinidad activan PLC (Eison y Mullins, 1993; Popova y Dubocovich, 1995).

**Tabla VI. Transducción de señal de receptores de membrana para melatonina acoplados a proteínas G.**

<b>Receptor</b>	<b>Localización (especie)</b>	<b>Proteína G</b>	<b>Efector</b>	<b>Respuesta</b>
Alta afinidad (pM)	Hipotálamo/ SCN (humano, rata, hámster)	G $\alpha_i$	AC	↓ AMPc
Alta afinidad	retina y cerebro (humano)	G $\alpha_i$	AC	↓ AMPc
Alta afinidad	pituitaria anterior (rata)	G $\alpha_i$	AC	↓ AMPc
Alta afinidad	PT (oveja)	G $\beta\gamma$ ?/G $\alpha_z$ ?	AC	↓ AMPc
Alta afinidad	retina y cerebro (pollo)	G $\alpha_i$	AC	↓ AMPc
Alta afinidad	melanóforos ( <i>Xenopus</i> )	G $\alpha_i$	AC	↓ AMPc
Alta afinidad	timocitos y esplenocitos (rata)	G $\alpha_i$	AC	↓ AMPc
Alta afinidad	linfocitos (humanos)	G $\beta\gamma$ ?/G $\alpha_z$ ?	AC	↑ AMPc
Alta afinidad	pituitaria anterior (rata)	G $\beta\gamma$ ?/G $\alpha_o$ ?	Canales de Ca $^{++}$ ?	↓ entrada de Ca $^{++}$
Alta afinidad	retina (conejo y pollo)	G $\beta\gamma$ ?/G $\alpha_o$ ?	Canales de Ca $^{++}$ ?	↓ entrada de Ca $^{++}$
Alta afinidad	arteria caudal y circulo de Willis (rata)	G $\alpha_o$ /G $\alpha_s$ ?	Canales iónicos?	↑ contracción inducida por NE
Baja afinidad (nM)	células RPMI 1846 y cerebro (pollo)	G $\alpha_q$ /G $\alpha_{11}$	PLC $\beta$	hidrólisis de IP3

Carlson y cols observaron, en explantes de eminencia media/PT de hámster, que la melatonina inhibe la producción de AMPc inducida por forskolina y cómo ésta es bloqueada por el pretratamiento de los explantes con PTx; asimismo, la unión de  $^{125}$ I-Mel se redujo por la presencia de análogos no hidrolizables del GTP (Carlson et al., 1989). Estos datos sugirieron que los sitios de unión de alta afinidad (pM), sensibles a nucleótidos de guanina y PTx, están acoplados a la AC por medio de

proteínas G sensibles a dicha toxina. Resultados similares han sido descritos en cerebro y retina de pollo (Niles et al., 1991), córtex de conejo (Stankov et al., 1992) y arterias del anillo de Willis (Capsoni et al., 1994) y esplenocitos de rata (Raffi-El-Idrissi et al., 1995).

Si bien existen evidencias de una inhibición de la AC por proteínas G insensibles a PTx (Morgan et al., 1990; Yung et al., 1995), así como de la falta de efecto de la melatonina sobre niveles basales de AMPc o inducidos por forskolina (Morgan et al., 1989b), hoy se considera que el receptor de melatonina está acoplado a una proteína G<sub>i</sub> sensible a PTx que inhibe la actividad de la AC, disminuyendo así la producción de AMPc. Presumiblemente la activación de esta vía de transducción de señal por la melatonina disminuiría la propagación de la señal intracelular mediada por proteínas quinasa dependientes de AMPc, lo que tendría diferentes consecuencias biológicas en función de la célula diana.

Se ha descrito también un efecto de la melatonina tanto, estimulador (Vacas et al., 1981; López-González et al., 1992a) como inhibidor (Vanecek y Vollrath, 1989), sobre la producción de GMPc.

#### **3.1.4.2. Efectos sobre la PLC**

Hasta hace relativamente poco tiempo no se conocía casi nada acerca de la transducción de señal de receptores de melatonina a través de PLC. Un primer estudio, realizado en la línea celular de melanoma de hámster sirio RMPI 1846, la cual expresa sitios de unión de afinidad nanomolar para melatonina, mostró que la hormona estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos y que este efecto es bloqueado por el antagonista prazosín (Eison y Mullins, 1993). Popova y Dubocovich (1995) mostraron cómo concentraciones micromolares de melatonina, sus análogos 6-cloromelatonina y 2-iodomelatonina, y su precursor *N*-acetilserotonina incrementan el metabolismo de fosfatidilinosítoles, medido como la producción de IP3.

Más recientemente, Godson y Reppert (1997) han demostrado que la melatonina estimula la producción de IP3 inducida por PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  en células NIH 3T3 transfectadas con el receptor Mel<sub>1a</sub> humano, estimulación que es bloqueada por la preincubación con PTx. Estos autores sugieren que sería el complejo  $\beta\gamma$  el que estimularía a la PLC $\beta$ , que se sabe que es estimulada por proteínas G. Por otra parte, McArthur y cols (1997) ha demostrado en SCN de rata que la melatonina activa PKC y que este

efecto es inhibido por PTx, y sugieren que esta activación vendría mediada por la activación de PLC $\beta$  por el complejo  $\beta\gamma$  de una proteína sensible a PTx.

Estos datos sugieren que la melatonina estimula la actividad de la PLC $\beta$ , vía complejos  $\beta\gamma$  liberados de proteínas sensibles a PTx, aumentando la producción de IP3 y DAG, los cuales incrementarían las concentraciones de Ca<sup>++</sup> intracelular activando a la PKC. También se ha descrito un efecto inhibitorio, sensible a PTx, de la melatonina sobre la producción de DAG estimulada por GnRH en pituitaria de ratas recién nacidas (Vanecek y Vollrath, 1990).

### **3.1.4.3. Efectos sobre el Ca<sup>++</sup> intracelular**

Los efectos de la melatonina sobre las concentraciones intracelulares de Ca<sup>++</sup> han sido analizados principalmente por Vanecek y cols (Vanecek y Klein, 1992a, b, 1993) en células de pituitaria de rata recién nacida. Estos autores han observado que la melatonina inhibe el incremento de Ca<sup>++</sup> intracelular inducido por GnRH y la consecuente liberación de LH de una manera dosis-dependiente ( $EC_{50} = 1\text{nM}$ ); además, el pretratamiento con PTx antagonizó el efecto de la melatonina. La hormona parece actuar bloqueando el flujo de Ca<sup>++</sup> a través de canales iónicos voltaje-dependientes al inducir la hiperpolarización de la membrana plasmática. Recientemente estos autores han demostrado que la melatonina puede también inhibir la movilización de Ca<sup>++</sup> por los reservorios intracelulares (Zemkova y Vanecek, 1997). El efecto inhibitorio de la melatonina sobre ambos procesos fue bloqueado por el pretratamiento con PTx, lo que sugiere que la melatonina podría actuar a través de receptores de alta afinidad acoplados a sus efectores vía proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>.

Se ha descrito también un efecto inhibitorio de la melatonina, a concentraciones nM o superiores, sobre la captación de Ca<sup>++</sup> en hipotálamo (Zisapel y Laudon, 1983) y sinaptosomas de cerebro (Vacas et al., 1984b) de rata.

## 3.2. Receptores nucleares de melatonina

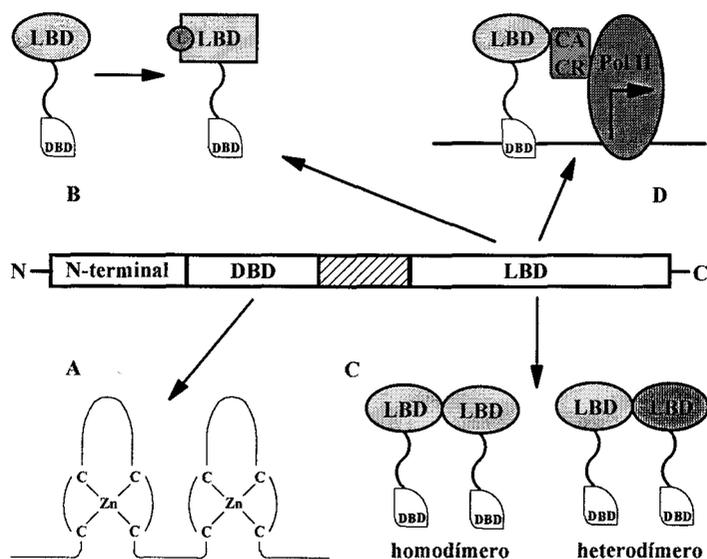
### 3.2.1. Receptores nucleares

Las hormonas esteroideas, así como las hormonas tiroideas, la vitamina D y retinoides (compuestos relacionados con el retinoato, la forma carboxilada de la vitamina A), son moléculas hidrofóbicas que pueden atravesar la membrana plasmática por simple difusión, y que median sus funciones biológicas por su unión a receptores específicos presentes en el núcleo. Una vez activados, estos receptores específicos se unen a secuencias del ADN altamente específicas denominadas “elementos de respuesta hormonal” o HRE (*Hormone Response Element*) situados en el promotor de determinados genes diana, controlando así su expresión (Glass, 1994). Los receptores para estas hormonas son miembros clásicos de la llamada “superfamilia de los receptores nucleares” (Evans, 1988; Green y Chambon, 1988). Se ha aceptado de forma general para todos ellos que la unión del ligando a su receptor específico induce en este un cambio conformacional que lo activa, y junto con la ayuda de algún factor de transcripción general puede regular la actividad transcripcional de la ARN polimerasa II; a este proceso se le ha denominado “transactivación”.

Los receptores nucleares (Fig. 14) se caracterizan por tener tres dominios principales bien diferenciados: un dominio amino-terminal variable de transactivación, una región altamente conservada de unión al ADN (DBD), y un dominio relativamente conservado carboxi-terminal de unión al ligando (LBD) que tiene capacidad de formar dímeros. El dominio de unión al ADN presenta dos estructuras de “dedos de zinc”, formadas por una secuencia rica en aminoácidos básicos y con cuatro residuos de Cys, que representan lugares de unión para un ion de  $Zn^{++}$  cada una, que contactan directamente con los nucleótidos del HRE.

Los receptores nucleares pueden actuar de diferente manera en función de determinadas características de su secuencia. Las diferencias existentes entre diferentes receptores en la secuencia de los dedos de zinc y la secuencia carboxi-terminal adyacente se ha relacionado con diferencias en el reconocimiento y la unión al ADN, así como con la existencia o no de una dimerización del receptor (Freedom y Luisi, 1993; Kurokawa et al., 1993). Diferencias en la región carboxi-terminal parecen influir en la capacidad del receptor para actuar como homodímero, heterodímero, de ambas formas o como monómero (Carlberg et al., 1994). El dominio carboxi-terminal, al igual que el amino-terminal, está también implicado en la transactivación; ambos dominios son los más variables e intervienen en la interacción directa con la maquinaria de transcripción, o bien a través de proteínas de unión (cofactores) coactivadoras o correpressoras (Horwitz et al., 1996).

Las secuencias HRE a las que se unen los receptores nucleares están constituidas por una secuencia de 6 nucleótidos como mínimo que se repite, pudiendo orientarse éstas en forma de repetición directa, de palíndrome o de palíndrome invertido. La composición, orientación y espaciamiento existente entre ambas repeticiones de dicha secuencia determinan la especificidad en el reconocimiento y unión del receptor. Los miembros clásicos de la superfamilia comparten la secuencia consenso AGGTCA.



**Figura 14. Organización estructural de los receptores nucleares.** El dominio de unión al ADN (DBD) presenta dos estructuras en dedos de zinc (A). Tras la unión del ligando (L) al dominio de unión al ligando (LBD) el receptor cambia de conformación (B). El LBD interviene también en los procesos de dimerización (C) y transactivación (D). CA-CR: coactivador o correpresor.

La gran homología existente entre los receptores nucleares, en particular en el dominio altamente conservado de unión al ADN, ha permitido la identificación de varias proteínas nucleares a las que se las ha considerado miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, para los cuales, sin embargo, no se han identificado ligandos; son los llamados receptores huérfanos (Laudet et al., 1992; O'Malley and Conneely, 1992). Al igual que los receptores nucleares para los que se conoce ligando, los receptores huérfanos pueden actuar como heterodímeros, dímeros y monómeros. No se conoce el mecanismo por el cual se regula la actividad transcripcional de estos receptores huérfanos. En un principio se pensó que su activación dependería de su unión a ligandos específicos;

sin embargo, el hecho de haberse identificado receptores nucleares que pueden ser activados de forma independiente de ligando ha sugerido que algunos receptores huérfanos no tengan un ligando específico. La fosforilación por proteínas quinasas activadas vía receptores de membranas es considerado como un posible mecanismo de activación de los receptores nucleares (Power et al., 1992).

### **3.2.2. La familia RZR/ROR**

Basándose en la gran homología existente en el dominio DBD, Becker-André y cols (1993) diseñaron, a partir de los aminoácidos más conservados de este dominio, oligonucleótidos degenerados. A continuación retrotranscribieron ARN total de células endoteliales umbilicales humanas con uno de los oligonucleótidos, obteniendo así una población de ADNc que fueron utilizados como molde para PCR con ambos oligonucleótidos. Para aumentar la especificidad del proceso se realizó una segunda PCR sustituyendo uno de los oligonucleótidos por un tercero. El producto de PCR dio un fragmento de 123 pb que se clonó, dando lugar a una colección de clones que se utilizaron como sonda para rastrear una librería de ADNc. Uno de los clones obtenidos de esta forma mostró tener una homología en su dominio DBD de un 70% con los receptores del ácido retinoico (RARs), y analogía con los receptores retinoicos X (RXRs); a este nuevo receptor huérfano lo denominaron receptor retinoico Z alfa (RZR $\alpha$ ).

Usando una estrategia similar, Carlberg y cols (1994) aislaron el receptor huérfano RZR $\beta$  a partir de cerebro de rata. Entre los dos subtipos de RZR hay una identidad del 92% en sus dominios DBD, y del 62% en sus dominios LBD.

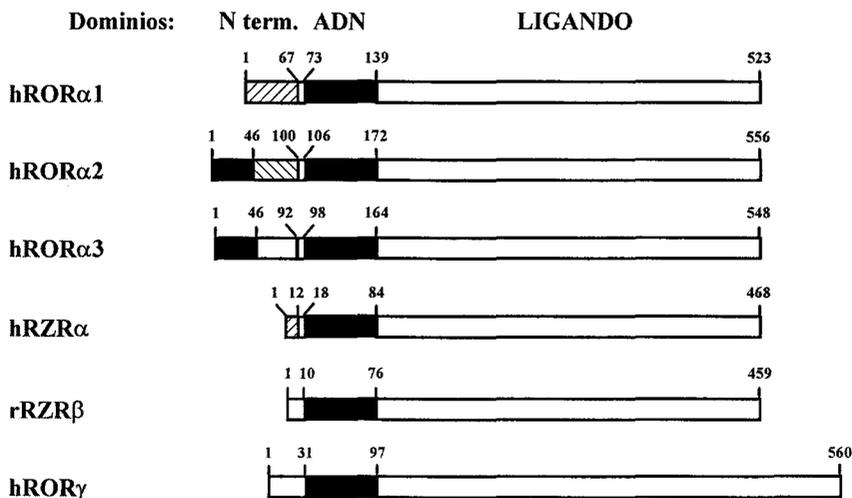
Mediante una aproximación diferente, utilizando ADNc de RAR $\alpha$  como sonda, bajo unas condiciones de poco restrictivas, sobre una genoteca de expresión de cerebro de rata, Giguère y cols (1994) obtuvieron un clon parcial que usaron como sonda, en condiciones de alta restricción, sobre genotecas de expresión de testículo y retina humana. Como resultado, identificaron tres receptores huérfanos a los que llamaron ROR $\alpha$ 1, ROR $\alpha$ 2 y ROR $\alpha$ 3.

Los 45 primeros aminoácidos del extremo amino-terminal de ROR $\alpha$ 2 y ROR $\alpha$ 3 son idénticos, mientras que ROR $\alpha$ 1 difiere de ambos en los primeros 66 aminoácidos de su extremo amino-terminal. Los restantes 457 residuos, que abarcan el dominio DBD y el dominio LBD, son comunes para las tres isoformas. Esta región común resultó ser idéntica también a la de RZR $\alpha$ , sólo que ésta tiene 11

aminoácidos adicionales en su extremo amino-terminal, de forma que ROR $\alpha$  y RZR $\alpha$  resultaron ser dos nombres diferentes para un mismo receptor nuclear. Existen, por tanto, cuatro isoformas diferentes formadas por procesamiento diferencial de un transcrito común (Carlberg y Wiesenberg, 1995).

Posteriormente, y siguiendo el mismo procedimiento descrito pero utilizando ARNm de páncreas humano para aislar clones, que luego utilizaron como sonda para hacer un barrido de una genoteca de expresión de músculo esquelético humano, Hirose y cols (1994) clonaron un nuevo receptor huérfano, que mostró una identidad del 89% en el dominio DBD y del 53% en el dominio LBD con los RZR/ROR $\alpha$  y que denominaron RZR $\gamma$ .

Tomando todos estos datos en conjunto, la familia de receptores huérfanos RZR/ROR está constituida por seis miembros, que se clasifican en tres subtipos (Fig. 15).



**Figura 15. La familia RZR/ROR.** (Carlberg y Wiesenberg, 1995).

La distribución de los diferentes miembros de la familia RZR/ROR se ha analizado por Northern blot y PCR cuantitativa. RZR/ROR $\alpha$  presenta una distribución ubicua (Becker-André et al., 1993; Forman et al., 1994), con unos niveles de expresión muy elevados en leucocitos de sangre periférica (Becker-André et al., 1993), y con una expresión diferencial de las distintas isoformas que sugiere un control génico específico por parte de cada isoforma en función del tejido (Steinhilber et al., 1995). RZR $\beta$  muestra un patrón de expresión muy restringida, casi exclusivamente en el cerebro

(Carlberg et al., 1994) y muy elevada en la glándula pineal, hipotálamo y tálamo (Becker-André et al., 1994). El ARNm para RZR $\gamma$  se localiza principalmente en músculo esquelético; también se ha detectado en timo, y en menor cantidad en páncreas, próstata, testículo, corazón y pulmón (Hirose et al., 1994).

### **3.2.3. RZR/ROR: unión al ADN**

Los receptores RZR/ROR son de los pocos receptores nucleares que se unen con una alta afinidad, con una Kd alrededor de 1 nM, a la secuencia consenso (A/G)GGTCA. Las sustituciones en cualquiera de estos nucleótidos disminuyen considerablemente la afinidad.

La una unión de estos receptores huérfanos es, principalmente monomérica y utilizan los aminoácidos de su extremo carboxi-terminal para contactar con los nucleótidos de la región 5' anterior a la secuencia consenso. Variaciones en esta región han mostrado que la presencia de una T en la posición -1 es imprescindible para la unión, mientras que la posición -2 puede tolerar cualquier nucleótido (Carlberg et al., 1994); la posición -4 debe ser una A, y de forma general la secuencia de seis nucleótidos que precede en el extremo 5' a la secuencia consenso debe ser rica en A/T (Giguère et al., 1994).

Los RZR/ROR pueden también unirse como homodímeros de forma cooperativa, cuando se alinean dos secuencias consenso incluyendo sus regiones 5' flanqueantes dispuestas en forma de políndrome sin nucleótidos espaciadores o en repeticiones directas con 8 nucleótidos espaciadores, aumentando así hasta tres veces la afinidad por la unión al ADN. De esta manera, RZR/ROR es el primer ejemplo de receptor huérfano que puede actuar como monómero y homodímero (Carlberg et al., 1994). Hasta el momento no se ha demostrado si puede actuar como heterodímero con otros receptores nucleares.

Por otra parte, se ha observado que la secuencia consenso de RZR/ROR puede ser reconocida por otros receptores nucleares, principalmente si forma parte de un HRE dimérico y, a su vez, RZR/ROR puede unirse a los HRE de otros receptores nucleares. Esto, unido el hecho de que se hayan encontrado secuencias de unión para RZR/ROR en los HRE de genes regulados por otros receptores nucleares sugiere la existencia de una competición por la unión al HRE entre RZR/ROR y otros receptores nucleares (Tini et al., 1995; Schröder et al., 1996).

### **3.2.4. La melatonina como ligando de RZR/ROR**

En experimentos de actividad transcripcional en los que se transfectaron células con vectores de expresión cuyos promotores fueron fusionados con HRE para RZR/ROR, se observó una actividad constitutiva de RZR/ROR bajo condiciones estándar de cultivo; esta actividad se vio claramente reducida por la depleción o eliminación del suero, lo que indicaba que algún o algunos componentes del suero podían, bien de una forma directa, como verdaderos ligandos, o bien indirectamente, activar RZR/ROR (Becker-André et al., 1994; Wiesenberg et al., 1995).

El pensar en la melatonina como un ligando para los RZR/ROR surgió de dos hechos independientes. El primero consistió en la detección por hibridación *in situ* de ARNm de RZR/ROR $\beta$  en retina, núcleo supraquiasmático y glándula pineal, tres tejidos productores y/o blancos para melatonina (Becker-André et al., 1994). El segundo surgió de la búsqueda de compuestos sintéticos con capacidad para regular genes a través de diferentes receptores nucleares; de éstos, el CGP 52608 (perteneciente a la clase denominada tiazolidinadonas) activó específicamente a RZR/ROR $\alpha$  y RZR/ROR $\beta$  a concentraciones 1-5 nM (Becker-André et al., 1994; Wiesenberg et al., 1995). Algunas de las características farmacológicas del CGP 52608 mostraron una gran similitud con la melatonina.

Ambas observaciones apuntaban a la melatonina como un posible ligando natural de RZR/ROR. Estudios de unión con el radioligando  $^{125}\text{I}$ -Mel y de transactivación mostraron que la melatonina se une y activa RZR/ROR $\alpha$  y  $\beta$  a concentraciones nanomolares, siendo así el primer ligando conocido para la familia de receptores nucleares RZR/ROR (Becker-André et al., 1994; Wiesenberg et al., 1995). El CGP 52608 resultó ser un ligando específico para RZR/ROR que podía competir con la melatonina por el mismo sitio de unión, además, mostró ser específico de receptores nucleares pues no se une a los receptores de membrana de alta afinidad por la melatonina, y, por tanto, puede ser utilizado para distinguir entre una señalización de la melatonina mediada a nivel nuclear o a través de receptores de membrana (Wiesenber et al., 1995).

El primer gen descrito regulado por la transactivación de RZR/ROR inducida por melatonina ha sido el gen de la 5-lipooxigenasa en linfocitos humanos (Steinhilber et al., 1995). La elección de este gen se realizó por comparación de la secuencia consenso del elemento respuesta RZR/ROR monomérico con una base de datos (EMBL). Este gen posee un elemento de respuesta CAAAATGGGTCA entre las posiciones -1521 y -1510 que une RZR/ROR $\alpha$  y  $\alpha$ 1, mientras que RZR/ROR $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 no muestran capacidad de unión.

La melatonina actúa inhibiendo la expresión de la 5-lipoxigenasa. Esta enzima interviene en los procesos inflamatorios de defensa mediante la síntesis de leucotrienos. La expresión de la 5-lipoxigenasa se limita a granulocitos, monocitos/macrófagos, mastocitos y linfocitos B, sin embargo, solo se ha observado el efecto inhibitorio de la melatonina en las células que expresan RZR/ROR $\alpha$  y  $\alpha$ 1, de los cuales sólo los linfocitos B los expresa (Steinhilber et al., 1995). Tanto los linfocitos B humanos como las líneas celulares que derivan de ellos expresan de manera constitutiva la 5-lipoxigenasa, esto ha sugerido una función antiinflamatoria de la melatonina, pues la inhibición de la síntesis de la enzima con llevaría una disminución en su actividad.

Se han identificado una serie de genes que presentan elementos de respuesta para RZR/ROR a los cuales se une con una afinidad muy variable, de los que solo tres presentan una alta afinidad: estos tres genes son inducibles por melatonina bajo condiciones de baja actividad constitutiva del receptor (Schröder et al., 1996). El que exista una elevada actividad constitutiva de RZR/ROR parece ser un impedimento para poder detectar claramente la transactivación por melatonina en experimentos con promotores heterólogos (Tini et al., 1995). Por otra parte, no se puede descartar la existencia de modificaciones covalentes, como fosforilaciones, que medien en la activación inducida por la melatonina.

### **3.2.5. Receptores nucleares para melatonina**

La posible existencia de receptores nucleares para la melatonina fue puesta de manifiesto por estudios en los que se inyectó  $^3\text{H}$ -melatonina en diferentes tejidos de rata, observándose cómo la radiactividad se acumulaba en la fracción nuclear (Withyachumnarnkul et al., 1986).

Posteriormente, mediante técnicas de inmunodetección, se describió la presencia de melatonina en el núcleo de pinealocitos y de células de retina de rata y paloma, que posiblemente estaría unida a la cromatina, lo que sugirió un posible efecto de la melatonina sobre la transcripción génica; como ocurre con otras hormonas liposolubles (Mennenga et al., 1990, 1991). De igual forma, pero con técnicas de inmunodetección más resolutivas (reacción avidina-biotina) y mediante métodos de fraccionamiento subcelular se describió la presencia de melatonina unida en núcleo de células de glándula harderiana, hígado, intestino, riñón, bazo, timo, cerebelo, córtex cerebral y glándula pineal (Menéndez -Peláez et al., 1993).

Los trabajos realizados en fracciones subcelulares mostraron la presencia de melatonina en el citosol y el núcleo de glándula harderiana, hígado e hipotálamo de rata a unas concentraciones superiores a las sanguíneas, lo que parecía indicar que la indolamina podía acumularse preferentemente en el núcleo (Menéndez-Peláez y Reiter, 1993).

Acuña-Castroviejo y cols (1994) encontraron que la melatonina se unía específicamente a núcleos purificados de hepatocitos de rata y que su afinidad ( $K_d = 148-190$  pM) concordaba con las concentraciones nucleares de melatonina descritas por Menéndez-Peláez y cols (1993); además, propusieron que la unión estaría asociada a proteínas nucleares mas que a ADN, pues el tratamiento con de los núcleos purificados con DNAasas aumentaba la unión, mientras que con proteasas desaparecía.

El descubrimiento por Wiesenber y cols (1995) del CGP 52608 como un agonista del receptor nuclear ha permitido caracterizar y estudiar el papel fisiológico de los receptores nucleares. Se ha descrito que tanto la melatonina (10 pM- 100 pM) como el CGP 52608 activan y estimulan la producción de diversas interleucinas en linfocitos Th1 humanos, indicando que este proceso puede ser mediano a través de receptores nucleares (García-Mauriño et al., 1997). Además, se ha caracterizado mediante estudios de unión la interacción de melatonina con núcleos celulares purificados de timo y bazo de rata, la unión fue específica y de alta afinidad, con una  $K_d$  de 102 y 68 pM respectivamente, y era desplazada por el CGP 52608 lo que sugiere una unión directa con los RZR/ROR (Raffi-El-Hidriss et al., 1998).

Es importante resaltar que, si bien estos resultados evidencian que la melatonina interacciona y tiene una función biológica a nivel nuclear a concentraciones similares a las existentes en sangre (100-200 pM), las concentraciones necesarias para unir y activar eficientemente los receptores RZR/ROR, descritas en experimentos de transfección son del orden nanomolar. Por otra parte hay evidencias que sugieren que la melatonina puede acumularse de forma preferente en el núcleo llegando a alcanzar concentraciones nM (Menéndez-Peláez et al., 1993).

### **3.3. Melatonina-calmodulina**

#### **3.3.1. La calmodulina como mecanismo de acción de la melatonina**

La idea de un posible mecanismo de acción de la melatonina a través de su interacción con proteínas citoplasmáticas surgió de los estudios que pretendían demostrar que la melatonina, en base a su carácter lipofílico, podía atravesar libremente la membrana plasmática y pasar al interior celular, como ocurre con las hormonas esteroideas.

La primera evidencia de la presencia de un receptor citoplasmático para la melatonina la proporcionaron Cohen y cols en 1978, quienes describieron la unión específica de <sup>3</sup>H-melatonina en el sobrenadante obtenido por ultracentrifugación de un homogenado de diferentes tejidos. Así, detectaron la unión específica de melatonina en ovario, testículo, útero, piel, hígado y ojo de hámster y rata. Por el contrario, no se observó unión en el cerebro de ninguna de las dos especies de roedores.

Teniendo en cuenta los conocidos efectos de la melatonina sobre el sistema nervioso central y su alta distribución en el cerebro, se realizaron experimentos utilizando <sup>3</sup>H-melatonina para demostrar que la hormona podía localizarse en el medio intracelular. Así, se describió la presencia en el citosol de un sitio de unión de alta afinidad para la melatonina ( $K_d = 8-30$  nM) en hipotálamo, hipocampo y núcleo estriado de rata (Niles et al., 1979). También se encontraron sitios de unión para melatonina en el citosol y en fracciones purificadas de núcleos, mitocondrias y microsomas de neuronas (Antón-Tay et al., 1988).

Los primeros estudios que mostraron una clara interacción fisiológica directa entre la melatonina y estructuras citosólicas fueron realizados por Benítez-King y cols (1990). Estos autores describieron el efecto de la melatonina sobre la reorganización del citoesqueleto en las líneas celulares MDCK y N1E-115, observando que concentraciones fisiológicas de melatonina (1 nM) afectaban a la formación de invaginaciones, formadas por puntos de unión entre células adyacentes, y al crecimiento de neuritas, al actuar sobre el proceso de elongación de los microtúbulos y microfilamentos.

En células MDCK, tras cuatro días de cultivo, se produjo un aumento del número de células que presentaban prolongaciones citoplasmáticas, así como del número de invaginaciones; la tinción con anticuerpos anti-actina mostró un mayor grosor de las fibras localizadas en la membrana plasmática y alrededor del núcleo. En las células N1E-115 la melatonina indujo un aumento del

número de células con neuritas y un mayor número de contactos celulares, observable ya a las 24 horas de cultivo; la tinción con anticuerpos anti-tubulina mostró una mayor longitud de las neuritas.

Los efectos que la melatonina ejercía sobre el citoesqueleto de estas líneas celulares y el hecho de que éstos sean modulados por la calmodulina indujo a estos autores a estudiar la posible interacción entre calmodulina y melatonina (Benítez-King et al., 1991a). Cultivaron células de ambas líneas celulares con melatonina (1 nM) y observaron un aumento en la concentración celular de CaM a los tres días y una disminución tras seis días cultivo, lo que sugería que la melatonina podía regular los niveles de CaM. Además, la melatonina inhibió la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ -CaM, y estudios de movilidad electroforética mostraron que la melatonina se une directamente a la CaM, unión que provoca un cambio conformacional de la proteína. A raíz de estos resultados propusieron que los cambios observados en el citoesqueleto se deberían a la interacción melatonina-calmodulina.

La caracterización de la unión de melatonina a la calmodulina fue llevada a cabo también por estos autores (Benítez-King et al., 1993). La unión de  $^3\text{H}$ -melatonina cumplió todos los criterios de unión de un ligando a su receptor. La unión fue saturable, reversible, específica, dependiente de la concentración de proteína y dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ , y mostró la existencia de un solo sitio de unión de alta afinidad con una  $K_d = 188 \text{ pM}$  una  $B_{\text{max}} = 35 \text{ pM}/\mu\text{g}$  de CaM.

La caracterización de la calmodulina como un receptor específico y de alta afinidad para la melatonina ha permitido proponer a la calmodulina como un mecanismo de acción para esta indolamina, por el cual, ésta regularía la actividad del citoesqueleto (Benítez-King et al., 1990) y explicaría el efecto inhibitorio de la melatonina que se ha observado sobre determinadas enzimas dependientes de calmodulina como la fosfodiesterasa de APMc (Benítez-King et al., 1991a), la  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasa (Antón-Tay et al., 1993), la óxido nítrico sintasa de cerebelo (Pozo et al., 1994, 1997b; Bettahi et al., 1996) o la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ -CaM (Benítez-King et al., 1996).

Recientemente Romero y cols (1998) han caracterizado la unión de melatonina a calmodulina en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*. La unión cumplió todos los criterios de unión de un ligando a un receptor. La unión fue dependiente de tiempo, temperatura y concentración de membrana, estable, reversible y específica. Estudios estequiométricos mostraron la existencia de un único receptor de alta afinidad con una  $K_d = 1,18 \text{ nM}$ . Además, la unión fue inhibida por clorpromazina (un inhibidor de CaM), dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y bloqueada por anticuerpos anti-CaM de manera dependiente de la dosis.

### 3.3.2. La melatonina, la calmodulina y el citoesqueleto

Los efectos que la melatonina produce en la organización del citoesqueleto parecen deberse a que la hormona se comporta preferentemente como un antagonista de la calmodulina.

La polimerización de microtúbulos es un proceso dinámico que es inhibido por el complejo  $\text{Ca}^{++}$ -CaM en presencia de proteínas MAP (proteínas asociadas a microtúbulos). La calmodulina aumenta el efecto inhibitorio del  $\text{Ca}^{++}$  al formar complejos  $\text{Ca}^{++}$ -CaM-tubulina o  $\text{Ca}^{++}$ -CaM-MAPs. Este efecto inhibitorio es revertido por antagonistas de la CaM como la trifluoperazina mediante su unión al complejo  $\text{Ca}^{++}$ -CaM, bloqueando así la formación del complejo.

Se ha demostrado que la melatonina es capaz de revertir el efecto inhibitorio de  $\text{Ca}^{++}$ -CaM sobre la polimerización de los microtúbulos aislados y en citoesqueleto *in situ* (Huerto-Delgado et al., 1994). La melatonina a una concentración de 1n M revirtió completamente el efecto inhibitorio del complejo  $\text{Ca}^{++}$ -CaM; por otra parte, en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$ -CaM la melatonina inhibió la polimerización de tubulina. Esto ha permitido sugerir un doble efecto de la melatonina sobre la polimerización de los microtúbulos; a concentraciones bajas de melatonina se favorece la polimerización del citoesqueleto antagonizando al complejo  $\text{Ca}^{++}$ -CaM, posiblemente uniéndose a la misma de manera que impida la formación de los complejos  $\text{Ca}^{++}$ -CaM-tubulina o  $\text{Ca}^{++}$ -CaM-MAPs; a concentraciones altas, una vez saturado el efecto antagonizador, la melatonina inhibe la polimerización al unirse a la tubulina (Huerto-Delgado et al., 1994).

Además del efecto antagonista sobre la calmodulina, que es considerado como un efecto a corto plazo, la melatonina puede producir respuestas a largo plazo sobre la concentración y distribución celular de la calmodulina cuyo mecanismo de acción no está bien establecido. Estudios previos habían demostrado que la melatonina modifica los niveles de CaM en la célula (Benítez-King et al., 1991a) e induce cambios en la localización subcelular de esta proteína (Benítez-King et al., 1991b).

Recientemente Antón-Tay y cols (1998) han descrito, mediante tinción inmunofluorescente, cómo en células MDCK tratadas con melatonina 1 nM durante períodos de tiempo largos, de 6 h a 4 días, se producía una redistribución de la CaM desde la periferia hacia el citosol y el núcleo. Observaron también, por radioinmunoensayo, cómo tras 4 días de incubación la cantidad de CaM unida a membranas aumentó en un 78%, mientras que la citosólica disminuyó en un 60%, manteniéndose constante la fracción nuclear. Además, la tinción simultánea con anticuerpos

específicos anti-CaM y anti-melatonina mostró que ambas se distribuyen en las mismas localizaciones subcelulares.

### **3.4. Melatonina-proteína quinasa C**

El citoesqueleto está formado por un complejo entramado de microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermedios y proteínas asociadas, cuyas interacciones definen su organización. Una vez establecido el papel de la melatonina en la modificación de la organización del citoesqueleto como un antagonista de la calmodulina, y teniendo en cuenta que la mayoría de los antagonistas de la calmodulina inhiben a la proteína quinasa C (PKC), Benítez-King y Antón-Tay estudiaron la posible interacción melatonina-PKC (1996).

Los filamentos intermedios (como la vimentina) se encuentran unidos a los microtúbulos por proteínas fosforiladas (Dráverová y Dráber, 1993). La activación de la PKC por diacilglicerol o ésteres de forbol provoca su translocación al citoesqueleto (Zalewski et al., 1990), donde fosforila a la vimentina induciendo la disgregación de los filamentos intermedios (Ando et al., 1989). Partiendo de estos datos Benítez-King y Antón-Tay estudiaron el efecto de la melatonina sobre la organización de los microfilamentos, la distribución, actividad y translocación de PKC, y la fosforilación de vimentina en células N1E-115.

En dicha línea celular, la distribución subcelular de PKC y vimentina sufrió cambios a los 30 min de incubación con melatonina 1 nM, pasando ambas de encontrarse difusas por todo el citoplasma y la región perinuclear a encontrarse distribuidas en forma de filamentos cortos en el citoplasma. En células tratadas con PMA 1  $\mu$ M, un éster de forbol activador de PKC, o con melatonina durante periodos de tiempo más largos, los microfilamentos y la PKC se concentraron alrededor del núcleo. Esto sugirió un efecto activador, más que inhibitorio, de la PKC.

Esta activación de la PKC fue comprobada. La melatonina aumentó su actividad en la fracción de membrana-citoesqueleto y provocó la translocación de la PKC del citosol a dicha fracción, así como el aumento de la fosforilación de vimentina. Los resultados utilizando PMA fueron similares. Estos resultados confirmaron la idea de un efecto estimulador de la melatonina sobre la PKC.

Experimentos realizados *in vitro* mostraron que la melatonina (1nM) activa la PKC e incrementa la unión de ésteres de forbol radioactivos a la PKC; este efecto sólo se observó en

presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Basándose en este dato Benítez-King y Antón-Tay, estudiaron los efectos de la melatonina sobre la translocación y distribución de dos isoenzimas de la familia de las proteínas quinasas C, una dependiente ( $\text{PKC}\alpha$ ) y otra independiente ( $\text{PKC}\epsilon$ ) de  $\text{Ca}^{++}$ . Sólo la  $\text{PKC}\alpha$  respondió al tratamiento con melatonina, observándose cambios en su distribución, con un incremento en la fracción de membrana-citoesqueleto.

Estos resultados apoyan la idea de que la melatonina puede modular la estructura del citoesqueleto por un mecanismo de acción que implica no sólo la interacción de la hormona con la calmodulina, sino también con la PKC. Teniendo en cuenta que ambas enzimas regulan la función de numerosas proteínas y enzimas, entre ellas proteínas quinasas, la melatonina podría influir en numerosas respuestas biológicas de la célula mediante este mecanismo de acción. A esto hay que añadir que tanto la CaM como la PKC son proteínas dependientes de calcio, por lo que cabe suponer que la melatonina podría regular otras proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{++}$ .

### **3.5. Melatonina como neutralizador de radicales libres (*Scavenger*)**

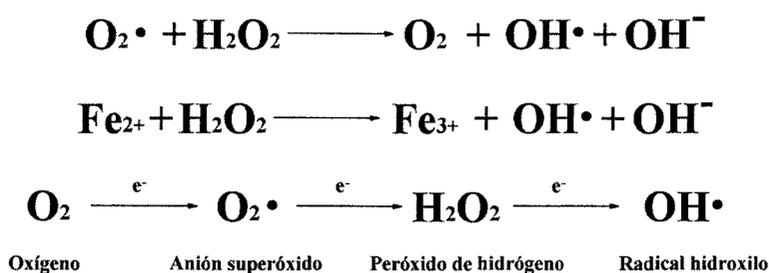
Además de la acción a través de receptores de membrana celulares, de unirse a receptores nucleares y de interaccionar directamente con proteínas citoplasmáticas; la melatonina puede actuar por sí misma como un potente neutralizador (*scavenger*) de radicales libres, lo que le confiere un gran poder como agente antioxidante.

El estudio de la acción de la melatonina como un *scavenger* se originó como consecuencia de trabajos que mostraban la presencia de melatonina en células que carecían de receptores de membrana para melatonina.

#### **3.5.1. Radicales libres de oxígeno**

Toda sustancia química tiende a tener sus electrones apareados para conseguir estabilidad. Los radicales libres son sustancias químicas que se caracterizan por tener un electrón desapareado y son, por tanto, inestables. Con el fin de alcanzar estabilidad los radicales libres tienden a donar o captar un electrón en su interacción con otras moléculas, lo que hace que sean muy reactivos y de vida muy corta.

La formación de los radicales libres de oxígeno (Fig. 16) en los organismos, si bien pueden responder a una necesidad biológica controlada (por ejemplo, la síntesis de prostaglandinas o la fagocitosis de agentes antigénicos), ocurre paralelamente al metabolismo aeróbico en las células, donde la molécula de oxígeno sufre una reducción univalente en las reacciones enzimáticas de transporte de electrones, como ocurre en la cadena respiratoria de las mitocondrias o en la unión del oxígeno a la hemoglobina. Los dos radicales que se producen son el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno.



**Figura 16. Formación de los principales radicales libres de oxígeno.**

La reducción de la molécula de oxígeno produce el radical libre anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que si se reduce en presencia de la enzima superóxido dismutasa forma peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) el cual, sin ser un radical libre, es citotóxico. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es convertido a productos no tóxicos por diferentes enzimas; sin embargo, en presencia de metales de transición, especialmente el hierro y el cobre, se descompone en el ión  $\text{OH}^-$  (no dañino) y el radical hidroxilo ( $\text{OH} \cdot$ ), el más reactivo y potente de los radicales libres. Además, el  $\text{O}_2^-$  puede reaccionar, mediante la reacción de Fenton, con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar  $\text{OH} \cdot$ .

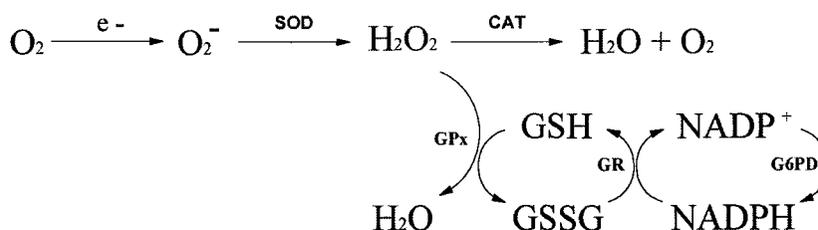
Los radicales libres se pueden producir también por la exposición de los organismos a radiaciones ionizantes ( $X$  y  $\gamma$ ), luz ultravioleta, y algunas drogas antitumorales y carcinógenos químicos. Entre los radicales libres que se forman se encuentran el radical superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilos y peróxidos orgánicos. Otra fuente de radicales libres la constituyen iones de metales de transición, principalmente hierro y cobre, los cuales interaccionan con los mismos radicales libres para formar especies muy reactivas a partir de otras que lo son menos.

Los radicales libres producidos, principalmente el  $\text{OH}^\cdot$ , son capaces de interaccionar con las biomoléculas celulares tomando un electrón o un átomo de hidrógeno de la molécula atacada, dando lugar a la formación de diferentes radicales libres de menor potencia como el radical peroxilo, que se forma por la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Estos nuevos radicales reaccionan con otras moléculas, especialmente el  $\text{O}_2$ , continuando este proceso de manera indefinida. Causan así un daño celular que puede llevar a una muerte celular y la degeneración del tejido u órgano que se ve afectado.

### 3.5.2. Protección contra los radicales libres

La formación de radicales libres de oxígeno en el organismo y su toxicidad asociada son consecuencia de la propia fisiología del organismo, dando lugar a la llamada “paradoja del oxígeno”, por lo que se hace necesario un control de la producción de los radicales libres por parte del propio organismo.

Los organismos han desarrollado un sistema de defensa antioxidante, el cual trata de proteger a las moléculas del daño producido por el ataque de los radicales libres de oxígeno. Este sistema de defensa está compuesto por dos mecanismos de protección.



**Figura 17. Principales enzimas implicadas en el metabolismo de los radicales libres de oxígeno.**

El primer mecanismo se basa en la existencia de un conjunto de enzimas específicas, localizadas en los sitios de producción de los radicales, que mantienen bajas las concentraciones de éstos (Fig. 17). Este mecanismo de defensa enzimática específico incluye dos isoformas de la superóxido dismutasa (SOD), una dependiente de Cu y Zn y otra dependiente de Mn, la catalasa

(CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Estas enzimas actúan conjuntamente para proteger contra el daño oxidativo al metabolizar los radicales libres producidos durante el metabolismo respiratorio normal o durante el estrés oxidativo.

El segundo mecanismo lo constituyen los denominados “secuestradores” de radicales libres, es decir, neutralizadores de radicales libres, que disminuyen la formación de éstos al retirar del medio iones de metales de transición. Este segundo mecanismo endógeno de defensa lo forman proteínas que unen metales de transición, hierro y cobre principalmente, como la ferritina y transferrina en el caso del hierro, y la ceruloplasmina, histidina y albúmina en el del cobre. Estas proteínas “secuestran” estos iones, impidiendo que promuevan la formación de radicales libres. También forman parte de este sistema una amplia variedad de moléculas con capacidad antioxidante localizadas en el citosol (glutatión, ácido úrico y vitamina C) o en las membranas (vitamina E y vitamina A).

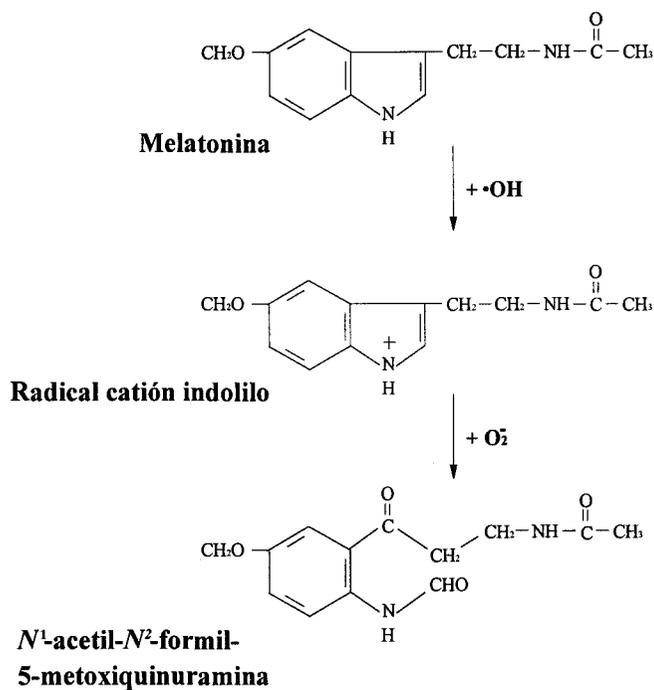
### **3.5.3. La melatonina como agente protector de radicales libres**

La melatonina actúa como agente neutralizador de estos radicales libres impidiendo el consiguiente daño que producirían a la célula (Fig. 18). Se ha demostrado que la melatonina es capaz de neutralizar al  $\text{OH}\cdot$  (Tan et al., 1993) y al radical peroxilo (Pieri et al., 1994), mostrándose en ambos casos más eficiente que los compuestos antioxidantes considerados generalmente como los más eficaces, glutatión y vitamina E respectivamente. También se ha visto que la melatonina disminuye los niveles de anión superóxido (Rodríguez et al., 1998).

El mecanismo que media la acción como *scavenger* de la melatonina es su interacción directa con el radical libre, es decir, no requiere la presencia de receptores de membrana, nucleares ni de proteínas citoplasmáticas de unión. Esta capacidad neutralizadora de la melatonina radica en su estructura química; el grupo metilo localizado en la posición 5 del anillo indólico es esencial para la acción como *scavenger*, mientras que el grupo *N*-acetilo de la cadena lateral produce una acción sinérgica (Tan et al., 1993). La importancia del grupo metoxi para llevar a cabo la actividad neutralizadora también ha sido confirmada (Scaiano, 1995).

Mediante estudios en los que se medía la pérdida de fluorescencia de la melatonina se demostró era rápidamente oxidada por el  $\text{OH}\cdot$ . A raíz de estos estudios se ha postulado que la acción como *scavenger* de la melatonina se basa en su capacidad reductora, al ceder un electrón al radical

$\text{OH}\cdot$  (Poeggeler et al., 1994). La donación de un electrón hace que la melatonina se convierta en un radical, el radical catión indolilo, el cual se cree que puede neutralizar el anión superóxido generando un metabolito no enzimático de la melatonina, la  $N^1$ -acetil- $N^2$ -formil-5-metoxiquinuramina, que es excretada en la orina.



**Figura 18. Degradación no enzimática de la melatonina.** Mecanismo neutralizador o *scavenger* frente a radicales hidroxilos de la melatonina.

## **OBJETIVOS**

---

Continuando con la línea de investigación desarrollada en nuestro laboratorio, basada en el estudio de la regulación por la melatonina del sistema inmune, el objetivo de este trabajo fue el de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción por los cuales la melatonina puede llevar a cabo su función inmune, centrándonos en la caracterización de receptores de melatonina y su mecanismo de transducción de señal en células del sistema inmune. Para ellos se plantearon los siguientes objetivos:

1. Identificar la presencia de sitios de unión de alta afinidad para melatonina en membranas de linfocitos humanos de sangre periférica.
2. Llevar a cabo la caracterización de receptores para melatonina en macrófagos peritoneales de ratón.
3. Estudiar la existencia de mecanismos de transducción de señal del receptor de membrana para melatonina por segundos mensajeros.
4. Estudiar si la transducción de señal de melatonina está mediada por proteínas G acopladas a los receptores de membrana.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## 1. REACTIVOS

La [ $^{125}\text{I}$ ]melatonina se obtuvo del Radiochemical Centre (Amersham Int., Amersham, GB). La actividad específica del radioligando fue de 1900-2175 Ci/mmol y se usó durante 60 días. De esta misma casa comercial se obtuvieron las columnas de cromatografía Amprep minicolumns, el [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP y el anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con [ $^{125}\text{I}$ ], así como los kits de determinación de AMP cíclico (Cyclic AMP (cAMP) assay kits) y de determinación de diacilglicerol (*sn*-1,2-diacylglycerol (DAG) assay reagent system).

La melatonina y los diferentes intermediarios de su ruta de síntesis (6-hidroximelatonina, *N*-acetilserotonina, 5-hidroxitriptofol, 5-metoxitriptofol, triptamina, 5-hidroxitriptamina, 5-hidroxi-DL-triptófano, 5-metoxi-DL-triptófano, 5-metoxitriptamina, ácido 5-hidroxiindol-3-acético, ácido 5-metoxiindol-3-acético, DL-triptófano), forskolina, toxina pertúsica, medio RPMI-1640, suero fetal bovino, penicilina, estreptomocina, anfotericina B, DTT, Timidina, ATP, UTP, GTP, Gpp(NH)p, GTP- $\gamma$ -S, EDTA, creatina quinase, fosfocreatina, HEPES, bacitracina, leupeptina, BSA, TLCK y PMSF se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.).

Los compuestos y los marcadores de proteínas para electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) e inmunodetección por Western blot se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). Los anticuerpos anti- $G_{i1/2}$ , anti- $G_{i3/0}$  y anti- $\beta_c$ , y el [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]NAD $^+$  se obtuvieron de DuPont NEN (DuPont de Nemours, Dreieich, Alemania), el kits ECL de quimioluminiscencia por luzindol (Enhancer ChimioLuminiscent) y el anticuerpo anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano se obtuvieron de Amersham (Buckinghamshire, GB) y las membranas de nitrocelulosa se obtuvieron de Hoeffler (San Francisco, CA, EE.UU.).

Los análogos de melatonina específicos de receptores de membrana Luzindol (2-benzil-*N*-acetilriptamina) y 4-P-PDOT (4-fenil-2-propionamidotetralina) se obtuvieron de Tocris Cookson Ltd. (Bristol, GB), y el S 20098 (Servier; *N*-acetil-2-(7-metoxinaftalin-1-il) etilamina) y análogo nuclear CGP 52608 (1-(3-allyl-4-oxotiazolidina-2-iliden)-4-metil-tiosemicarbazona) fueron sintetizados por el Dr. M. Missbach (Chemical Research, Novartis Pharma Inc.) y fueron proporcionados por la Dra. I. Wiesenberg (Pharma Research, Novartis Pharma Inc., Basel, Suiza).

El resto de reactivos utilizados fueron de calidad analítica y fueron obtenidos de diferentes casas comerciales.

## 2. PROTOCOLOS

### 2.1. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS HUMANOS

#### Objetivo

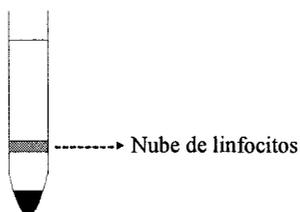
Obtención de linfocitos de sangre periférica humanos (PBLh). Los linfocitos fueron aislados mediante gradiente de densidad con Ficoll (Boyun, 1968). La viabilidad fue determinada por azul de tripán, siendo siempre mayor al 95%.

#### Materiales

- Sangre humana en tubos Vacutainer EDTA (K<sub>3</sub>).
- Salino NaCl 0,9% y 0,2% a 4°C.
- Ficoll.
- PBS 0.15 M con CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4 (PBS).

#### Método

- Diluir la sangre 1:1 con Salino 0.9%.
- Poner 3ml de Ficoll en tubos de plástico de 10 ml.
- Verter 6ml de la sangre 1:1 sobre el Ficoll, procurar no mezclarlos.
- Centrifugar a 600xg durante 15 minutos, a 4°C.
- Recoger la interfase entre el Ficoll y el suero, que contiene los PBLh, con una pipeta *Pasteur* (Fig. 19)
- Lavar las células completando con NaCl 0.9% hasta 10ml y centrifugar a 400xg durante 10 minutos, a 4°C. Repetir el lavado.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en PBS, o pasar a obtener la preparación de membranas.
- Contar las células en una cámara Fuchs-Rosenthal.
- Llevar a la concentración deseada.



**Figura 19. Obtención de linfocitos por gradiente de densidad con ficoll.**

## **2.2. AISLAMIENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN**

### **Objetivo**

Obtención de macrófagos peritoneales de ratón según el método descrito por Segura y cols (1991).

### **Materiales**

- Ratonas hembras de la cepa Swiss, de 1-1.5 meses, con un peso aproximado de 30-35 g.
- Caseinato sódico 6% (p/v).
- Salino NaCl 0,9% y 0,2% (p/v) a 4°C.
- PBS 0.15 M con CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4 (PBS).

### **Método**

- Inyectar cuatro días antes del aislamiento 2ml de caseinato sódico intraperitonealmente.
- A los cuatro días, sacrificar los ratones por decapitación y desanjarlos.
- Inyectar intraperitonealmente, a cada ratón, 6 ml de NaCl 0,9%.
- Masajear vigorosamente durante 1 minuto, aproximadamente.
- Abrir la cavidad peritoneal y extraer el NaCl 0,9%.
- Centrifugar a 400xg durante 5 minutos, a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y, resuspender en PBS o pasar a obtener la preparación de membranas.
- Contar las células en una cámara Fuchs-Rosenthal.
- Llevar a la concentración deseada.

## 2.3. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS

### Objetivo

Obtención de un stock de membranas de linfocitos de sangre periférica humanos o macrófagos peritoneales de ratón. La concentración de proteínas se determinó según el método descrito por Bradford (1976).

### Materiales

- HEPES 5 mM, pH 7,5.
- HEPES 20 mM, pH 7,5.
- Stocks de inhibidores de proteasas (Tabla VII).

### Método

- Centrifugar las células a 400xg durante 10 minutos, a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender varios pellets en 1 ml HEPES 5 mM, pH 7.5 con inhibidores.
- Incubar 15 minutos a 4°C.
- Sonicar 2 veces durante 15 segundos a máxima potencia, con intervalos de 45 segundos.
- Centrifugar a 600xg durante 10 minutos, a 4°C.
- Tomar el sobrenadante y centrifugar a 30.000xg , entre 0 y 5°C, durante 30 minutos.
- Resuspender en HEPES 20 mM con 1 mM de PMSF.
- Repartir en alícuotas de 500-100µl en eppendorf y guardar a -80°C.
- Dejar 100 µl en un eppendorf para determinar la concentración de proteínas.

HEPES 5 mM + I	Stock	[ ] final
Tripsina I	5mg / ml	0.05mg / ml
EDTA	3mg / ml	0.3mg / ml
Bacitracina	1mg / ml	0.1mg / ml
TLCK	1mg / ml	0.01mg / ml
Leupeptina	1mg / ml	0.01mg / ml
PMSF	5mg / ml	0.05mg / ml

**Tabla VII. Cóctel de inhibidores de proteasas utilizados para la preparación de membranas.**

## 2.4. ESTUDIOS DE UNIÓN CON [<sup>125</sup>I]MELATONINA

### Objetivo

Estudio de las características de unión de [<sup>125</sup>I]melatonina a membranas de linfocitos humanos y macrófagos peritoneales de ratón. La constante de disociación ( $K_d$ ) y la capacidad máxima de unión ( $B_{max}$ ) se calcularon de acuerdo con el método de Scatchard (1949). Los datos se expresan como unión específica, es decir, trazador unido total menos la cantidad de trazador que no es desplazado por la melatonina 100  $\mu$ M.

### Materiales

- Membranas de linfocitos humanos, macrófagos peritoneales o membranas de macrófagos peritoneales de ratón.
- Melatonina fría, stock 0,8 mM.
- [<sup>125</sup>I]melatonina 50 nM (1900-2175 Ci/mmol).
- Tampón de incubación: PBS 0,15 M con CaCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7,4, para estudios de unión con células; Tris-HCl 50 mM con CaCl<sub>2</sub> 4 mM, pH 7,4 y PMSF 1 mM para estudios de unión con membranas.
- Contador de radioactividad gamma LKB Wallac 1261 multigamma (Wallac Oi, Turku, Finlandia).

### Método

- Centrifugar las células (400xg durante 5-10 minutos) o las membranas (30000xg durante 30 minutos).
- Resuspender a las concentraciones requeridas en el tampón de incubación.
- Preparar en un volumen total de 400  $\mu$ l la mezcla de reacción, conteniendo células o membranas, [<sup>125</sup>I]melatonina y, cuando sea necesario, melatonina fría y otros compuestos.
- Iniciar la reacción con la adición de las membranas o células.
- Incubar a las temperaturas y tiempos indicados.
- Separar la [<sup>125</sup>I]melatonina unida por centrifugación.
- Lavar dos veces los pellets con el tampón de incubación conteniendo sacarosa al 10% (v/v).
- Medir la radioactividad en el contador gamma.

## 2.5. ESTUDIOS DE PRODUCCIÓN DE AMP CÍCLICO

### Objetivo

Estudiar la posibilidad de que la transducción de señal del receptor de membrana para la melatonina esté mediada, al inhibir la producción de AMP cíclico, por una adenilil ciclase.

El AMP cíclico se determinó según el método descrito por López-González y cols (1992a) para linfocitos humanos y Segura y cols (1992) para macrófagos peritoneales de ratón.

### Materiales

- Macrófagos peritoneales de ratón o linfocitos humanos.
- Medio de incubación: PBS 0.15 M con  $\text{CaCl}_2$  1mM, pH 7,4.
- Melatonina, stock 0.8 mM.
- Forskolina, stock 1 mM.
- Luzindol, stock 1mM.
- Metanol.
- Kits de determinación de AMP cíclico por radioinmunoensayo (RIA)

### Método

- Centrifugar las células a 400xg durante 5-10 minutos.
- Resuspender a las concentraciones requeridas en el medio de incubación.
- Preparar en un volumen total de 500  $\mu\text{l}$  la mezcla de reacción, conteniendo células y, cuando sea necesario, melatonina, forskolina y luzindol.
- Iniciar la reacción con la adición de las células.
- Incubar a 37°C durante 60 minutos los linfocitos y durante 30 minutos los macrófagos.
- Detener la reacción añadiendo 1 ml de metanol.
- Centrifugar a 600xg durante 30 minutos.
- Evaporar sobrenadante y medir el AMP cíclico.

## 2.6. PRODUCCIÓN DE DIACILGLICEROL

### Objetivo

Observar el posible acoplamiento del receptor de melatonina y el efecto la melatonina respecto a la actividad de la fosfolipasa C, midiendo la producción de diacilglicerol (DAG).

### Materiales

- Membranas de linfocitos humanos.
- Tampón de incubación: Tris-HCl 50 mM con  $\text{CaCl}_2$  4 mM, pH 7,4, y en presencia de los inhibidores de proteasas bacitracina (0,2 mg/ml), leupeptina (0.1 mg/ml) y PMSF 1 mM.
- Melatonina 0.8 mM.
- Cloroformo: metanol (1:2; v/v).
- NaCl 1 M.
- Kit de medición de *sn*-1,2-diacilglicerol, mediante fosforilación por la diacilglicerol quinasa.
- Acido [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]fosfatídico (3 Ci/mmol).
- Columnas de cromatografía Amprep minicolumns.
- Contador  $\beta$  de centelleo líquido Wallac 1409 (Wallac Oi, Turku, Finlandia).
- Líquido de centelleo para radiación  $\beta$ .

### Método

- Centrifugar las membranas a 30000xg durante 30 minutos.
- Resuspender a las concentraciones requeridas en el tampón de incubación.
- Preparar en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  la mezcla de reacción, conteniendo tampón de reacción y melatonina.
- Equilibrar la mezcla de reacción durante 3 minutos a 30°C.
- Iniciar la reacción con la adición de las membranas (1000  $\mu\text{g/ml}$ ).
- Incubar a 30°C durante 15 minutos.
- Parar la reacción añadiendo 3 ml de cloroformo:metanol.
- Añadir 1 ml de NaCl y 1 ml de cloroformo. Mezclar mediante agitación.
- Centrifugar a 600xg durante 15 minutos.
- Cuantificación del diacilglicerol producido mediante kit de medición de *sn*-1,2-diacilglicerol, según las condiciones especificadas por el fabricante, en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP.
- Purificación mediante columnas Amprep del [ $^{32}\text{P}$ ]diacilglicerol.
- Añadir 10 ml de líquido de centelleo a la fracción purificada.
- Medir la radioactividad en el contador de radiación  $\beta$ .

## 2.7. ADP-RIBOSILACIÓN DE PROTEÍNAS G DE MEMBRANAS

### Objetivo

La toxina pertúsica es una proteína hexamérica cuya capacidad enzimática radica en la subunidad S1, realizando la transferencia de un residuo ADP-ribosilación a un residuo de Cys en el extremo carboxi-terminal de todas las subunidades  $\alpha_i$  y  $\alpha_o$  de las proteínas G. La unión covalente de un residuo de ADP-ribosa a partir de  $\text{NAD}^+$  marcado con  $^{32}\text{P}$  permite detectar la presencia de subunidades  $\alpha$  sensibles a toxina pertúsica.

### Materiales

- Membranas de linfocitos humanos o de macrófagos peritoneales de ratón.
- Toxina pertúsica (200  $\mu\text{g/ml}$ ).
- Tampón de reacción: Tris 100 mM pH 8, conteniendo timidina (10 mM), ATP (1 mM), GTP (100  $\mu\text{M}$ ), EDTA (1 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1.25 mM), creatina quinasa (0,6 mg/ml), fosfocreatina (4,5 mg/ml).
- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$  (30 Ci/mmol).
- DTT (40 mM)/ ATP (1mM).
- Ácido tricloroacético 10% (p/v) frío.
- Tampón de carga para geles de poliacrilamida con SDS.

### Método

- Activar la toxina pertúsica con DTT (20 mM) a durante 15 min a 30°C. Parar la reacción poniendola en hielo.
- Preparar en un volumen de 125  $\mu\text{l}$  la mezcla de reacción: tampón de reacción, toxina pertúsica preactivada para una concentración final de 15  $\mu\text{g/ml}$  en PBLh y 24  $\mu\text{g/ml}$  en MPr;  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$  para una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$  en PBLh y 0,7  $\mu\text{M}$  en MPr.
- Iniciar la reacción con la adición de las membranas (PBLh, 0,8 mg/ml; MPr, 1,4 mg/ml).
- Incubar a 30°C durante 45 min.
- Parar la reacción de ADP-ribosilación añadiendo 1ml de ácido tricloroacético.
- Centrifugar a 3000xg durante 20 minutos, a 4°C.
- Solubilizar el pellet de proteínas con tampón de carga con SDS.
- Separar proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

## **2.8. PRETRATAMIENTO DE MEMBRANAS Y CÉLULAS CON PTx**

### **Objetivo**

La ADP-ribosilación realizada por toxina pertúsica lleva a la disociación de la proteína G de su receptor sin afectar a su estructura heterotrimérica. La disociación disminuye la afinidad del receptor por el ligando y bloquea el acoplamiento entre el receptor y sus proteínas efectoras, y, por tanto, el efecto que este ejerce sobre ellos. Para confirmar el acoplamiento del receptor de melatonina con la adenilil ciclase y fosfolipasa C, y que este es mediado por proteínas G sensibles a toxina pertúsica, se pretrataron membranas o células con toxina pertúsica lo que revertiría el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la producción de AMPc y el efecto estimulador sobre la producción de diacilglicerol. El pretratamiento se realizó según el procedimiento descrito por Ribeiro-Neto y cols (1985) con algunas modificaciones.

### **Materiales**

- Linfocitos humanos, macrófagos peritoneales de ratón y membranas de ambos tipos celulares.
- Toxina pertúsica (200 µg/ml).
- Tampón de reacción: Tris 100 mM pH 8, conteniendo timidina (10 mM), ATP (1 mM), GTP (100 µM), EDTA (1 mM), MgCl<sub>2</sub> (1.25 mM), creatina quinasa (0,6 mg/ml), fosfocreatina (4,5 mg/ml), PMSF (1mM) y NAD<sup>+</sup> (10 mM).
- DTT (40 mM)/ ATP (1mM).
- Medio de cultivo: RPMI-1640 suplementado con L-glutamina (2 mM), suero fetal de cordero 10%, penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml) y anfotericina B (2.5 µg/ml).
- PBS 0.15 M con CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4 (PBS).
- Tris-HCl 50 mM con CaCl<sub>2</sub> 4 mM, pH 7,4, conteniendo PMSF (1 mM).

### **Realización**

Producción de AMPc:

- Resuspender linfocitos humanos o macrófagos peritoneales de ratón en el medio de cultivo.
- Añadir toxina pertúsica (2 µg/ml).
- Incubar durante 8 h a 37°C en una cámara de cultivo.
- Lavar las células tres veces con PBS.
- Usar inmediatamente para experimentos de producción de AMPc.

Producción de DAG y experimentos de unión:

- Activar la toxina pertúsica con DTT (20 mM) a durante 15 min a 30°C. Parar la reacción poniendola en hielo.

## ***Material y Métodos***

---

- Preparar la mezcla de reacción: tampón de reacción; toxina pertúsica preactivada para una concentración final de 15  $\mu\text{g/ml}$  en PBLh; [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]NAD<sup>+</sup> para una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$ .
- Iniciar la reacción con la adición de las membranas de PBLh (1.5 mg/ml).
- Incubar durante 4 h a 30°C.
- Lavar dos veces con Tris-HCl 50 mM con CaCl<sub>2</sub> 4 mM, pH 7,4, conteniendo PMSF (1 mM).
- Usar inmediatamente para experimentos de producción de DAG o de unión con [ $^{125}\text{I}$ ]melatonina.

## 2.9. INMUNODETECCIÓN DE SUBUNIDADES DE PROTEÍNAS G

### Objetivo

Demostrar la expresión de las subunidades  $\alpha_{i1/2}$ ,  $\alpha_{i3/6}$  y complejos  $\beta\gamma$ , mediante anticuerpos específicos dirigidos contra el extremo carboxi-terminal de estas subunidades, en linfocitos humanos y macrófagos peritoneales de ratón.

### Materiales

- Tampón de carga para geles de poliacrilamida con SDS.
- Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12%.
- Membranas de nitrocelulosa.
- Tampón leche: Tris-HCl 50 mM pH 8, con  $\text{CaCl}_2$  2mM, NaCl 80 mM, Nonidet P-40 0.2% (v/v) y leche sin grasa 5% (p/v).
- TBST: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Tween 20 0,05% (v/v).
- TBS: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM.
- Anticuerpo 1º: Anticuerpos anti- $\alpha_{i1/2}$ , anti- $\alpha_{i3/6}$  y anti- $\beta$  común, diluidos en tampón de leche.
- Anticuerpo 2º: Anticuerpos anti-IgG específico del fragmento  $\text{F(ab')}_2$  de conejo, marcado con  $^{125}\text{I}$  para linfocitos humanos; o unido covalentemente a peroxidasa de rábano para macrófagos peritoneales de ratón.
- Sistema de revelado por quimioluminiscencia con luminol (ECL).

### Método

Todas las incubaciones y lavados se realizan a temperatura ambiente y en agitación.

- Solubilizar el pellet de proteínas con tampón de carga con SDS.
- Separar proteínas por electroforesis en gel SDS-PAGE 12%.
- Transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.
- Cortar la nitrocelulosa en tiras según los carriles de electroforesis.
- Bloquear la membrana de nitrocelulosa con tampón leche durante 60 min.
- Eliminar tampón leche.
- Incubar con anticuerpo 1º durante 1-2 h.

Linfocitos humanos:

- Lavar tres veces con tampón leche durante 15 min.
- Incubar con anticuerpo 2º durante 2 h, diluido en tampón leche.
- Lavar 2 veces con tampón leche durante 10 min.

## ***Material y Métodos***

---

- Lavar con TBS durante 10 min.
- Exponer a película autoradiográfica durante 2 días.

### Macrófagos peritoneales de ratón:

- Lavar dos veces con TBST.
- Incubar con anticuerpo 2° durante 2 h, diluido en TBST.
- Lavar dos veces con TBST durante 10 min.
- Lavar con TBS durante 10 min.
- Revelar con ECL, según las condiciones especificadas por el fabricante.
- Exponer a película autorradiográfica durante 5 min.

## **RESULTADOS**

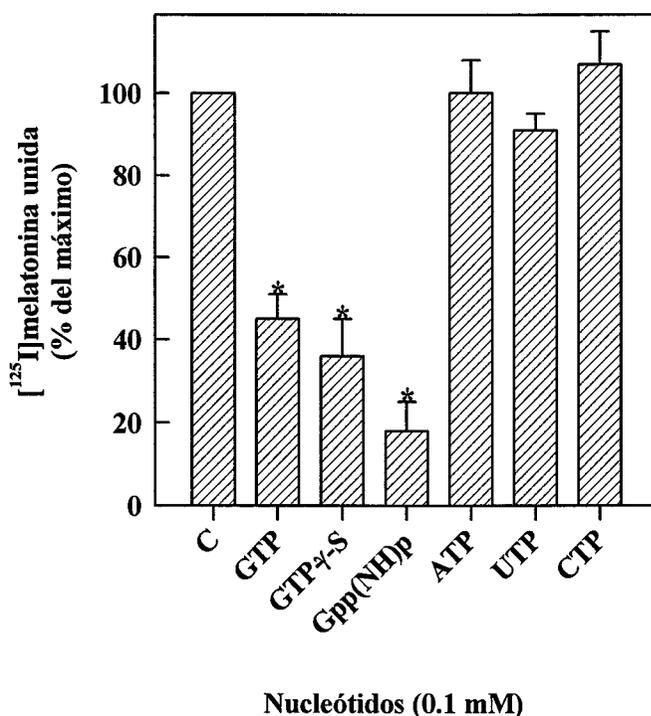
---

**1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DEL  
RECEPTOR DE MEMBRANA PARA  
MELATONINA EN LINFOCITOS HUMANOS**

## 1.1. MODULACIÓN DE LA UNIÓN DE [<sup>125</sup>I]MELATONINA POR NUCLEÓTIDOS DE GUANINA

En el contexto de la unión de un ligando a su receptor, la interacción de un receptor con una proteína G en presencia de nucleótidos de guanina se traduce como una disminución en la afinidad del receptor por el ligando, afinidad que no se ve afectada por la presencia de otros nucleótidos.

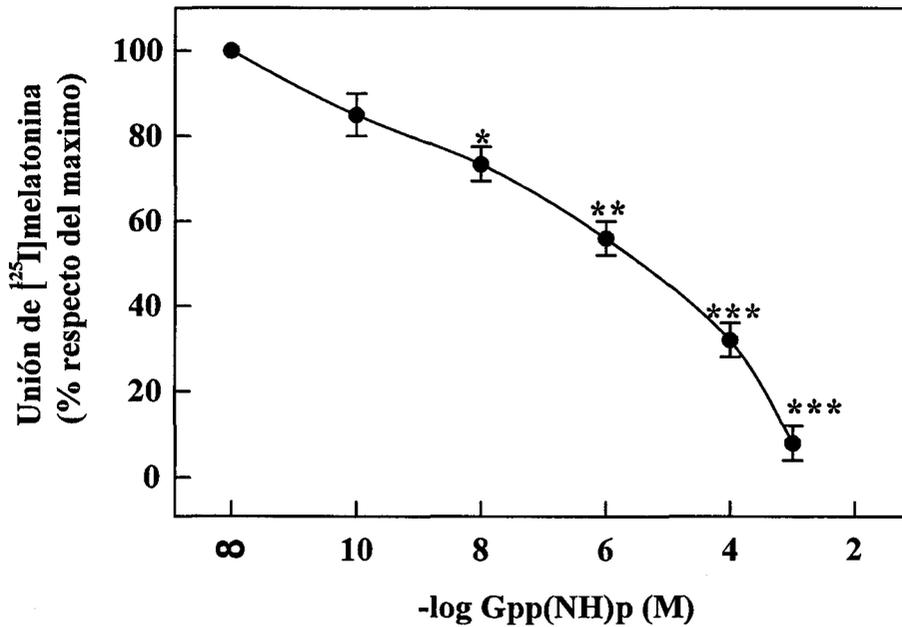
Para determinar la existencia de un acoplamiento entre el receptor de melatonina y proteínas efectoras a través de proteínas G estudiamos el efecto de nucleótidos de guanina sobre la unión de [<sup>125</sup>I]mel a membranas de linfocitos humanos. Sólo el GTP y sus análogos no hidrolizables Gpp(NH)p y GTP- $\gamma$ -S a una concentración 0,1 mM inhibieron la unión específica de melatonina a las membranas, obteniéndose la máxima inhibición (un 80% respecto del control) con el análogo Gpp(NH)p (Fig. 20). Sin embargo, otros nucleótidos como el ATP, UTP y CTP no afectaron a la unión.



**Figura 20. Efecto de diferentes nucleótidos sobre la unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a membranas de linfocitos humanos.** Las membranas (500  $\mu$ g/ml) se incubaron con [<sup>125</sup>I]melatonina 100 pM durante 60 min a 15°C, en ausencia (C: control) o presencia de los nucleótidos indicados (100  $\mu$ M). Los valores representan la media de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de ANOVA seguido por el test de Bonferroni. \*p < 0.001 vs control.

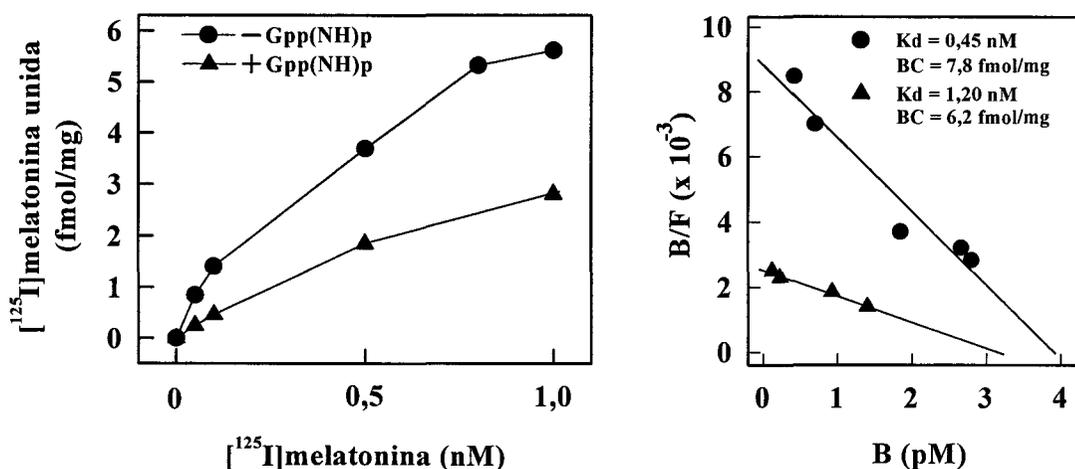
## Resultados

En experimentos en los que se incubaron las membranas con concentraciones crecientes de Gpp(NH)p se observó (Fig. 21) como la unión de [<sup>125</sup>I]mel era inhibida de una forma dependiente de la dosis. La concentración de melatonina necesaria para inhibir un 50% la unión de [<sup>125</sup>I]mel a las membranas (IC<sub>50</sub>) fue 3.5 ± 0.6 μM, aunque se observó una inhibición significativa (p < 0.05) a una concentración tan baja como 10 nM.



**Figura 21. Efecto de diferentes concentraciones de Gpp(NH)p sobre la unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a membranas de linfocitos humanos.** Las membranas (500 μg/ml) se incubaron con [<sup>125</sup>I]melatonina durante 60 minutos a 15°C, en ausencia (∞: control) o presencia de concentraciones crecientes (0.1 nM-1 mM) de Gpp(NH)p. Cada punto representan la media de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de ANOVA seguido por el test de Bonferroni. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 y \*\*\*p < 0.001 vs control.

Se estudió el efecto de los nucleótidos de guanina sobre la afinidad del receptor por la melatonina. Para ello se realizaron experimentos de saturación en los que se incubaron las membranas con concentraciones crecientes de [ $^{125}$ ]mel en ausencia y presencia de Gpp(NH)p a una concentración 0,1 mM (Fig. 22 izquierda). En ausencia de Gpp(NH)p la unión específica de [ $^{125}$ ]mel fue aumentando con la concentración de radioligando hasta una concentración de 800 pM donde se alcanzó la saturación. El análisis de Scatchard de los resultados obtenidos (Fig. 22 derecha) sugiere la presencia de un único sitio de unión de alta afinidad con una  $K_d = 0,45$  nM y una  $B_{max} = 7,8$  fmol/mg de proteína. El Gpp(NH)p disminuyó la unión específica de [ $^{125}$ ]mel (Fig. 22 izquierda) y el análisis de Scatchard (Fig. 22 derecha) mostró también un único sitio de unión de alta afinidad con una menor afinidad ( $K_d = 1,2$  nM) y una similar capacidad de unión ( $B_{max} = 6,2$  fmol/mg de proteína).



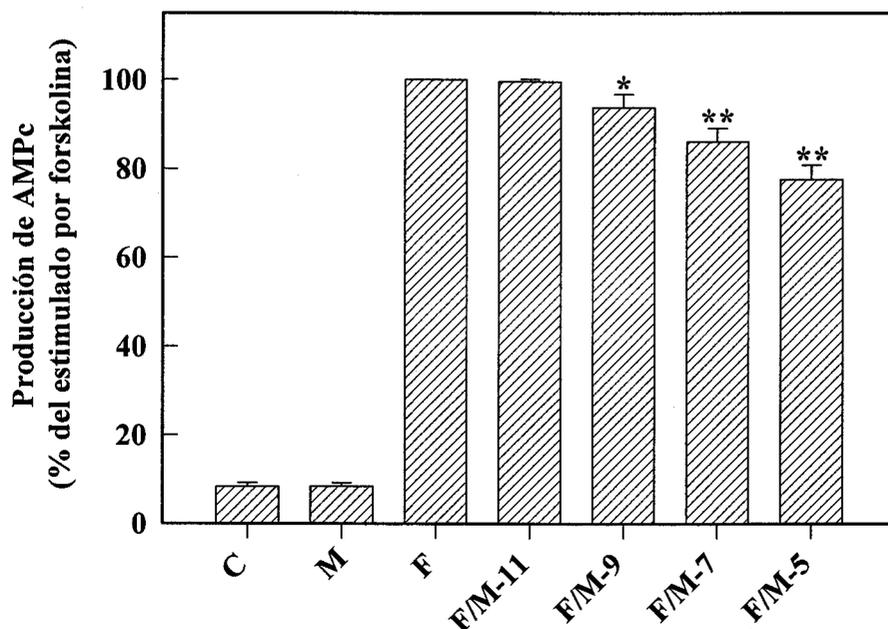
**Figura 22. Efecto del Gpp(NH)p sobre la unión específica de concentraciones crecientes de [ $^{125}$ ]melatonina a membranas de linfocitos humanos. Izquierda:** Curva de saturación. Las membranas (500  $\mu$ g/ml) se incubaron con concentraciones crecientes de [ $^{125}$ ]melatonina durante 60 min a 15°C, en ausencia (●) o presencia (▲) de Gpp(NH)p (100  $\mu$ M). Los valores representan la media de cada punto por triplicado y son representativos de otros tres experimentos. **Derecha:** análisis de Scatchard de los datos.  $K_d$ , constante de afinidad; BC, capacidad de unión.

La consiguiente disminución de la unión de melatonina, reflejada en un aumento de su  $K_d$ , inducida por la incubación en presencia de Gpp(NH)p se interpreta como una conversión de los sitios de unión de alta afinidad a un estado de menor afinidad, además, sugiere que el receptor de melatonina está asociado a proteínas G.

## 1.2. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE SEGUNDOS MENSAJEROS

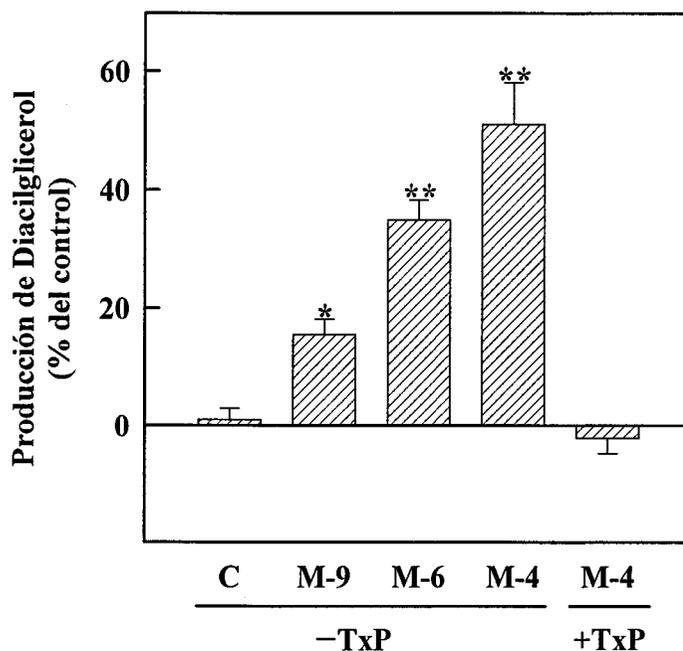
Para determinar la existencia de un acoplamiento del receptor de membrana para melatonina en linfocitos humanos a proteínas efectoras se estudió el efecto de la melatonina sobre la producción de segundos mensajeros, centrandonos en el efecto de la melatonina sobre la producción de AMPc y dactilglicerol.

La incubación de linfocitos humanos con melatonina (0,1  $\mu$ M) no mostró ningún efecto sobre la producción basal de AMPc (Fig. 23). Sin embargo, estimulando la producción de AMPc mediante el potente activador de la adenilil ciclasa forskolina (1  $\mu$ M), la melatonina inhibió la producción de AMPc de una forma dependiente de la dosis (1 nM-10  $\mu$ M), obteniendose un máximo de inhibición, de aproximadamente un 25%, a una concentración de melatonina de 10  $\mu$ M y siendo significativa a una concentración 1 nM.



**Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de melatonina sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina en linfocitos humanos.** Las células ( $5 \times 10^6$  células/ml) se incubaron con melatonina, forskolina, ambos o ninguno durante 60 min a 37°C. C, control; M, melatonina (0.1  $\mu$ M); F, forskolina (1  $\mu$ M); F/M, forskolina (1  $\mu$ M) más melatonina (hasta 10  $\mu$ M). Los valores representan la media de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de la *t* de Student. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 vs forskolina.

Por otra parte, la melatonina estimuló la producción de DAG (Fig. 24) en membranas de linfocitos humanos de forma dosis-dependiente, una concentración de melatonina 1 nM estimuló de forma significativa (15%) y se alcanzó una estimulación de alrededor del 50% con melatonina a una concentración 0.1 mM.

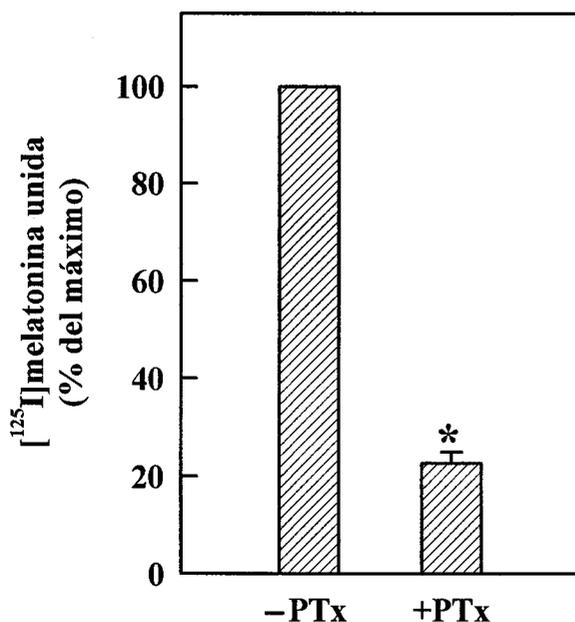


**Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de melatonina y del pretratamiento con toxina pertúsica sobre la producción de DAG en membranas de linfocitos humanos.** Las membranas (1 mg/ml) se incubaron con melatonina durante 15 min a 30°C, sin (-PTx) o con (+PTx) pretratamiento con toxina pertúsica (15 µg/ml). C, control; M, melatonina (hasta 0.1 mM). La significación estadística se determinó por el test de ANOVA seguido por el test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  vs control.

## 1.2. MEDIACIÓN DE PROTEÍNAS G EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DE MELATONINA

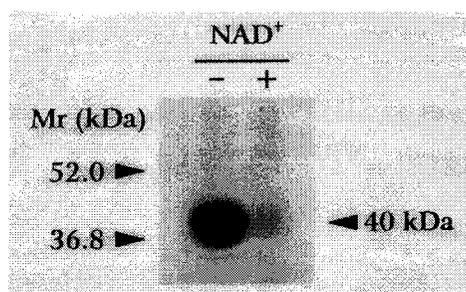
Para estudiar si el mecanismo de transducción de señal de melatonina está mediado por proteínas G se observó si el efecto de la melatonina sobre la inhibición de la producción de AMPc y la estimulación de la producción de diacilglicerol, así como la unión de [<sup>125</sup>I]mel podían ser bloqueados por el pretratamiento con toxina pertúsica.

La preincubación de membranas de linfocitos humanos con 15 µg/ml de toxina pertúsica (+PTx) durante cuatro horas a 30°C inhibió la unión específica de [<sup>125</sup>I]mel en un 70% (Fig. 25) respecto a membranas preincubadas en las mismas condiciones pero en ausencia de toxina pertúsica (-PTx). Este resultado indica que el receptor de membranas de melatonina está asociado a proteínas G sensibles a toxina pertúsica.



**Figura 25. Efecto del pretratamiento con toxina pertúsica sobre la unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a membranas de linfocitos humanos.** Las membranas (1.5 mg/ml) se preincubaron con 15 µg/ml de toxina pertúsica (+PTx) o sin toxina pertúsica (-PTx) y a continuación se incubaron con [<sup>125</sup>I]melatonina (100 pM) durante 60 min a 15°C. Los valores representan la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de la *t* de Student. \**p* < 0.0001 vs control.

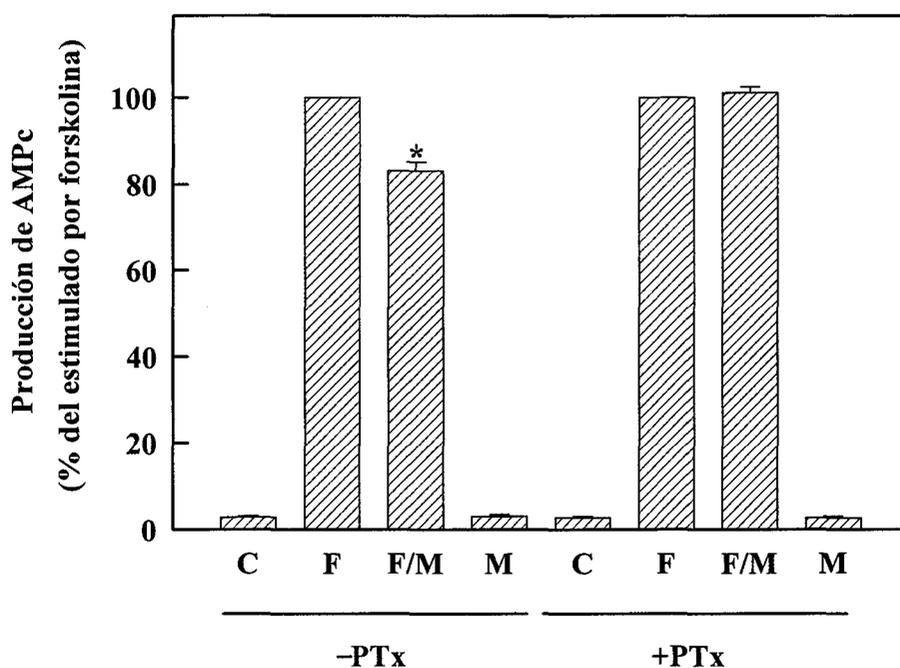
Con el fin de comprobar si la toxina pertúsica catalizaba la ADP-ribosilación de proteínas G en las preparaciones de membranas de linfocitos humanos se llevó a cabo el siguiente experimento. Se pretrataron membranas con toxina pertúsica manteniendo las condiciones anteriores en presencia de  $\text{NAD}^+$ , a continuación se llevó la ADP-ribosilación con PTx utilizando  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$  como donador de ADP-ribosa. Como se observa en la figura 26 la toxina pertúsica puso de manifiesto un material ADP-ribosilable de un peso molecular aproximado de 40 kDa. Asimismo, la falta de señal radioactiva que se observa en las membranas pretratadas con toxina pertúsica (+) indica como ésta ADP-ribosiló todo el sustrato ADP-ribosilable en las membranas de linfocitos humanos pretratadas (Fig. 26), confirmado así la validez del pretratamiento.



**Figura 26. Efecto del pretratamiento con  $\text{NAD}^+$  sobre la  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ -ribosilación por toxina pertúsica en membranas de linfocitos humanos.** Las membranas (800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fueron preincubaron con toxina pertúsica (PTx) o vehicle (PTx) en presencia de  $\text{NAD}^+$  durante 4 horas a 30°C, y a continuación se lavaron e incubaron con 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de toxina pertúsica y 0,5  $\mu\text{M}$  de  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$  durante 45 min a 30°C. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y expuestas a una placa autorradiográfica. Este experimento es representativo de otros dos.

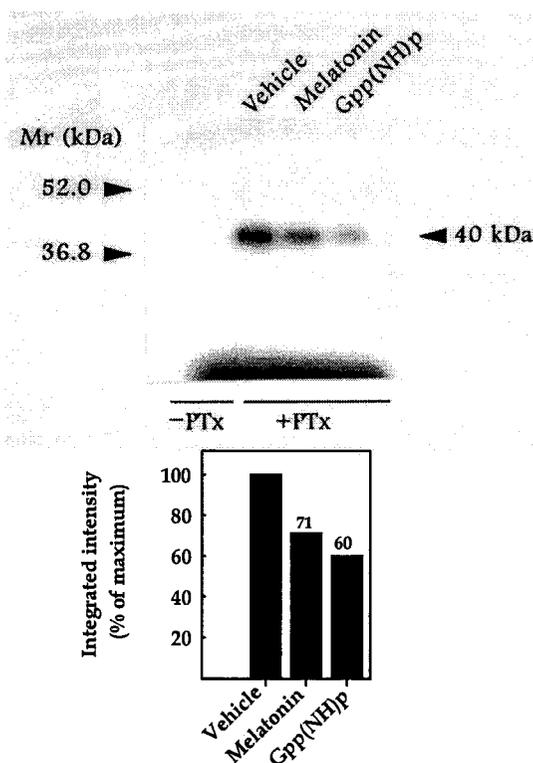
## Resultados

Se estudió a continuación si el efecto de la melatonina sobre producción de los segundos mensajeros estudiados podía estar mediado por proteínas G sensibles a toxina pertúsica. Para ello, se incubaron linfocitos humanos con 2  $\mu\text{g/ml}$  de PTx (+PTx) durante 8 horas a 37°C y a continuación se estudió el efecto de la melatonina sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina (10  $\mu\text{M}$ ). El pretratamiento con PTx bloqueó el efecto inhibitorio de la melatonina (0,1  $\mu\text{M}$ ), que en las membranas preincubadas en ausencia de PTx (-PTx) fue del 20% (Fig. 1.8. De la misma manera, la preincubación de membranas de linfocitos humanos con 15  $\mu\text{g/ml}$  de PTx durante 4 horas a 30°C bloqueó el efecto estimulador de la melatonina (0.1 mM) sobre la producción de DAG (Fig. 27).



**Figura 27. Efecto del pretratamiento con toxina pertúsica sobre la inhibición por la melatonina de la producción de AMPc estimulada por forskolina en linfocitos humanos.** Las células ( $20\text{-}30 \times 10^6$  células/ml) se preincubaron con 2  $\mu\text{g/ml}$  de toxina pertúsica (+PTx) o vehicle (-PTx) durante 8 horas a 37°C. A continuación se estudió la producción de AMPc. C, control; M, melatonina (0,1  $\mu\text{M}$ ); F, forskolina (10  $\mu\text{M}$ ); F/M, forskolina (10  $\mu\text{M}$ ) más melatonina (0,1  $\mu\text{M}$ ). Los valores representan la media de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de la *t* de Student.  $p < 0,001$  vs forskolina.

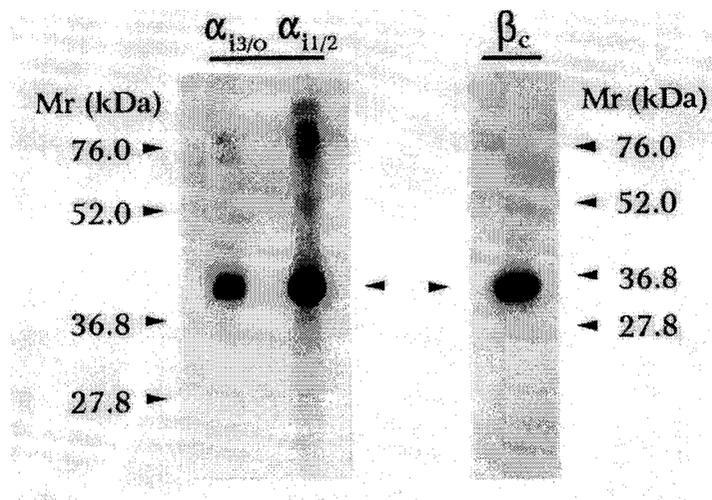
Para estudiar si la unión de la melatonina es capaz de activar a su receptor de membrana, induciendo la disociación de la subunidad  $\alpha$  del heterotrímero, y confirmar que el receptor est  asociado a proteínas G, se preincubaron membranas de linfocitos humanos con melatonina y Gpp(NH)p, como control positivo de la reacción. A continuación se realizó una ADP-ribosilación con PTx (2  $\mu$ g/ml), se observó así una perdida del material ADP-ribosilable respecto del control (Fig. 28).



**Figura 28. Efecto de la preincubación con melatonina sobre la  $[^{32}\text{P}]$ ADP-ribosilación por toxina pertúsica en membranas de linfocitos humanos. Superior:** Las membranas (500  $\mu$ g/ml) se preincubaron con melatonina, Gpp(NH)p o en ausencia de ambos durante 60 min a 15 C, y a continuación fueron incubadas con 2  $\mu$ g/ml de toxina pertúsica y 0,5  $\mu$ M de  $[^{32}\text{P}]$ NAD<sup>+</sup>. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y expuestas a una placa autorradiográfica. Este experimento es representativo de otros tres. **Inferior:** análisis densitométrico.

## Resultados

Todos estos resultados demuestran la asociación del receptor de membrana para melatonina con proteínas G sensibles a toxina pertúsica. Por otra parte, el bloqueo de la acción de la melatonina sobre la producción de AMPc y de DAG sugeriría la implicación de proteínas  $G_i$  y posiblemente  $G_o$ . Sobre la base de estos datos, detectamos la expresión de las subunidades  $\alpha_{i1/2}$ ,  $\alpha_{i3/o}$  y la subunidad  $\beta$  común en membranas de linfocitos humanos mediante anticuerpos específicos dirigidos contra estas subunidades (Fig. 29).



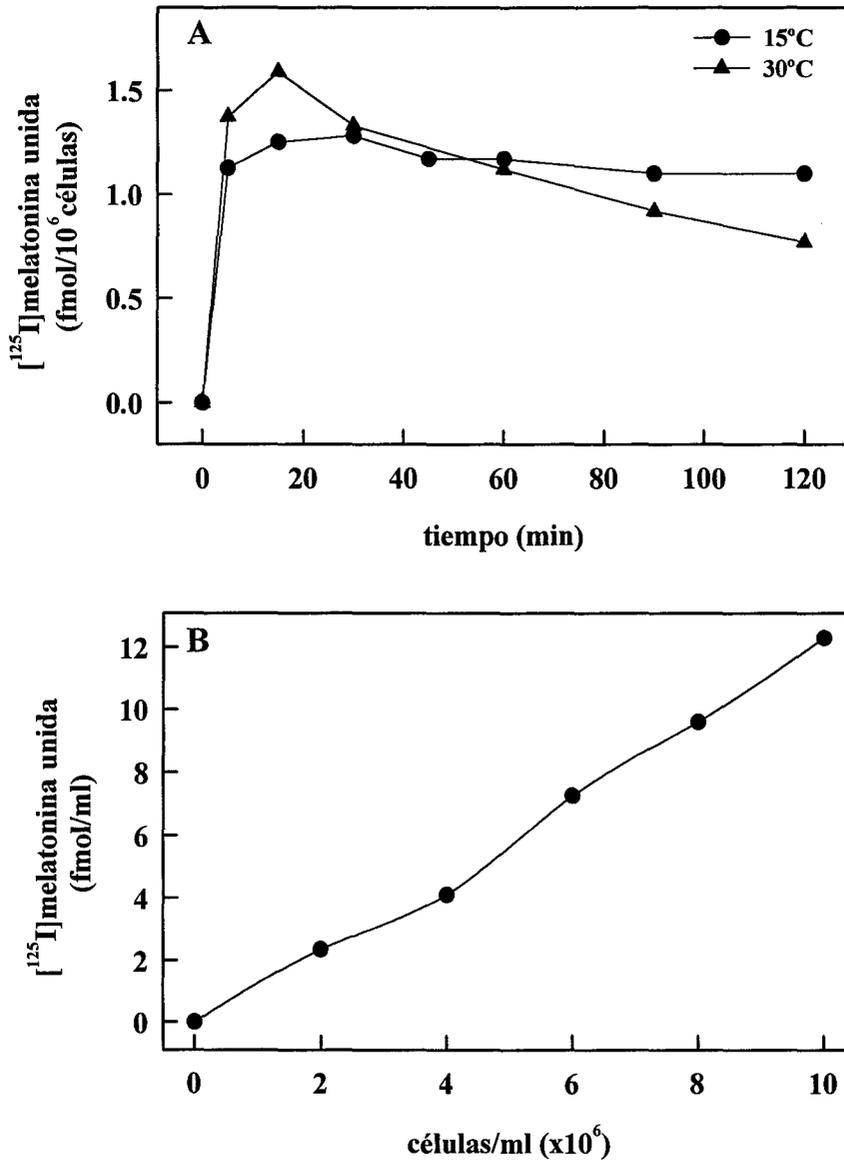
**Figura 29. Análisis por Western blot de las subunidades  $\alpha_{i1/2}$ ,  $\alpha_{i3/o}$  y  $\beta$  común en membranas de linfocitos humanos.** Las membranas fueron separadas por SDS-PAGE al 10 % ( $G\alpha$ ) o al 12% ( $\beta_c$ ), transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos de las subunidades  $\alpha_{i1/2}$ ,  $\alpha_{i3/o}$  y  $\beta$  común.

**2. CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE  
MELATONINA EN MACRÓFAGOS  
PERITONEALES DE RATÓN**

## 2.1. ESTUDIOS CINÉTICOS

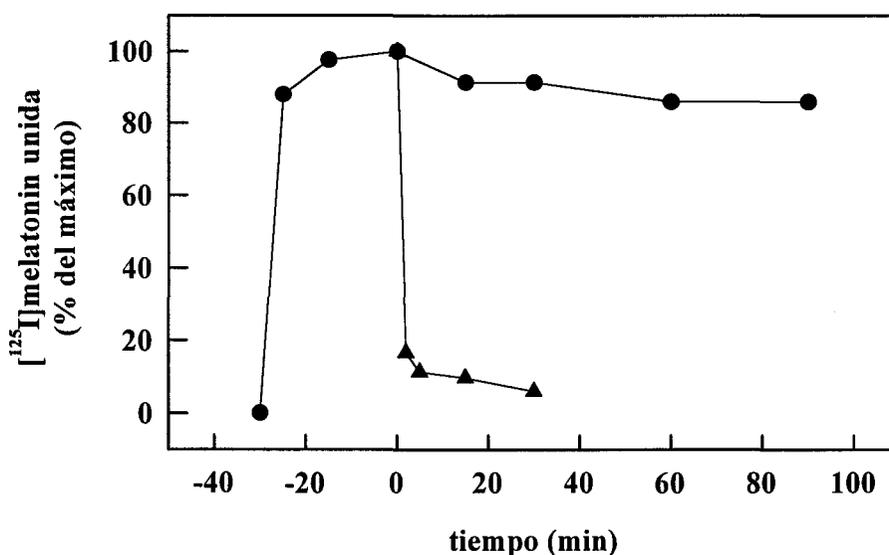
Para llevar a cabo la caracterización de la unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a macrófagos peritoneales de ratón, se estudió en primer lugar la dependencia de la unión respecto al tiempo, temperatura y concentración celular. Se realizaron experimentos de unión a 15 y 30°C, y se determinó la unión específica a diferentes tiempos de incubación (Fig. 30A). Tanto a 30°C como a 15°C la unión específica alcanzó su valor máximo a los 15 min, tras este tiempo de incubación la unión a 30°C disminuyó gradualmente hasta el final del periodo de incubación (120 min), mientras que a 15°C la unión permaneció estable durante un periodo adicional de 90 min. En experimentos de unión con concentraciones celulares crecientes, la unión específica mostró una relación lineal ( $r = 0,99$ ) respecto a la concentración celular (Fig. 30B).

Los resultados muestran que la unión de melatonina a los macrófagos peritoneales de ratón es dependiente de tiempo, temperatura y concentración celular. Así mismo, se establecieron como condiciones óptimas de incubación para posteriores experimentos de unión una temperatura de 15°C, un tiempo de 30 min y una concentración celular de  $6 \times 10^6$  células/ml.



**Figura 30. Efecto del tiempo, temperatura y concentración celular en la unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a macrófagos peritoneales de ratón. A:** Unión de [<sup>125</sup>I]melatonina a los macrófagos a 15 y 10°C. Las células (6 x 10<sup>6</sup> células/ml) se incubaron con [<sup>125</sup>I]melatonina 100 pM a los tiempos indicados. **B:** Unión de [<sup>125</sup>I]melatonina a diferentes concentraciones de macrófagos. Las células (hasta 10 x 10<sup>6</sup> células/ml) se incubaron con [<sup>125</sup>I]melatonina 100 pM a 15°C durante 30 min. En ambos experimentos, cada punto representa la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El error estándar fue siempre inferior al 15% de la media.

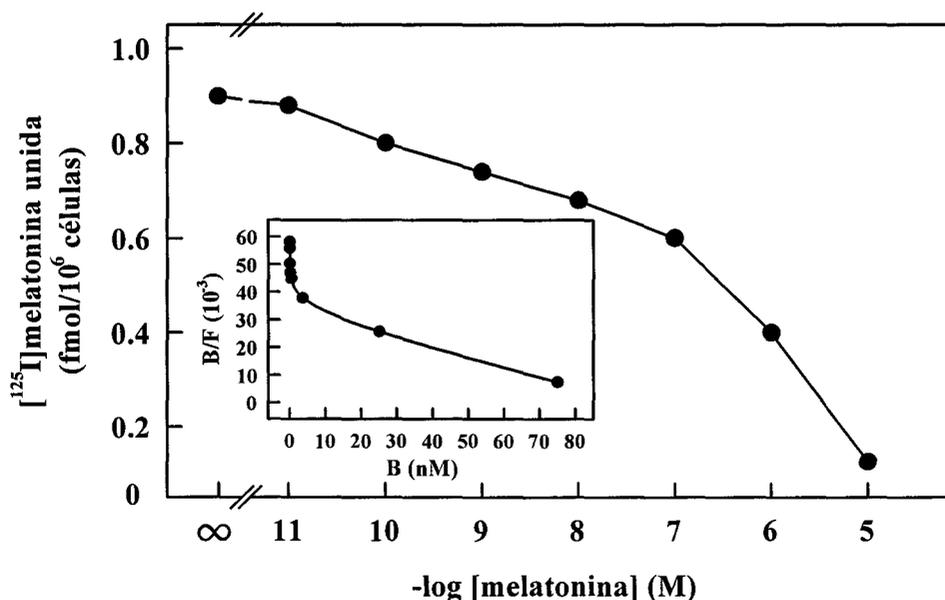
Bajo las condiciones óptimas establecidas, se estudió la cinética de asociación y disociación del radioligando a macrófagos peritoneales de ratón (Fig. 31). La unión de [ $^{125}$ I]melatonina se incrementó durante los primeros 15 min y alcanzó el equilibrio tras 15-30 min de incubación; el valor de la constante de asociación fue  $K_{+1} = 2,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Una vez alcanzado el equilibrio, la unión de [ $^{125}$ I]melatonina a los macrófagos fue reversible. La disociación del complejo formado trazador-membrana se estudió mediante la adición de melatonina  $100 \mu\text{M}$ ; el tiempo medio de disociación fue de 1 min aproximadamente, con una constante de disociación del complejo  $K_{-1} = 0,693 \text{ min}^{-1}$ . El valor de la constante de equilibrio derivado de los estudios cinéticos fue de  $K_d = 0,29 \text{ nM}$ , calculado como el cociente entre las constantes de disociación y asociación ( $K_{-1}/K_{+1}$ ).



**Figura 31. Asociación y disociación de [ $^{125}$ I]melatonina a macrófagos peritoneales de ratón.** Las células ( $6 \times 10^6$  células/ml) se incubaron con [ $^{125}$ I]melatonina  $100 \text{ pM}$  a  $15^\circ\text{C}$  durante los tiempos indicados (●). Tras 30 min de incubación se añadió melatonina fría  $100 \mu\text{M}$ ; se determinó la unión específica de [ $^{125}$ I]melatonina a diferentes tiempos (■), y se expresó como el porcentaje de la unión a tiempo cero (momento en que se añade la melatonina fría).

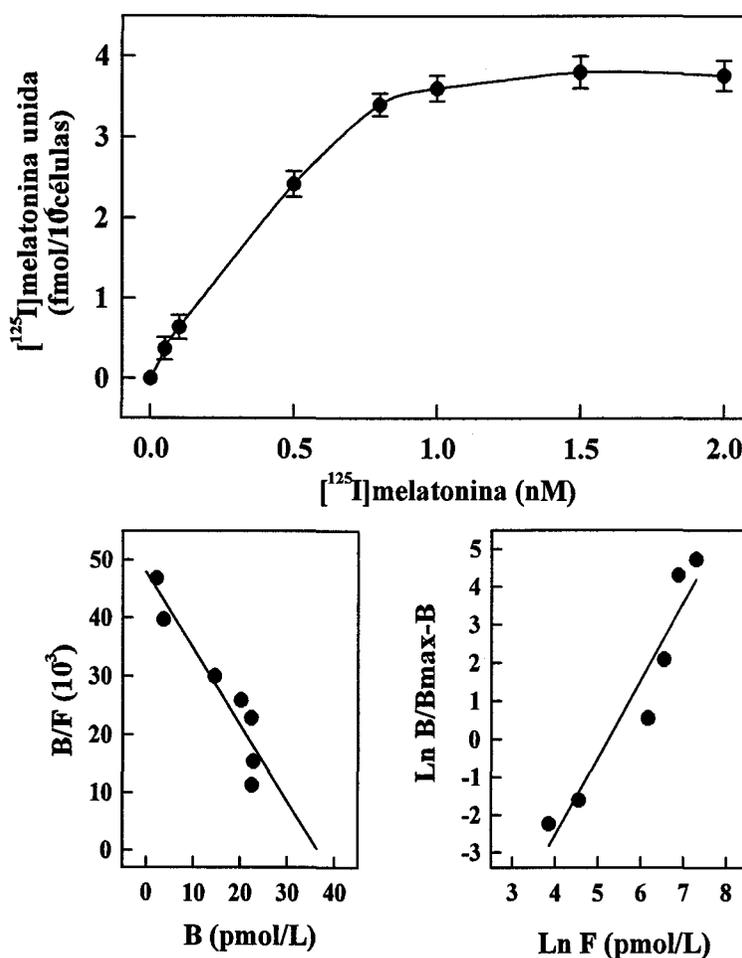
## 2.2. ESTUDIOS ESTEQUIOMÉTRICOS

En estudios de competición, la adición de concentraciones crecientes de melatonina no radioactiva, melatonina fría, se produjo la inhibición competitiva de la unión de [ $^{125}$ I]melatonina a macrófagos peritoneales de ratón (Fig. 32). La concentración de melatonina fría necesaria para producir la inhibición de l 50% del máximo fue  $IC_{50} = 0,47 \mu\text{M}$ . El análisis de Scatchard de estos resultados mostró una curva que puede descomponerse en dos rectas (Fig. 32, inserto), lo que sugiere la presencia de dos sitios diferentes de unión para melatonina, uno de alta afinidad ( $K_d = 0,58 \text{ nM}$ ) y baja capacidad de unión ( $B_{\text{max}} = 64,66 \text{ fmol}/10^7 \text{ células}$ ), y otro de baja afinidad ( $K_d = 2,02 \mu\text{M}$ ) y alta capacidad de unión ( $B_{\text{max}} = 144 \text{ pmol}/10^7 \text{ células}$ ).



**Figura 32. Inhibición competitiva de la unión específica de [ $^{125}$ I]melatonina a macrófagos peritoneales de ratón por melatonina.** Las células ( $6 \times 10^6$  células/ml) se incubaron durante 30 min a  $15^\circ\text{C}$  con [ $^{125}$ I]melatonina 100 pM en presencia de concentraciones crecientes de melatonina fría. Cada punto representa la media de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. El error estándar fue siempre inferior al 15% de la media. **Inserto:** análisis de Scatchard de los datos.

La unión específica de [ $^{125}$ I]melatonina a macrófagos aumentó a medida que se incrementó la concentración del radioligando y se alcanzó la saturación de los sitios de unión a una concentración aproximada de trazador de 0,8 nM (Fig. 33A). El análisis de Scatchard de los datos mostró una única línea recta (Fig. 33B) y valor del coeficiente de Hill fue 0,95 (Fig. 33C). Los resultados indican la presencia de un único sitio de unión de alta afinidad para melatonina, con una  $K_d = 0,71$  nM) y una capacidad de unión  $B_{max} = 58,8$  fmol/ $10^7$  células, así como la ausencia de una unión cooperativa del ligando.



**Figura 33. Saturación de la unión de [ $^{125}$ I]melatonina a macrófagos peritoneales de ratón. A:** Isotherma de saturación de la unión de [ $^{125}$ I]melatonina a los macrófagos. Las células ( $6 \times 10^6$  células/ml) se incubaron con concentraciones crecientes de [ $^{125}$ I]melatonina (hasta 2 nM) durante 30 min a  $15^\circ\text{C}$ . Cada punto representa la media de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **B:** análisis de Scatchard de los datos. **C:** representación de Hill.

### **2.3. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS**

Para la caracterización farmacológica de la unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a macrófagos peritoneales de ratón se realizaron experimentos de unión utilizando melatonina o diferentes metabolitos implicados en la ruta de síntesis de la hormona para competir con el trazador por el sitio de unión, determinándose el valor IC<sub>50</sub> para cada uno de los compuestos. Los resultados mostraron que el sitio de unión para melatonina a los macrófagos es altamente específico para la hormona. Concentraciones crecientes de melatonina inhibieron la unión de [<sup>125</sup>I]melatonina, y el 50% de inhibición se observó a una concentración de melatonina de 0,47 μM. La unión del radioligando fue también desplazada por la 6-hidroximelatonina y la *N*-acetilserotonina cuyos valores de IC<sub>50</sub> fueron de 1,27 y 0,96 μM respectivamente. El resto de los compuestos utilizados no fueron capaces de desplazar al trazador en su unión (Tabla VIII).

Compuestos	IC <sub>50</sub> (μM)
5-Metoxiindoles	
Melatonina	0,47±0.03
6-Hidroximelatonina	1,27±0.19*
Acido 5-Methoxiindol-3-acético	> 100
5-Methoxitriptofol	> 100
5-Methoxi-DL-triptófano	> 100
5-Methoxitriptamina	> 100
5-Hidroxiindoles	
N-Acetilserotonina	0,96±0.01*
Acido 5-Hidroxiindol-3-acético	> 100
5-Hidroxitriptofol	> 100
5-Hidroxitriptamina	> 100
5-Hidroxi-DL-triptófano	> 100
Indoles	
Triptamina	> 100
DL-Triptófano	> 100

**Tabla VIII. Caracterización farmacológica de la unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a macrófagos peritoneales de ratón .** Los macrófagos se incubaron con [<sup>125</sup>I]melatonina 100 pM en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de cada compuesto (hasta 1 mM) a 15°C durante 30 min. El valor de IC<sub>50</sub> corresponde a la concentración del compuesto que es necesaria para inhibir la unión de [<sup>125</sup>I]melatonina en un 50%. Los resultados son la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de la t de Student. Los errores standard fueron siempre inferiores al 15% de la media. \* p<0,01 vs melatonina.

## 2.4. UNIÓN ESPECÍFICA DE MELATONINA A MEMBRANAS

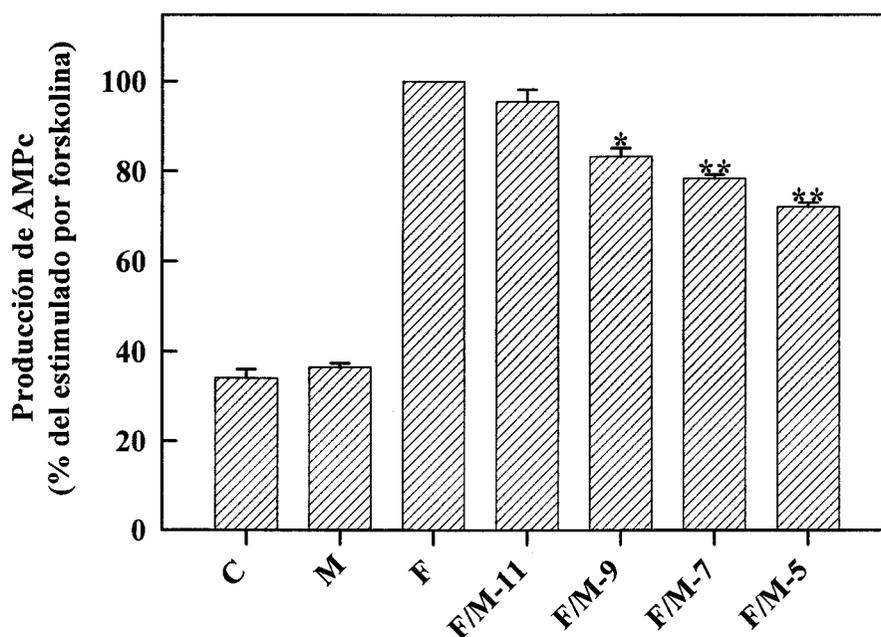
Con el fin de comprobar la existencia de sitios de unión específicos para melatonina en membranas de macrófagos peritoneales de ratón, estudiamos si diferentes análogos de los receptores de melatonina desplazaban la unión de [<sup>125</sup>I]melatonina a las membranas (Tabla IX). La unión del radioligando fue desplazada sólo por los análogos de los receptores de membrana S20098, luzindol y 4-P-PDOT, mientras que el compuesto CGP 52608, análogo de los receptores nucleares de melatonina, no desplazó al trazador.

Compuestos	Unión (%)
control	1,134±0,006
melatonina	0,000
S 20098	0,146±0,045*
luzindol	0,180±0,070*
4-P-PDOT	0,177±0,018*
CGP 52608	1,184±0,165

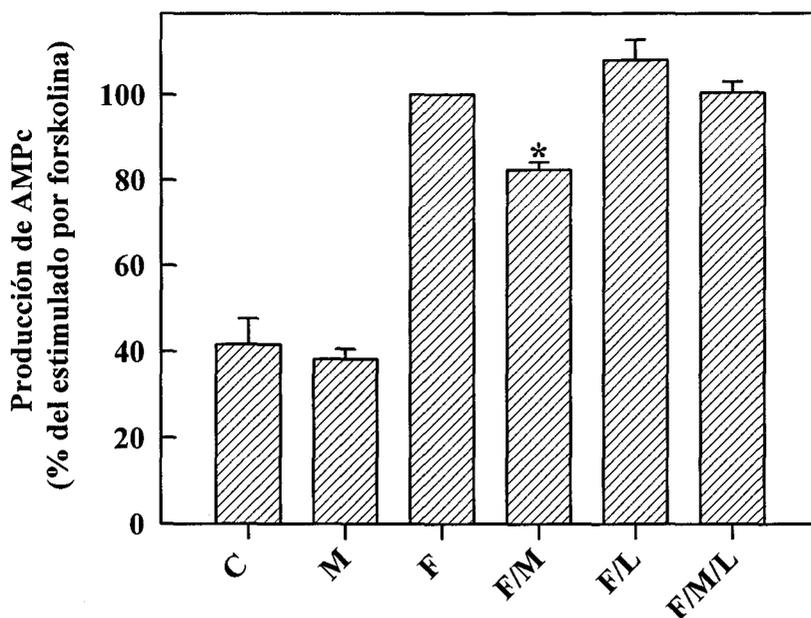
**Tabla IX. Unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a membranas de macrófagos peritoneales de ratón en presencia de diferentes análogos de melatonina.** Las membranas se incubaron con [<sup>125</sup>I]melatonina 100 pM en presencia de 0,1 mM de cada compuesto a 15°C durante 30 min. La Unión (%) se expresa como el tanto por ciento de [<sup>125</sup>I]melatonina unida específicamente a las membranas. Los resultados son la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de ANOVA seguido por el test de Bonferroni. \*p < 0,05 vs control.

## 2.5. PRODUCCIÓN DE AMPc

Con el fin de encontrar una actividad funcional de los sitios de unión para melatonina en macrófagos peritoneales de ratón, se estudió el efecto de la melatonina sobre la producción de AMPc. La melatonina (0,1  $\mu$ M) por si sola no mostró ningún efecto sobre la producción de AMPc (Fig. 34). Sin embargo, al estimular la producción de AMPc con forskolina (10  $\mu$ M), la melatonina fue capaz de inhibir de una forma dosis-dependiente dicha producción, siendo ya significativa a una concentración de melatonina 1 nM (Fig. 34). Además, este efecto inhibitorio de la melatonina sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina fue revertido por el antagonista de los receptores de membrana para melatonina luzindol (100  $\mu$ M), no observándose ningún efecto de luzindol sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina (Fig. 35).



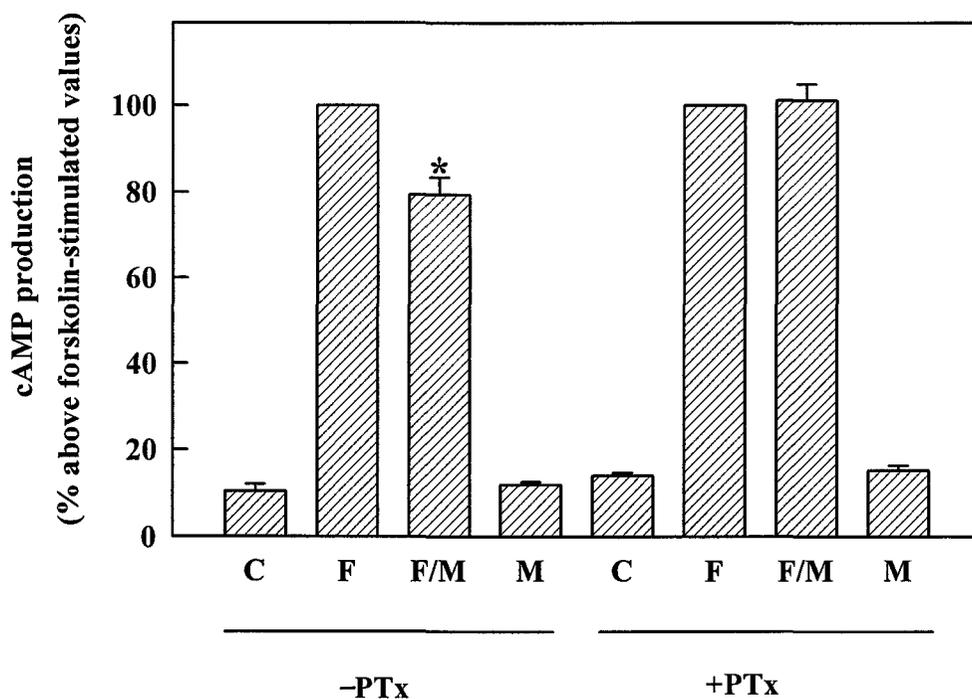
**Figura 34. Dosis-respuesta a melatonina sobre la inhibición de la producción de AMPc estimulada por forskolina en macrófagos peritoneales de ratón.** Las células ( $6 \times 10^6$  células/ml) se incubaron con melatonina, forskolina o ambos compuestos a las concentraciones indicadas durante 30 min a 30°C. C, control; M, melatonina (0,1  $\mu$ M); F, forskolina (10  $\mu$ M); F/M, forskolina (10  $\mu$ M) más melatonina (hasta 10  $\mu$ M). Los valores representan la media de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de ANOVA seguido por el test de Bonferroni. \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$  vs forskolina.



**Figura 35. Efecto del luzindol sobre la inhibición por la melatonina de la producción de AMPc estimulada por forskolina en macrófagos peritoneales de ratón.** Las células ( $6 \times 10^6$  células/ml) se incubaron con los compuestos indicados durante 30 min a  $30^\circ\text{C}$ . C, control; M, melatonina ( $0,1 \mu\text{M}$ ); F, forskolina ( $10 \mu\text{M}$ ); F/M, forskolina ( $10 \mu\text{M}$ ) más melatonina ( $10 \mu\text{M}$ ); F/L, forskolina ( $10 \mu\text{M}$ ) más luzindol ( $100 \mu\text{M}$ ); F/M/L, forskolina ( $10 \mu\text{M}$ ), melatonina ( $10 \mu\text{M}$ ) más luzindol ( $100 \mu\text{M}$ ). Los valores representan la media de dos experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de ANOVA seguido por el test de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs forskolina

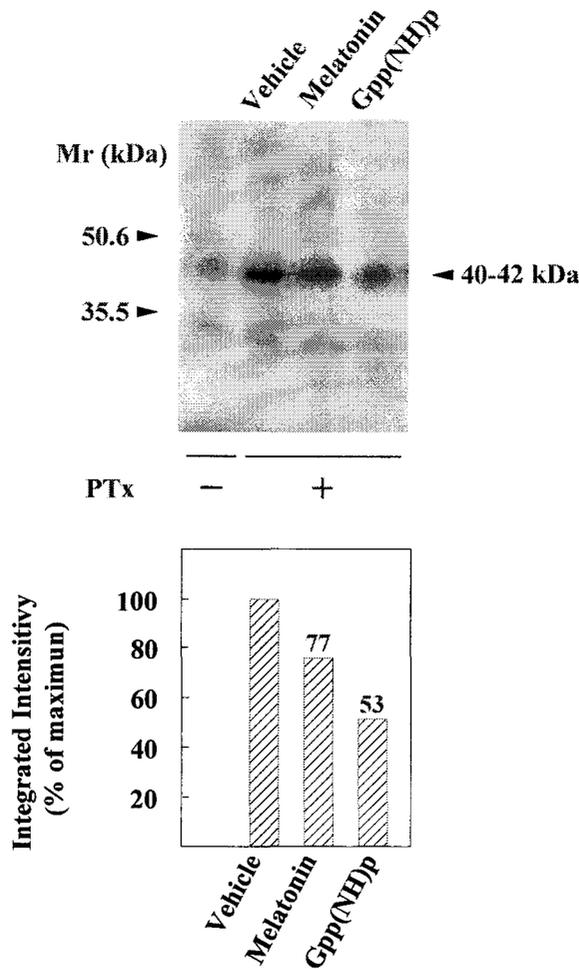
## 2.6. MEDIACIÓN DE PROTEÍNAS G EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DE MELATONINA

La existencia de una asociación del receptor de membrana para melatonina con proteínas G se estudió mediante el pretratamiento de macrófagos peritoneales de ratón con toxina pertúsica. La preincubación de los macrófagos con 1  $\mu\text{g/ml}$  de toxina pertúsica (+PTx) durante 8 h bloqueó la capacidad de la melatonina para inhibir la producción de AMPc estimulada por forskolina, producción que si fue inhibida por la melatonina en macrófagos incubados en ausencia de toxina pertúsica (-PTx) (Fig. 36).



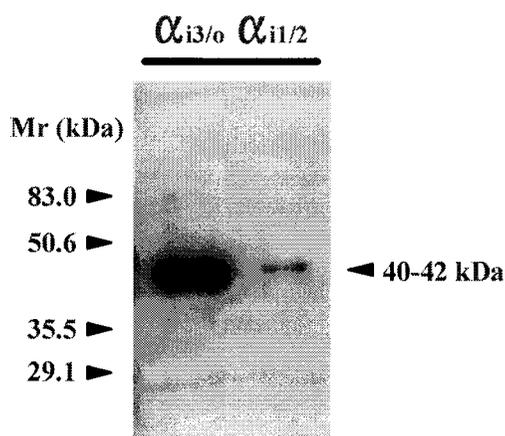
**Figura 36. Efecto del pretratamiento con toxina pertúsica sobre la inhibición por la melatonina de la producción de AMPc estimulada por forskolina en macrófagos peritoneales de ratón.** Las células fueron preincubadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de toxina pertúsica (+PTx) o en ausencia de esta (-PTx) durante 8 horas a 37°C. A continuación se estudió la producción de AMPc. C, control; M, melatonina (0,1  $\mu\text{M}$ ); F, forskolina (10  $\mu\text{M}$ ); F/M, forskolina (10  $\mu\text{M}$ ) más melatonina (0,1  $\mu\text{M}$ ). Los valores representan la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística se determinó por el test de ANOVA seguido por el test e Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs forskolina.

Por otra parte, la preincubación de membranas de macrófagos peritoneales de ratón con melatonina y la posterior incubación con toxina pertúsica mostró una disminución del material ADP-ribosilable respecto a membranas preincubadas en ausencia de melatonina, en las que se observó un material ADP-ribosilado de 40-42 kDa (Fig. 37).



**Figura 37. Efecto de la preincubación con melatonina sobre la  $[^{32}\text{P}]$ ADP-ribosilación por toxina pertúsica en membranas de macrófagos peritoneales de ratón. Superior:** Las membranas (500  $\mu\text{g/ml}$ ) se preincubaron con melatonina, Gpp(NH)p o en ausencia de ambos (vehicle) durante 30 min a  $15^\circ\text{C}$ , y a continuación fueron incubadas con 3  $\mu\text{g}$  de toxina pertúsica y 0.7  $\mu\text{M}$  de  $[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ . Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y expuestas a una placa autoradiográfica. Este experimento es representativo de otros tres. **Inferior:** análisis densitométrico.

Estos resultados demuestran que la melatonina se une a un receptor de membrana, el cual está acoplado a la inhibición de la producción de AMPc estimulada por forskolina, posiblemente a través de proteínas G de la familia  $G_i$ . Así, se detectó la expresión en membranas de macrófagos peritoneales de ratón de las subunidades  $\alpha_{i1/2}$  y  $\alpha_{i3/0}$  de las proteínas G (Fig. 38).



**Figura 38.** Análisis por Western blot de las subunidades  $\alpha_{i1/2}$  y  $\alpha_{i3/0}$  en membranas de macrófagos peritoneales de ratón. Las membranas fueron separadas por SDS-PAGE al 12 % (G $\alpha$ ), transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos de las subunidades  $\alpha_{i1/2}$  y  $\alpha_{i3/0}$ .

## **DISCUSIÓN**

---

Dentro de los mecanismos homeostáticos que regulan y mantienen los procesos fisiológicos, la integración entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune tiene en la actualidad una importancia reconocida y creciente. Los sistemas neuroendocrino e inmune se encuentran comunicados de una manera bidireccional; neuropéptidos y neurohormonas modulan la función inmune y, a su vez, compuestos liberados por células inmunocompetentes modifican la actividad neuroendocrina. Esta regulación bidireccional permite sugerir la existencia de un sistema neuroinmunoendocrino que regula diferentes procesos fisiológicos (Blalock y Smith, 1985).

La melatonina es considerada como una neurohormona de secreción rítmica capaz de regular múltiples funciones fisiológicas. Así, se ha encontrado que la melatonina puede regular un gran número de procesos en casi todos los sistemas, entre los que se encuentran el propio sistema endocrino, el sistema nervioso central y el sistema inmune. No obstante, muchas de estas acciones tienen lugar a concentraciones farmacológicas o son difíciles de explicar en términos fisiológicos.

Desde principios del siglo XX se sospechaba la relación de la glándula pineal con el sistema inmune, la mayoría de los trabajos señalaban cómo la ausencia de la glándula pineal estaba relacionada con la involución y la desorganización histológica del timo. Sin embargo, no ha sido hasta mediados de los años ochenta y gracias principalmente a los trabajos de Maestroni y cols cuando se ha empezado a acumular resultados que indican un papel inmunomodulador de la melatonina. De esta forma, hoy en día es reconocida y aceptada la importante función inmunomoduladora ejercida por la melatonina.

Unos de los primeros experimentos que evidenciaron un efecto estimulador de la hormona sobre el sistema inmune fue el desarrollado en 1981 por Maestroni y Pierpaoli. Estos autores demostraron cómo la eliminación de la melatonina nocturna circulante por exposición a luz constante reducía la celularidad tímica y esplénica a la vez que deprimía la respuesta a antígenos reconocidos por los linfocitos T, así como, recuperaba la atrofia de bazo y timo. Por otra parte, la administración de melatonina es capaz de contrarrestar los efectos inmunodepresores del estrés aumentando las respuestas inmunes primarias y secundarias a antígenos y la respuesta de células T citotóxicas a virus.

Los mecanismos implicados en el efecto inmunoestimulador de la glándula pineal, y la melatonina, no están bien establecidos. Sin embargo, diferentes estudios sugieren que la melatonina estimula tanto la liberación de péptidos opioides, que median en la respuesta inmune, como la liberación de diferentes interleuquinas, así como, incrementa la actividad de las células inmune. En

este sentido, se ha demostrado que la melatonina incrementa la presentación de antígenos por macrófagos a células T y la producción de IL-1 y TNF $\alpha$  (Pioli et al., 1993), aumenta la citotoxicidad y la producción de IL-1 en monocitos humanos (Morrey et al., 1994) y estimula la producción de IL-2, IL-6 y IFN $\gamma$  en células CD4<sup>+</sup> circulantes humanas (García-Mauriño et al., 1997).

La aparición de la [<sup>125</sup>I] melatonina como un ligando de alta afinidad y alta especificidad ha permitido establecer diferentes mecanismos a través de los cuales la melatonina puede actuar. Así, se han caracterizado receptores específicos de alta y baja afinidad para melatonina en membranas plasmáticas celulares y receptores nucleares para melatonina. La melatonina también se puede unir a proteínas reguladoras citoplasmáticas, como la calmodulina. Y, finalmente, la melatonina puede funcionar por ella misma como agente neutralizador de radicales libres.

El efecto de la melatonina sobre el sistema inmune se ve apoyado por la existencia de sitios de unión específicos para melatonina en células linfoides (Calvo et al., 1995). Se han descrito receptores de membrana para melatonina en tejidos linfoides de varias especies, como linfocitos, monocitos y granulocitos humanos, timo y bazo de rata, y en timo y bazo de diferentes aves. En aves y roedores los sitios de unión presentan una alta afinidad por la melatonina, con unos valores de la constante de disociación  $K_d$  que oscilan entre 10 y 100 pM. En humanos, los valores de  $K_d$  para los sitios de alta afinidad descritos oscilan alrededor de 1 nM. Los valores de la constante de disociación de estos sitios de unión de alta afinidad para la melatonina permitirían a los receptores reconocer concentraciones fisiológicas de la hormona en la sangre y ejercer una determinada acción específica sobre la función de las células inmunes. La existencia de una posible función de la melatonina sobre las células inmunes se ve reforzada por la demostración de la expresión de ARNm del receptor de membrana para melatonina Mel<sub>1a</sub> en timo y bazo de rata (Pozo et al., 1997).

Estudios recientes han demostrado que la melatonina puede ejercer una función sobre el sistema inmune mediante su interacción con receptores nucleares de la hormona en células inmunes. Se ha descrito cómo la melatonina inhibe la expresión de la enzima 5-lípooxigenasa en linfocitos humanos (Steinhilber et al., 1995) y como la melatonina actuando posiblemente a través de su interacción con los receptores nucleares estimula la producción de IL-2 e IL-6 (García-Mauriño et al., 1997). Se ha descrito también la unión de melatonina a fracciones nucleares purificadas de esplenocitos y timocitos de rata (Raffi-El-Idrissi et al, 1998).

La existencia de receptores de membrana para melatonina se ve reforzada por el estudio de los mecanismos de transducción de señal de los receptores de melatonina. Los conocimientos actuales

sobre las bases moleculares de los posibles mecanismos de acción, sistema receptor-efector, de la melatonina son escasos y se centran fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central de diferentes especies. Sin embargo, a nivel de sistema inmune, son pocos los conocimientos que se tienen acerca del mecanismo de acción de la melatonina.

Siguiendo la línea de trabajo desarrollada por nuestro grupo, la finalidad de este trabajo de investigación ha sido la de profundizar en el conocimiento de la función fisiológica que ejerce la melatonina sobre el sistema inmune, centrándonos en su acción directa sobre células inmunes mediante la caracterización de receptores de membranas para melatonina y del estudio de los posibles mecanismos de transducción de señal.

## **Transducción de señal de receptor de membrana para melatonina en linfocitos humanos.**

Partiendo del trabajo realizado en nuestro laboratorio en el que se llevó a cabo la caracterización de receptores para melatonina en linfocitos humanos (López-González et al., 1992a), en este trabajo hemos estudiado el mecanismo de transducción de señal para el receptor de membrana para melatonina en dichas células inmunes.

En primer lugar estudiamos la existencia de sitios de unión de alta afinidad para melatonina en membranas de linfocitos humanos. La interpretación por el análisis de Scatchard de los datos obtenidos en experimentos de saturación, en los que se estudiaba la unión de concentraciones crecientes de [<sup>125</sup>I]melatonina mostró la existencia de un único sitio de unión de alta afinidad, con una constante de disociación  $K_d$  de 0,45 nM y una capacidad de unión de 7,8 fmol/mg de proteína. La afinidad de este sitio de unión en las membranas de los linfocitos concuerda con los descritos previamente en linfocitos (López-González et al., 1992a) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (González-Haba et al., 1995) humanos, timo y bazo de rata (López-González et al., 1993a; Raffi-El-Idrissi et al., 1995), bazo de hamster (Niles, 1989) y linfocitos Th2 de médula ósea de ratón (Maestroni, 1995). Sin embargo, estos valores de  $K_d$  contrastan con los encontrados en bazo de pollo y paloma, timo de pato y bolsa de Fabricio de pájaros (Poon et al., 1994). Estas discrepancias en los valores de  $K_d$  observadas pueden deberse a diferentes condiciones de ensayo, la utilización de un intervalo de concentraciones de radioligando. Por otra parte, es importante resaltar que el valor de  $K_d$  obtenido en membranas de linfocitos humanos es similar a las concentraciones sanguíneas de melatonina durante la noche (200 pM) en humanos (Brzezinski, 1997), lo que posiblemente permita a estos receptores de alta afinidad unir la melatonina circulante, sugiriendo un papel fisiológico para la hormona en estas células inmunes.

Nuestros resultados proporcionan varias evidencias que sugieren que los receptores de membranas para melatonina en linfocitos humanos están asociados a proteínas G. En primer lugar, la interacción de la melatonina con las membranas de linfocitos humanos fue sensible a nucleótidos de guanina. La unión de [<sup>125</sup>I]melatonina fue inhibida por GTP y su análogo no hidrolizable Gpp(NH)p, y no se vio afectada por otros nucleótidos, como ATP, CTP o UTP. En segundo lugar, los estudios de saturación realizados en presencia de Gpp(NH)p mostraron un incremento en el valor de  $K_d$  tres veces superior al obtenido en ausencia de éste, mientras que, el valor de la capacidad de unión no se vio claramente reducido. El aumento en el valor de la  $K_d$  indica una pérdida de afinidad del

receptor por la melatonina, este cambio en la afinidad puede ser explicado por el hecho de que el Gpp(NH)p induce una conversión en el estado de afinidad de los receptores, pasando de un estado de alta afinidad a otro de menor afinidad. Está bien establecido como los receptores acoplados a proteínas G, que presentan un estado inicial de alta afinidad, una vez activados por la unión de un agonista inducen la disociación de la proteínas G, pasando el receptor a un estado de menor afinidad (Hepler y Gilman, 1992).

Tanto la inhibición de la unión de melatonina como el incremento en los valores de  $K_d$  por la presencia de nucleótidos de guanina ha sido descrita en distintos tejidos de diferentes especies, como la eminencia media de hámster (Carlson et al., 1989), SCN y área postrema de rata (Laitinen y Saavedra, 1990; Laitinen et al., 1990), cerebro de pollo y cordero (Morgan et al., 1996), así como bazo y bolsa de Fabricio de pollo (Poon y Pang, 1994).

Hemos estudiado también la posibilidad de que los receptores de membrana para melatonina en linfocitos humanos estuviera acoplada a un mecanismo de transducción de señal por segundos mensajeros. En este contexto hemos demostrado como la melatonina es capaz de inhibir la producción AMPc estimulada por forskolina en linfocitos humanos, y de estimular la producción de DAG en membranas de linfocitos humanos. Ambos efectos fueron dependientes de la dosis y fueron significativos a concentraciones de melatonina de 1 nM, concentración que satura los receptores para melatonina descritos anteriormente.

La inhibición de la producción de AMPc por la melatonina ha sido descrita con anterioridad por otros autores en diferente tejidos, como cerebro de hámster (Carlson et al., 1989), pars tuberalis de cordero (Morgan et al., 1990), cerebro de pollo (Niles et al., 1991) y arterias de rata (Capsoni et al., 1994). Mucho menos se conoce acerca sobre el efecto de la melatonina sobre otros segundos mensajeros. La estimulación mediada por receptores de melatonina sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos sólo ha sido descrita en células de melanoma de hámster (Eison y Mullins, 1993), cerebro de paloma (Mullins y Eison, 1994) y cerebro de pollo (Popova y Dubocovich, 1995).

Estudios realizados en tejido cerebral de diferentes especies han mostrado que el receptor de melatonina está acoplado a la adenilil ciclasa, inhibiendo su actividad, por medio de proteínas G sensibles a toxina pertúsica (Carlson et al., 1989; Morgan et al., 1990; Niles et al., 1991). Para ver si la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa inducida por la activación del receptor de membrana podía estar mediada por proteínas G asociadas a dicho receptor, pretratamos los linfocitos humanos con PTx y se observó como ésta bloqueaba la inhibición de la producción de AMPc estimulada por

forskolina inducida por la melatonina. De igual forma, el pretratamiento de membranas de linfocitos humanos con PTx bloqueó la estimulación por melatonina de la producción de DAG y disminuyó la unión específica de [<sup>125</sup>I]melatonina a las membranas.

Por otra parte, la preincubación de las membranas con melatonina y su posterior incubación con PTx mostró una pérdida de material ADP-ribosilable por la toxina de un peso molecular aproximado de 40 kDa; la ADP-ribosilación por PTx de las proteínas G sólo puede realizarse cuando la proteína se encuentra inactivada formando parte del heterotrímero (Birnbaumer y Brown, 1990; Hepler y Gilman, 1992), de manera que al activarse el receptor por la unión del ligando la subunidad  $\alpha$  se disocia del heterotrímero, lo que impide la ADP-ribosilación por la toxina.

Se sabe que la inhibición de la actividad adenilil ciclasa está mediada por proteínas G<sub>i</sub> sensibles a toxina pertúsica, asimismo, la estimulación de la actividad PLC puede ser llevada a cabo tanto por proteínas G insensibles (G<sub>q</sub>, G<sub>11</sub>, G<sub>14</sub> y G<sub>16</sub>) como sensibles (G<sub>o</sub>) a PTx, así como por complejos  $\beta\gamma$  de proteínas G<sub>i</sub> y G<sub>o</sub> activadas. En este sentido, los estudios por *Western blot* mostraron la presencia de subunidades  $\alpha$  de las proteínas G<sub>i</sub> y G<sub>o</sub>, y de los complejos  $\beta\gamma$  en las membranas de los linfocitos humanos.

El bloqueo observado por el pretratamiento con PTx de la capacidad de la melatonina tanto para inhibir la producción de AMPc estimulada por forskolina como para estimular la producción de DAG, puede explicarse por el posible acoplamiento del receptor de membrana para melatonina a una única proteína G<sub>i</sub>, o bien a una proteína G<sub>i</sub> y una proteína G<sub>o</sub> conjuntamente. De manera que la subunidad  $\alpha$  de la proteína G<sub>i</sub> inhibiría la actividad adenilil ciclasa, mientras que el complejo  $\beta\gamma$  liberado por la activación de G<sub>i</sub>, G<sub>o</sub>, o de ambos, estimularía la actividad PLC. Resultados similares se han encontrado en la línea celular NIH3T3 que expresan el receptor Mel<sub>1a</sub> humano (Godson y Reppert, 1997), en donde la melatonina por un lado inhibe la producción de AMPc estimulada por forskolina y por otro potencia la actividad PLC estimulada por PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ; ambos mecanismos fueron sensibles a PTx. Por otra parte, la activación de múltiples vías de transducción de señal por una misma clase de receptor ha sido demostrada en otros sistemas (Offermans y Simon, 1996).

Todos estos resultados indican la existencia de un mecanismo de transducción de señal para melatonina en linfocitos humanos, mediado por receptores de membrana de alta afinidad y sensible a toxina pertúsica, el cual está acoplado a la inhibición de la actividad adenilil ciclasa y a la estimulación de la actividad PLC.

## **Caracterización de receptores de melatonina en macrófagos peritoneales de ratón**

El estudio de la existencia de receptores funcionales para melatonina es uno de los pasos esenciales para dilucidar los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la melatonina lleva a cabo sus diversas funciones biológicas. En este trabajo se ha realizado la caracterización de receptores de membrana para melatonina en macrófagos peritoneales de ratón, asimismo, se ha estudiado la funcionalidad de estos receptores para llevar a cabo la transducción de señal de la hormona por segundos mensajeros, centrándonos en su efecto sobre la producción de AMPc.

La unión de [<sup>125</sup>I] melatonina a los macrófagos peritoneales de ratón cumplió todos los requisitos de la interacción de un ligando con su receptor: fue dependiente de tiempo, temperatura y concentración celular, estable, reversible, saturable y específica.

Los estudios de competición se realizaron utilizando concentraciones crecientes de melatonina no radioactiva. La interpretación de los datos mediante el análisis de Scatchard (1949) mostró la presencia de dos sitios de unión de diferente afinidad (0,58 nM y 2,02 μM) por la melatonina en macrófagos peritoneales de ratón. Sin embargo, los estudios de saturación utilizando concentraciones crecientes de [<sup>125</sup>I]melatonina indicaron la existencia de un solo sitio de unión; el valor del coeficiente de Hill ( $n = 0,95$ ) indica una interacción no cooperativa del radioligando con un tipo de receptor simple a través de una reacción molécula a molécula simple y reversible. La afinidad de este sitio de unión ( $K_d = 0,71$  nM) es muy similar a la del sitio de unión de alta afinidad descrito en los estudios de competición, así como a la encontrada en los estudios cinéticos ( $K_d = 0,29$  nM). El uso de concentraciones menores de melatonina radioactiva en los estudios de saturación y cinéticos (100 pM) que en los de melatonina no marcada utilizada en los estudios de competición (hasta 10 μM) podría explicar esta aparente discrepancia en el número de sitios de unión.

La afinidad ( $K_d = 0,58-0,71$  nM) de este sitio de unión encontrado en los macrófagos peritoneales de ratón está en el mismo rango que las descritas en células mononucleares totales de sangre periférica (López-González et al., 1992a) y linfocitos circulantes T CD4<sup>+</sup> (González-Haba et al., 1995) humanos, timo y bazo de rata (López-González et al., 1993a; Raffi-El-Idrissi et al., 1995), bazo de hámster (Niles, 1989) y linfocitos Th2 de médula ósea de ratón (Maestroni, 1995); y es de 5 a 10 veces menores a las descritas en bazo de pollo y paloma, timo de pato y bolsa de Fabricio de pájaros (Poon et al., 1994). Los receptores de melatonina descritos en tejidos cerebrales como la

eminencia media (Vanecek, 1988a), *pars tuberalis* (Weaver et al, 1989), SCN (Laitinen y Saavedra, 1990) o área postrema (Laitinen et al., 1990) presentan afinidades de 10 a 50 veces superiores a las descritas en los tejidos y células del sistema inmune. Receptores para otras hormonas también presentan distintos valores en sus constantes de afinidad dependiendo del tejido o la especie estudiada (Calvo et al., 1995).

Es importante destacar que el sitio de unión de alta afinidad por la melatonina descrito en los macrófagos peritoneales de ratón presenta un valor de  $K_d$  muy similar a las concentraciones séricas de la hormona encontradas en ratones adultos (Maestroni, 1996) de forma que el receptor podría reconocer a la melatonina circulante, y permitiría a ésta modular determinadas funciones fisiológicas de los macrófagos.

La caracterización farmacológica de este sitio de unión para melatonina indicó que únicamente la 6-hidroximelatonina y la *N*-acetilserotonina se aproximaron a la melatonina en cuanto a su eficacia para desplazar la unión de [ $^{125}$ I]melatonina unida a los macrófagos; ortos indoles como los 5-hidroxi- y 5-metoxiindoles no fueron eficaces (Tabla VIII). Estos resultados concuerdan con los descritos por nuestro grupo de investigación (López-González et al., 1993a; González-Haba et al., 1995; Raffi-El-Idrissi, 1995) y otros autores (Vanecek, 1988; Laitinen et al., 1990), en órganos pertenecientes o no al sistema inmune.

La existencia de receptores de membrana específicos para melatonina en los macrófagos fue puesta de manifiesto mediante estudios de unión de [ $^{125}$ I]melatonina a membranas de macrófagos; la unión fue inhibida sólo por los análogos específicos de los receptores de membrana luzindol, 4-P-PDOT y S 20098, mientras que el análogo CGP 52608, específico para receptores nucleares no fue efectivo. Estos resultados sugieren la presencia de sitios de unión específicos de melatonina nivel de membrana, aunque no podemos descartar la posible existencia de otros receptores de melatonina a nivel citoplasmático o nuclear.

Con el fin de demostrar un papel funcional de la melatonina en los macrófagos peritoneales de ratón, estudiamos el efecto de la melatonina sobre la producción de AMPc. La melatonina fue capaz de inhibir la estimulación de la producción de AMPc estimulada por forskolina, por el contrario no mostró ningún efecto sobre la producción basal. El efecto inhibitorio fue dependiente de la dosis y fue eficaz a concentraciones de melatonina en el rango de nanomolar y superiores. La inhibición de la producción de AMPc por la melatonina ha sido descrita con anterioridad por otros autores en diferente tejidos, como cerebro de hámster (Carlson et al., 1989), *pars tuberalis* de cordero (Morgan et al.,

1990), cerebro de pollo (Niles et al., 1991) y arterias de rata (Capsoni et al., 1994). Además, este efecto inhibitorio de la melatonina mostró estar mediado por receptores de membrana específicos, ya que el luzindol, antagonista específico de receptores de membrana (Dubocovich, 1995), bloqueó la inhibición ejercida por la melatonina sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina, lo que ha sido previamente descrito (Iuvone y Gan, 1994).

La inhibición de la actividad adenilil ciclasa se sabe que puede ser realizada por la activación de proteínas  $G_i$  sensibles a toxina pertúsica asociadas a receptores de membranas. El pretratamiento de los macrófagos con toxina pertúsica bloqueó el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la producción de AMPc, lo que sugiere que el receptor de membrana para melatonina en los macrófagos peritoneales de ratón está acoplado a la adenilil ciclasa por medio de proteínas G sensibles a toxina pertúsica, posiblemente perteneciente a la familia de las proteínas  $G_i$ , lo que ha sido previamente descrito por varios autores en diversos tejidos (Carlson et al., 1989; Morgan et al., 1990; Niles et al., 1991).

El acoplamiento del receptor de melatonina a proteínas  $G_i$  se ve apoyado por el hecho de que la ADP-ribosilación por toxina pertúsica mostró la presencia en las membranas de los macrófagos de un material ADP-ribosilable de un peso molecular aproximado de 40-42 kDa, el cual disminuyó al preincubar las membranas con melatonina; la toxina pertúsica sólo puede ADP-ribosilar a la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G si ésta se encuentra asociada al complejo  $\beta\gamma$  para formar el heterotrímero, de manera que la unión del ligando al receptor activa la proteína G disociándose la subunidad  $\alpha$ , la cual no puede ser ADP-ribosilada (Birnbaumer y Brown, 1990; Hepler y Gilman, 1992). De igual manera, se comprobó la expresión de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas  $G_i$ , mediante la incubación de las membranas de macrófagos con anticuerpos específicos contra diversas subunidades  $\alpha_i$ .

En este trabajo se demuestra por primera vez la presencia de receptores de alta afinidad para melatonina en macrófagos peritoneales de ratón, afinidad que la permitiría reconocer concentraciones fisiológicas de melatonina en suero, pidiendo así la hormona jugar un papel fisiológico en la función de los macrófagos. El receptor de membrana está acoplado a un mecanismo de transducción de señal que implica la inhibición de la actividad adenilil ciclasa a través de proteínas G sensibles a toxina pertúsica, posiblemente por subunidades  $\alpha$  pertenecientes a la familia  $G_i$ .

Son muchas las funciones que de los macrófagos que se sabe están mediadas por agentes que modulan los niveles intracelulares de AMPc, como son la fagocitosis (Ichinose y Sawada, 1996), la citotoxicidad (Schultz et al., 1978) y la adhesión (Yeaman y Rapraeger, 1993). En base a estos datos,

nuestros resultados sugieren que la melatonina podría jugar un importante papel en la regulación de la función inmune no sólo actuando sobre la función linfocítica (Maestroni, 1995, García-Mauriño et al., 1997), sino también modulando la función macrofágica.

La existencia de receptores de melatonina y los efectos de la hormona sobre el sistema inmune han sido descritos mayoritariamente en células linfoides, las cuales forman parte de sistema inmune específico. Sin embargo son pocos los trabajos realizados en células del sistema inmune natural. En este trabajo se muestra por primera vez una interacción directa entre la melatonina y los macrófagos, células pertenecientes al sistema inmunológico natural. En este sentido se ha descrito cómo la melatonina a concentraciones fisiológicas estimula la actividad e células monocíticas humanas al incrementar la citotoxicidad, la producción de moléculas reactivas del metabolismo del oxígeno y la producción de IL-1, así como incrementa la sensibilidad de los monocitos a la estimulación con lipopolisacáridos (Morrey et al., 1994). Se ha observado también la estimulación por melatonina de la producción de IL-6 en células mononucleares circulantes humanas, cuya producción se ha relacionado con la presencia de monocitos (García-Mauriño et al., 1997).

## **CONCLUSIONES**

---

Del trabajo experimental desarrollado y una vez discutidos los resultados se extraen las siguientes conclusiones:

**A. Transducción de señal para melatonina en linfocitos humanos**

1. Los linfocitos presenta en su membrana sitios de unión de alta afinidad para melatonina. La constante de disociación ( $K_d = 0,45 \text{ nM}$ ) de este sitio de unión similar a las concentraciones fisiológicas de melatonina le confiere a este receptor un posible papel funcional.

2. El receptor de membrana para melatonina está acoplado funcionalmente a los sistemas efectores por segundos mensajeros adenilil ciclasa y fosfolipasa C, inhibiendo la producción de AMP cíclico y estimulando la producción de diacilglicerol.

3. El mecanismo de transducción de señal de melatonina está mediado por proteínas G acopladas al receptor de membrana. Dicho receptor estaría acoplado a una ( $G\alpha_i$ ) o dos ( $G\alpha_i/G\alpha_o$ ) proteínas G.

**B. Caracterización de receptores para melatonina en macrófagos peritoneales de ratón.**

4. La unión de melatonina a macrófagos peritoneales de ratón cumple todos los criterios de unión de un ligando a su receptor, es un proceso dependiente de tiempo, temperatura y concentración celular, estable, reversible, saturable y específica.

5. Los macrófagos presentan dos sitios de unión para melatonina, uno con alta afinidad ( $K_d = 0,58-0,71 \text{ nM}$ ) y baja capacidad de unión ( $B_{\max} = 64,66 \text{ fmol}/10^7 \text{ células}$ ), y otro con baja afinidad ( $K_d = 2,2 \text{ }\mu\text{M}$ ) y alta capacidad de unión ( $B_{\max} = 144 \text{ pmol}/10^7 \text{ células}$ ). El valor de la constante de disociación del sitio de alta afinidad se aproxima a las concentraciones fisiológicas de melatonina lo que sugiere un papel funcional de la melatonina en el sistema inmune.

6. Los macrófagos presentan receptores de membrana acoplados funcionalmente al sistema efector adenilil ciclasa, inhibiendo la producción de AMP cíclico.

7. El receptor de membrana para melatonina esta acoplado a la adenilil ciclasa mediante una proteína G, posiblemente una  $G\alpha_i$ .

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Abe, M., Reiter, R.J., Orhii, P.H., Hara, M., Poeggeler, B. and Barlow-Walden, L.R. (1994)** Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: evidence of an antioxidative role of melatonin. *J. Pineal. Res.* 17, 94-100.
- Acuña-Castroviejo, D., Reiter, R.J., Menéndez-Peláez, A., Pablos, M.I. and Burgos, A. (1994)** Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal. Res.* 16, 100-112.
- Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Monti, M.G., Ortiz, G.G., Reiter, R.J. (1996)** Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life. Sci.* 60, PL23-PL29.
- Ando, S., Tanabek, K., Gonda, Y., Sato, C. and Inagaki, M. (1989)** Domain and sequence specific phosphorylation of vimentin induced disassembly of the filament structure. *Biochemistry*, 28, 2974-2979.
- Antolín, I., Rodríguez, C., Sáinz, R.M., Mato, J.C., Uría, H., Kotler, M.L., Rodríguez-Colunga, M.J., Tolivia, D. and Menéndez-Peláez, A. (1996)** Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 10, 882-890.
- Antón-Tay, F., Forray, C. and Ortega-Corona, B.G. (1988)** Subneuronal fate of intracerebroventricular injected <sup>3</sup>H-Melatonin. *J. Pineal Res.* 5, 125-133.
- Antón-Tay, F., Huerto-Delgadillo, L., Ortega-Corona, B.G. and Benítez-King, G. (1993)** Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. En: *Melatonin and the Pineal Gland From Basic Science to Clinical Application*. Touitou, Y., Arendt, J. and Pévet, P (eds.) Elsevier, Amsterdam, 41-46.
- Antón-Tay, F., Martínez, I., Tovar, R. and Benítez-King, G. (1998)** Modulation of the subcellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells. *J. Pineal Res.* 24, 35-42.
- Axelrod, J. (1974)** The pineal gland: a neurochemical transducer. Chemical signals from nerves regulated synthesis of melatonin and convey information about internal clocks. *Science*, 184, 1341-1348.
- Ayre, E.A., Yuan, H. and Pang, S.F. (1992)** The identification of I-125-labelled iodomelatonin-binding sites in the testes and ovaries of the chicken (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 133, 5-11.
- Baler, R. and Klein, D.C. (1995)** Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. *J. Biol. Chem.* 270, 27319-27325.
- Baler, R., Covington, S. and Klein, D.C. (1997)** The rat arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene promoter: cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J. Bio. Chem.* 272, 6979-6985.
- Bargmann, W. (1943)** Die Epiphysis cerebri. En: Von Möllendorff, W. (Ed.), *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Vol. 6. Springer-Verlag, Berlin.
- Barjavel, M., Mamdouh, Z., Raghbate, N. and Bakouche, O. (1998)** Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J. Immunol.* 160, 1191-1197.
- Barlow-Walden, L.R., Reiter, R.J., Abe, M., Pablos, M.I., Menéndez-Peláez, A., Chen, L.D. and Poeggeler, B. (1995)** Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* 26, 497-502.
- Bartsch, C., Bartsch, H., Bellmann, O. and Lippert, T.H. (1991)** Depression of serum melatonin in patients with primary breast cancer is not due to an increased peripheral metabolism. *Cancer*, 67, 1681-1684.

**Becker-André, M., André, E. and DeLamater, J.F. (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, B., Missbach, M., Saurat, J.H. and Carlberg, C. (1994)** Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Bio. Chem.* 269, 28531-28534.

**Benítez-King, G. and Anton-Tay, F. (1993)** Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 49, 635-641.

**Benítez-King, G. and Anton-Tay, F. (1996)** Role of melatonin in cytoskeletal remodeling is mediated by calmodulin and protein kinase C. *Front. Horm. Res.* 21, 154-159.

**Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L. and Antón-Tay, F. (1990)** Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Pineal Res.* 9, 209-220.

**Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L. and Antón-Tay, F. (1991a)** Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res.* 557, 289-292.

**Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L. and Antón-Tay, F. (1991b)** Changes in calmodulin compartmentalization in MDCK cells induced by melatonin. *Proc. Neurosci. Soc.* 17, 1193, abstract 474.19.

**Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L. and Antón-Tay, F. (1993)** Binding of <sup>3</sup>H-melatonin to calmodulin. *Life. Sci.* 53, 201-207.

**Benítez-King, G., Ríos, A., Martínez, A. and Antón-Tay, F. (1996)** In vitro inhibition of Ca<sup>++</sup>-calmodulin dependent protein kinase II activity by melatonin. *Biochem. Biophys. Acta.* 1290, 191-196.

**Ben-Nathan, D., Maestroni, G.J.M., Lustig, S. and Conti, A. (1995)** Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis virus. *Arch. Virol.* 140, 223-230.

**Bernton, E., Bryant, H., Holaday, J. and Dave, J. (1992)** Prolactin and prolactin secretagogues reverse immunosuppression in mice treated with cysteamine, glucocorticoids, or cyclosporin A. *Brain Behav. Immun.* 6, 394-408.

**Bettahi, I., Pozo, D., Osuna, C., Reiter, R.J., Acuña-Castroviejo, D. and Guerrero, J.M. (1996)** Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J. Pineal Res.* 20, 205-210.

**Binkley, S.A. (1981)** Pineal biochemistry: comparative aspects and circadian rhythms. En: Reiter, R.J. (Ed.), *The Pineal Gland, Vol. 1, Anatomy and Biochemistry.* CRC Press, Boca Raton, 155-172.

**Binkley, S.A. (1993)** Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia*, 49, 648-653.

**Birnbaumer, L. and Brown, A.M. (1990)** G proteins and the mechanism of action of hormones, neurotransmitters, and autocrine and paracrine regulatory factors. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, S106-S114

**Birnbaumer, L., Mattera, R., Yatani, A., Van Dongen, A., Graf, R., Sanford, J., Codina, J. and Brown, A.M. (1990)** Roles of G-proteins in coupling of receptor to ionic channels. En: Nahorski, S.R. (ed) *Transmembrane Signalling, Intracellular Messengers and Implications for Drug Development,* John Wiley, New York, 43-71.

- Blalock, J.E. and Smith, E.M. (1985)** A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine system. *Federation Proc.* 44, 108-111.
- Blask, D.E. (1993)** Melatonin in oncology. En: Hu, H. and Reiter, R.J. (Eds.), *Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications*. CRC Press, Boca Raton F.L. 448-464.
- Blask, D.E., Wilson, S.T. and Zalatan, F. (1997)** Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth *in vitro*: evidence for a glutathione-mediated pathway. *Cancer Res.* 57, 1909-1914.
- Blazynski, C. and Dubocovich, L.L. (1991)** Localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *J. Neurochem.* 56, 1873-1880.
- Blumer, K.J. and Johnson, G.L. (1994)** Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem. Sci.* 19, 236-240.
- Borjigin, J., Wang, M.M. and Snyder, S.H. (1995)** Diurnal variation in mRNA encoding serotonin *N*-acetyltransferase in pineal gland. *Nature*, 378, 783-785.
- Bornman, M.S., Oosthuizen, J.M.C., Barnard, H.C., Schulenburg, G.W., Boomker, D., and Reif, S. (1989)** Melatonin and sperm mobility. *Andrologia*, 21, 483-486.
- Boyum, A. (1968)** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand.J.Clin Lab. Invest.* 97, 77-89.
- Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-252.
- Brzezinski, A., Seibel, M.M., Lynch, H.J., Deng, M.H. and Wurtman, R.J. (1987)** Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 865-867.
- Brzezinski, A. (1997)** Melatonin in humans. *N. Engl. J. Med.* 336, 186-195.
- Cagnacci, A., Elliot, J.A. and Yen, S.S.S. (1992)** Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 447-452.
- Cagnacci, A. and Volpe, A. (1996)** Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. *J. Endocrinol. Invest.* 19, 382-411.
- Calvo, J.R., Raffi-El-Idrissi, M., Pozo, D. and Guerrero, J.M. (1995)** Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J. Pineal. Res.* 18, 119-126.
- Capsoni, S., Viswanathan, M., De Oliveira, A.M. and Saavedra, J.M. (1994)** Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology* 135, 373-378.
- Cardinali, D.P. (1974)** Melatonin and the endocrine role of the pineal organ. *Curr. Top. Exp. Endocrinol.* 2, 107-128.
- Carlberg, C. and Wiesenberger, I. (1995)** The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: and unexpected relationship. *J. Pineal. Res.* 18, 171-178.
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J., DeLamarter, J.F. and Becker-André, M. (1994)** RZR, a new family of retinoid-related orphan receptor that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endocrinol.* 8, 757-770.

- Carlson, L.L., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1989)** Melatonin signal transductions in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology* 125, 2670-2676.
- Caroleo, M.C., Frasca, D., Nistico, G. and Doria, G. (1992)** Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology* 23, 81-89.
- Caroleo, M.C., Doria, G. and Nistico, G. (1994)** Melatonin restores immunodepression in aged and cyclophosphamide-treated mice. *Ann. NY Acad Sci.* 719, 343-352.
- Cassel, D. and Sellinger, Z (1976)** Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys Acta* 452, 538-551.
- Cassel, D. and Selinger, Z (1977)** Mechanism of adenylyl cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3307-3311.
- Cassone, V.M., Brooks, D.S. and Kelm, T.A. (1995)** Comparative distribution of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding in the brains of diurnal birds: Outgroup analysis with turtles. *Brain Behav. Evol.* 45, 241-256.
- Cavallo, A. (1993)** Melatonin and human puberty: current perspectives. *J. Pineal. Res.* 15, 115-221.
- Chabre, M. and Deterre, P. (1989)** Molecular mechanisms of visual transduction. *Eur. J. Biochem.* 179, 255-266.
- Cohen, M., Roselle, D., Chabner, B., Schmidt, T. and Lippman, M. (1978)** Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature* 274, 894-895.
- Collin J-P. and Oksche A. (1981)** Structural and functional relationships in the nonmammalian pineal gland. En: Reiter, R.J. (Ed.), *The Pineal Gland, Vol. 1, Anatomy and Biochemistry.* CRC Press, Boca Raton, 27-67.
- Colombo, L.L., Chen, G.J., López, M.C. and Watson, R.R. (1992)** Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. *Immunol. Lett.* 33, 123-126.
- Conti A. and Maestroni, G.J.M. (1995)** The clinical neuroimmunotherapeutic role of melatonin in oncology. *J. Pineal Res.* 19, 103-110.
- Coon, S.L., Roseboom P.H., Baler, R., Weller, J.L., Namboodiri, N.A.A., Koonin, E.V. and Klein, D.C. (1995)** Pineal serotonin *N*-acetyltransferase: expression, cloning and molecular analysis. *Science*, 270, 1681-1683.
- Copinga, S., Tepper, P.G., Grol, C.J., Horn, A.S. and Dubocovich, M.L. (1993)** 2-Amido-8-methoxytetralins: a series of nonindolic melatonin-like agents. *J. Med. Chem.* 36, 2891-2898.
- Cos, S., Blask, D.E., Lemus-Wilson, A. and Hill, A.B. (1991)** Effects of melatonin on cycle kinetics and "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J. Pineal Res.* 10, 36-42.
- Cos, S. and Blask, D.E. (1994)** Melatonin modulates growth factor activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 17, 25-32.
- Cos, S. and Sánchez-Barceló, E.J. (1995)** Melatonin inhibition of MCF-7 human-breast cancer cells growth: influence of cell proliferation rate. *Cancer Lett.* 93, 207-212.
- Craft, C.M., Morgan, W.W. and Reiter, R.J. (1984)** 24 Hours changes in catecholamine synthesis in rat and hamster pineal glands. *Neuroendocrinology*, 38, 193-198.

- Csaba, G., Fisher, J. and Acs, T. (1966)** The effect of pinealectomy and thymectomy on the immune capacity of the rat. *Experientia* 22, 168-169.
- Del Gobbo, V., Libri, V., Villani, N., Calio, R. and Nistico, G. (1989)** Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *J. Immunopharmacol.* 5, 567-571.
- Demas, G.E. and Nelson, R.J. (1996)** Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Biol. Rhythms* 11, 95-103.
- Devecerski, V. (1963)** Contributions a l'etude de l'effect de l'epiphysectomie sur l'histophysiologie du thymus. *Acta Anat.* 54, 352-353.
- Deveson, S., Howarth, J.A., Arendt, J. and Forsyth, I.A. (1992)** *In vitro* autoradiographical localization of melatonin binding sites in the caprine brain. *J. Pineal Res.* 13, 6-12.
- Di Stefano, A. and Paulesu, L. (1994)** Inhibitory effect of melatonin on production of IFN gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J. Pineal. Res.* 17, 164-169.
- Dollins, A.D., Zhdanova, I.V., Wurtman, R.J., Lynch, H.J. and Deng, M.H. (1994)** Effet of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1824-1828.
- Dráverová, E. and Dráber, P.A. (1993)** Microtubule-interacting protein involved in coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules. *J. Cell Sci.* 106, 1263-1273.
- Drew, J.E., Williams, L.M., Hannah, L.T., Barret, P., Abramovich, D.R. and Morgan, P.J. (1998)** Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel<sub>1a</sub> and Mel<sub>1b</sub> receptor genes. *J. Endocrinol.* 156, 261-267.
- Dubocovich, M.L. (1988)** Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 246, 902-910.
- Dubocovich, M.L. (1993)** Melatonin receptor agonist and antagonist. Proceedings of the 8th Noordwijerhout-Camerino Symposium on Trends in Drug Research. En: Claassen, V. (ed) Trends in Drugs Research. Elsevier, Amsterdam, 285-291.
- Dubocovich, M.L. (1995)** Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 50-56.
- Dubocovich, M.L., North, P.C., Oakley, N.R. and Hagan, R.M. (1993)** A potent naphthalenic melatonin receptor agonist. En: Touitou, Y., Arendt, J., Pévet, P. (eds) Melatonin and the pineal gland from basic science to chemical application. Elsevier, Amsterdam, 127-130.
- Duncan, M.J., Takahashi, J.S. and Dubocovich (1988)** 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 122, 1825-1833.
- Duncan, M.J., Takahashi, J.S. and Dubocovich (1989)** Characteristics and autoradiographic localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology* 125, 1011-1018.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R. and Reppert, S.M. (1994)** Expression cloning of high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6133-6137.
- Eison, A.S. and Mullins, U.L. (1993)** Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in Syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells. *Life Sci.* 53, 393-398.

- Ekstrom, P. and Vanecek, J. (1992)** Localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Neuroendocrinology* 55, 529-537.
- Esposti, D., Lissoni, P., Tancini, G., Barni, S., Crispino, S., Paolorossi, F., Rovelli, F., Ferri, I., Cattaneo, G., Esposti, G., Lucini, V. and Frascini, F. (1988)** A study on the relationship between the pineal gland and opiod system in patients with cancer, preliminary considerations. *Cancer*, 62, 494-499
- Evans, R.M. (1988)** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240, 889-895.
- Exton, J.H. (1994)** Phosphoinositide phospholipase and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 349-369.
- Faber, E. (1982)** Chemical carcinogenesis, a biologic perspective. *Am. J. Pathol.* 2, 271-296.
- Federman, A.D., Conklin, B.R., Schrader, K.A., Reed, R.R. and Bourne, H.R. (1992)** Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through G<sub>i</sub>-protein βγ subunits. *Nature* 356, 159-161.
- Felsner, P., Hofer, D., Rinner, I., Porta, S., Korsatko, W. and Schauenstein, K. (1995)** Adrenergic supression of peripheral blood T cell reactivity in the rat is due to activation of peripheral α<sub>2</sub>-receptors. *J. Neuroimmunol.* 57, 27-34.
- Finocchiaro, L.M., Artz, E.S., Fernández-Castelo, S., Criscuolo, M., Finkielman, S. and Nahmod, V. (1988)** Serotonin and melatonin synthesis in peripheral mononuclear cells: stimulation of gamma interferon as part of an immunostimulatory pathway. *J. Interf. Res.* 8, 705-716.
- Forman, B.M. Chen, J., Blumberg, B., Kliewer, S.A., Henshaw, R., Ong, E.S. and Evans, R.M. (1994)** Cross-talk among RORα1 and Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 8, 1253-1261.
- Foulkes, N.S., Borjigin, J., Snyder, S.H. and Sassone-Corsi, P. (1996)** Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14140-14145.
- Freedam, L.P. and Luisi, B.F. (1993)** On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptor: a structural and functional perspective. *J. Cell Biochem.* 51, 140-150.
- García-Mauriño, S., González-Haba, M.G., Calvo, J.R., Raffi-El-Idrissi, M., Sánchez-Margalet, V., Goberna, R. Guerrero, J.M. (1997)** Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-γ production by human circulating CD4<sup>+</sup> cells: a posible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 159, 574-581.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M. and Pévet, P. (1992)** Pinealectomy and constant illumination increase the density of melatonin binding sites in the pars tuberalis of rodents. *Brain Res.* 575, 32-38.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M. and Pévet, P. (1993)** Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and supraquiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res.* 602, 153-156.
- Giguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R.M. and Otulakowski, G. (1994)** Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of RZRα, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Gen. Dev.* 8, 538-553.
- Giordano, M. and Palermo, M.S. (1991)** Melatonin induces enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Pineal Res.* 10, 117-121.

- Giordano, M., Vermeulen, M. and Palermo, M.S. (1993)** Seasonal variation in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. *FASEB J.* 7, 1052-1054.
- Giusti, P., Gusella, M., Lipartiti, M., Milani, D., Zhu, W., Vicini, S. and Manev, H. (1995)** Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainate but not from *N*-methyl-D-aspartate excitotoxicity. *Exp. Neurol.* 131, 39-46.
- Glass, C.K. (1994)** Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Rev.* 15, 391-407.
- Godson, C. and Reppert, S.M. (1997)** The Mel<sub>1a</sub> melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138, 397-404.
- González-Haba, M.G., García-Mauriño, S., Calvo, J.R., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1995)** High-affinity of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4<sup>+</sup>). *FASEB J.* 9, 1331-1335.
- Green, S. and Chambon, P. (1988)** Nuclear receptor enhance our understanding of transcriptional regulation. *Trends Genet.* 4, 309-314.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F. and Schultz, G. (1996)** Diversity and selectivity of receptor-Gprotein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 429-459.
- Haimov, I., Lavie, P., Laudon, M., Herer, P., Vigder, C. and Zisapel, N. (1995)** Melatonin replacement therapy of elderly insomniacs. *Sleep*, 18, 598-603.
- Hamm, H.E. and Gilchirst, A. (1996)** Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 189-196.
- Hawes, B.E., Van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (1995)** Distinct pathways of G<sub>i</sub>- and G<sub>q</sub>-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 270, 17148-17153.
- Hepler, J.R. and Gilman, A.G. (1992)** G-proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 383-387.
- Henden, T., Stokkan, K.A., Reiter, R.J., Nonaka, K.O., Lerchl, A. and Jones, D.J. (1992)** The age-associated reduction in pineal  $\beta$ -adrenergic receptor density is prevented by life long food restriction in rats. *Biol. Signals* 1, 34-39.
- Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W. and Schultz, G. (1987)** The GTP-binding protein, G<sub>o</sub>, regulates neural calcium channels. *Nature* 325, 445-447.
- Heubner, O. (1898)** Tumor der glandula pinealis. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 24, 214.
- Hill, S.M. and Blask, D.E. (1988)** Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferations and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res.* 48, 6121-6126.
- Hirose, T., Smith, R.J. and Jetten, A.M. (1994)** ROR $\gamma$ . The third member of RZR/ROR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205, 1976-1983.
- Ho, A.K. and Klein, D.C. (1987)** Activation of  $\alpha_1$ -adrenoreceptors, protein kinase C, or treatment with intracellular free Ca<sup>2+</sup> elevating agents increases pineal phospholipase A<sub>2</sub> activity. *J. Biol. Chem.* 262, 11761-11770.

- Ho, A.K., Thomas, T.P., Chik, C.I., Anderson, W. and Klein, D.C. (1988)** Protein kinase C: subcellular redistribution by increased Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Biol. Chem.* 263, 9292-9297.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S. and Tung, L. (1996)** Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol. Endocrinol.* 10, 1167-1177.
- Huerto-Delgadillo, L., Antón-Tay, F. and Benítez-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.
- Ichinose, M. And Sawada, M. (1996)** Enhancement of phagocytosis by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Peptides* 17, 1405-1414.
- Illnerova, H., Vanecek, J., Krecek J., Wetterberg, J. and Sääf, J. (1979)** Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin *N*-acetyltransferase and melatonin. *J. Neurochem.* 32, 673-675.
- Illnerova, H., Buresova, M. and Presl, J. (1993)** Melatonin rhythm in human milk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 838-841.
- Iuvone, P.M. and Gan, J. (1994)** Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures. *J. Neurochem.* 63, 118-124.
- Jansen, K.L.R., Dragunow, M. and Faull, R.L.M. (1990)** Sigma receptors are highly concentrated in the rat pineal gland. *Brain Res.* 507, 158-160.
- Kappers, J.A. (1976)** The mammalian pineal gland, a survey. *Acta Neurochir.* 34, 109-149.
- Karasek, M. and Reiter, R.J. (1992)** Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microscopy Res. Tech.* 21, 136-157.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kazasa, T., Nakafuku, M. and Satoh, T. (1991)** Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 349-400.
- Kitay, J.I. and Altschule, M.D. (1954)** The Pineal Gland, a Review of the Physiologic Literature. Harvard University Press. Cambridge, Mass.
- Kivelä, K., Kauppila, A., Leppäluoto, J. and Vakkuri, O. (1989)** Serum and amniotic fluid melatonin during human labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69, 1065-1068.
- Klein, D.C. and Weller, J.L. (1970)** Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in *n*-acetyltransferase. *Science*, 169, 1093-1095.
- Klein, D.C., Buda, M., Kapoor, C. and Krishna, G. (1978)** Pineal serotonin *N*-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3', 5'-monophosphate may signal for turnoff. *Science*, 199, 309-311.
- Klein, D.C., Roseboom, P.H. and Coon, S.L. (1996)** New light is shining on the melatonin rhythm enzyme: the first postcloning view. *Trends Endocrinol. Metabol.* 7, 106-112.
- Kotler, M., Rodríguez, C., Sainz, R.M., Antolín, I., Menéndez-Peláez, A. (1998)** Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 24, 83-89.

- Kuci, S., Becker, J., Veit, G., Handgretinger, R., Attanasio, A., Bruchelt, G., Treuner, J., Niethammer, D. and Gupta, D. (1988)** Circadian variation in the immunomodulatory role of the pineal gland. *Neuroendocrinol. Lett.* 10, 65-79.
- Kurokawa, R., Yu, V.C., Näär, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (1993)** Differential orientatios of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Gen. Dev.* 7, 1423-1435.
- Kvetnoy, I.M. and Yuzhakov, V.V. (1994)** Extrapineal melatonin: non-traditional localization and possible significance for oncology. En: Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Reiter, R.J. (Eds). *Advances in Pineal Research*, Vol 7. John Libbey Inc, London, 197-210.
- Laasko, M.L., Porkka-Heiskanen, T., Alila, A. Stenberg, D. and Johansson, G. (1990)** Correlation between salivary and serum melatonin: dependence on serum melatonin levels. *J. Pineal Res.* 9, 39-50.
- Laitinen, J.T. and Saavedra, J.M. (1990)** Chracterizatiion of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology* 126, 2110-2115.
- Laitinen, J.T., Flagge, g. and Saavedra, J.M. (1990)** Chracterizatiion of melatonin receptors in the rat area postrema: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Neuroendocrinology* 51, 619-624.
- Laitinen, J.T., Viswanathan, M., Vakkuri, O. and Saavedra, J.M. (1992)** Differential regulation of the rat melatonin receptor: selective age-associated decline and lack of melatonin-induced changes. *Endocrinology* 130, 2139-2144.
- Lakin, M.L., Miller, C.H., Stott, M.L. and Winters, D.W. (1981)** Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci.* 19, 2543-2551.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F. and Stehelin, D. (1992)** Evolution of the nuclear receptor superfamily. *EMBO J.* 11, 1003-1013.
- Laudon, M., Gilad, E., Matzkin, H., Braf, Z. and Zisapel, N. (1996)** Putative melatonin receptors in benign human prostate tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 1336-1342.
- Lee, P.P. and Pand, S.F. (1992)** Identification and characterization of melatonin binding sites in gastrointestinal tract of ducks. *Life. Sci.* 50, 117-125.
- Lerner A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. and Mori, W. (1958)** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2587-2589.
- Lesnikov, V.A., Korneva, E.A., Dall'ara, A. and Pierpaoli, W. (1992)** The involvement of the pineal gland and melatonin in immunity and aging: II. Thyrotropin-releasing hormone and melatonin forestall involution and promote reconstitution of the thymus in anterior hypothalamic area (AHA)-lesioned mice. *Intern. J. Neurosci.* 62, 141-153.
- Lewinski, A., Zelazowsky, A., Sewerynek, E., Zerek-Melen, G. and Szudlinski, M. (1989)** Melatonin-induced immunosuppression of human lymphocyte natural killer activity in vitro. *J. Pineal Res.* 7, 153-164.
- Lewy, A.J., Wehr, T.A., Goodwin, F.K., Newsome, D.A. and Markey, S.P. (1980)** Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, 210, 1267-1269.

## ***Bibliografía***

---

**Skwarło-Sońta, K. (1996)** Functional connections between the pineal gland and the immune system. *Acta Neurobiol. Exp.* 56, 341-357.

**Liebmann, P.M., Hofer, D., Felsner, P., Wölfler, A. and Schauenstein, K. (1996)** Beta-blockade enhances adrenergic immunosuppression in rat via inhibition of melatonin release. *J. Neuroimmunol.* 67, 137-142.

**Lindroos, O.F., Veilahti, J., Leinonen, L.M. and Laakso, M.L. (1993)** Characterization of melatonin binding to the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 250, 161-163.

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

**Lissoni, P., Barni, S., Archili, C., Cattaneo, G., Rovelli, F., Conti, A., Maestroni, G.J.M. and Tancini, G. (1990)** Endocrine effects of a 24-hour intravenous infusion of interleukin-2 in the immunotherapy of cancer. *Anticancer Res.* 10, 753-758.

**Lissoni, P., Barni, S., Ardizzoia, A., Paolorossi, F., Crispino, S., Tancini, G., Tisi, E., Archili, C., De Toma, D., Pipino, G., Conti, A. and Maestroni, G.J.M. (1992)** Randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in advanced nonsmall cell lung cancer resistant to a first-line chemotherapy containing cisplatin. *Oncology*, 49, 336-339.

**Lissoni, P., Barni, S., Cazzaniga, M., Ardizzoia, A., Rovelli, F., Brivio, F. and Tancini, G. (1994)** Efficacy of the concomitant administration of the pineal hormone melatonin in cancer immunotherapy with low-dose IL-2 in patients with advanced solid tumors who had progressed on IL-2 alone. *Oncology*, 51, 344-347.

**Lissoni, P., Ardizzoia, A., Barni, S., Paolorossi, F., Tancini, G., Meregalli, S., Esposti, G., Zubelewicz, B. and Braczowski, R. (1995)** A randomized study of tamoxifen alone versus tamoxifen plus melatonin in estrogen receptor-negative heavily pretreated metastatic breast cancer patients. *Oncol. Rep.* 2, 871-873.

**Liu, Z.M. and Pang, S.F. (1992a)** Binding of  $2[^{125}I]$  labelled iodomelatonin in duck thymus. *Biol. Signals* 1, 245-253.

**Liu, Z.M. and Pang, S.F. (1992b)**  $\{I-125\}$ -labelled iodomelatonin binding sites in duck Bursa of Fabricius: binding characteristics and diurnal variation. *Neurosci. Lett.* 146, 163-166.

**Liu, C., Weaver, R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschi, R.L., Gribkoff, V.K. and Reppert, S.M. (1997)** Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91-102.

**Lochmiller, R.L., Vesty, M.R. and McMurry, S.T. (1994)** Temporal variation in humoral and cell-mediated immune response in a *Sigmodium hispidus* population. *Ecology* 75, 236-245.

**Logsdon, C.D. (1994)** Molecular structure and function of G-protein-linked receptors. En: Johnson, L.P. (ed). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, 351-380.

**López-Girona, A., Bachs, O. and Agell, N. (1995)** Calmodulin is involved in the induction of DNA polymerases alpha and delta activities in normal rat kidney cells activated to proliferate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 566-574.

**López-González, M.A., Calvo, J.R., Rubio, A., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1991)** Characterization of melatonin binding sites in the harderian gland and median eminence of the rat. *Life. Sci.* 48, 1165-1171.

- López-González, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C. and Guerrero, J.M. (1992a)** Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulation by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP production. *J. Pineal Res.* 12, 97-104.
- López-González, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C., Rubio, A. and Guerrero, J.M. (1992b)** Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating cyclic AMP production in human lymphocytes. *J. Pineal Res.* 12, 174-181.
- López-González, M.A., Martín-Cacao, A., Calvo, J.R., Reiter, R.J., Osuna, C. and Guerrero, J.M. (1993a)** Specific binding of 2-[<sup>125</sup>I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J. Neuroimmunol.* 45, 121-126.
- López-González, M.A., Calvo, J.R., Segura, J.J. and Guerrero, J.M. (1993b)** Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotech. Ther.* 4, 253-262.
- Lu, K.H. and Meites, J. (1973)** Effects of serotonin precursor and melatonin on serum prolactin release in rats. *Endocrinology* 93, 152-156.
- Maestroni, G.J.M. (1995)** T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J. Pineal Res.* 18, 84-89.
- Maestroni, G.J.M. (1996)** HPLC validation of a circadian melatonin rhythm in the pineal gland of inbred mice. *J. Pineal Res.* 20, 138-144.
- Maestroni, G.J.M. and Pierpaoli, W. (1981)** Pharmacologic control of the hormonally mediated immune response. En: Ader, R (ed) *Psychoneuroimmunology*, Academic Press, NY, 405-425.
- Maestroni, G.J.M. and Conti, A. (1989)** Beta-endorphin and dynorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 333-340.
- Maestroni, G.J.M. and Conti, A. (1990)** The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4<sup>+</sup>, Thy-1<sup>+</sup> cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J. Neuroimmunol.* 28, 167-176.
- Maestroni, G.J.M. and Conti, A. (1991)** Anti-stress role of the melatonin-immuno-opioid network: evidence for a physiological mechanism involving T cell-derived, immunoreactive beta-endorphin and met-enkephalin binding to thymic opioid receptors. *Int. J. Neurosci.* 61, 289-298.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1986)** Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antidody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol.* 13, 19-31.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1987)** Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 68, 384-391.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1988)** Role of the pineal gland in immunity: III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 63, 465-469.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1989)** Melatonin, stress and the immune system. *Pineal Res. Rev.* 7, 203-226.
- Maestroni, G.J.M., Covacci, V. and Conti, A. (1994a)** Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 54, 2429-2432.

**Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Lissoni, P. (1994b)** Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res.* 54, 4740-4743.

**Maestroni, G.J.M., Hertens, E., Galli, P., Conti, A. and Pedrinis, E. (1996)** Melatonin-induced T-helper cell hematopoietic cytokines resembling both interleukin-4 and dynorphin. *J. Pineal Res.* 21, 131-139.

**Maguire, M.E., Van Arsdale, P.M. and Gilman, A.G. (1976)** An agonist-specific effect of guanine nucleotides on binding to the beta adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 12, 335-339.

**Martín-Cacao, A., López-González, M.A., Reiter R.J., Calvo, J.R. (1993)** Binding of 2-[<sup>125</sup>I]melatonin by rat thymus membranes during postnatal development. *Immunol. Lett.* 36, 59-64.

**Martinoli, M.G., Williams, L.M., Kah, O., Titchener, L.T. and Pelleter, G. (1991)** Distribution of central melatonin binding sites in the goldfish (*Carassius auratus*). *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 78-95.

**Mattera, R., Graziano, M.P., Yatani, A., Zhou, Z., Graf, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Gilman, A.G. and Brown, A.M. (1989)** Splice variants of the alpha subunit of the G protein Gs activate both adenyl cyclase and calcium channels. *Science* 243, 804-807.

**Mayo, J.C., Sáinz, R.M., Uria, H., Antolín, I., Esteban, M.M., and Rodríguez, C. (1998)** Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J. Pineal Res.* 24, 179-192.

**McArthur, A.J., Hunt, A.E. and Gillette, M.U. (1997)** Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138, 627-634.

**McCrudden, A.B. and Stimson, W.H. (1991)** Sex hormones and immune function. En: Ader, R. and Cohen, J. (eds) Psychoneuroimmunology, Academic Press, New York, 475-493.

**McIntyre, I.M., Norman, T.R., Burrows, G.D. and Armstrong, S.M. (1989)** Human melatonin suppression by light is intensity dependent. *J. Pineal Res.* 6, 149-156.

**McNulty, J.A., Relfson, M., Fox, L.M., Kus, L., Handa, R.J. and Schneider, G.B. (1990)** Circadian analysis of mononuclear cells in the rat following pinealectomy and superior cervical ganglionectomy. *Brain Behav. Immun.* 4, 292-307.

**Melchiorri, D., Reiter, R.J., Attia, A.M., Hara, M., Burgos, A. and Nistico, G. (1995)** Potent protective effect of melatonin on *in vivo* paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci.* 56, 83-89.

**Menéndez-Peláez, A. and Reiter, R.J. (1993)** Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal. Res.* 15, 59-69.

**Menéndez-Peláez, A., Brizzell, G.R., Nonaka, K.O. and Reiter, R.J. (1990)** In vivo administration of isoproterenol or forskolin during the light phase induces increases in the melatonin content of the Syrian hamster pineal gland without a rise in N-acetyltransferase activity. *Neurosci. Lett.* 110, 314-318.

**Menéndez-Peláez, A., Poeggeler, B., Reiter, R.J., Barlow-Walden, L.R., Pablos, M.I. and Tan, D.X. (1993)** Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunological and radioimmuno-assay evidence. *J. Cell. Biochem.* 53, 373-382.

- Mennenga, K., Ueck, M. and Reiter, R.J. (1990)** Immunocytochemical results with melatonin antiserum in the pineal gland and retina of the pigeon. En: *Advances in Pineal Research*. Reiter, R.J., Lukaszyc, A. (eds), John Libbey, Londres, 4, 69-74.
- Mennenga, K., Ueck, M. and Reiter, R.J. (1991)** Immunocytochemical localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. *J. Pineal Res.* 10, 159-164.
- Milcu, S.M. and Pitis, M. (1943)** Contributions a l'etude de la correlation thymo-epiphysarie. *Acta Endocrinol.* 9, 13-15.
- Milligan, G. and Green, A. (1991)** Agonist control of G protein levels. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 207-209.
- Molinari, E.J., North, P.C. and Dubocovich, M.L. (1996)** 2[<sup>125</sup>I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 301, 159-168.
- Molis, T.M., Spriggs, L.L. and Hill, S.M. (1994)** Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 8, 1681-1690.
- Moore, R.Y. (1978)** The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog. Reprod. Biol.* 4, 1-29.
- Morgan, P.J., Lawson, W., Davidson, G. and Howell, H.E. (1989a)** Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology*, 50, 359-362.
- Morgan, P.J., Lawson, W., Davidson, G. and Howell, H.E. (1989b)** Melatonin inhibits cyclic AMP production in cultured ovine pars tuberalis cells. *J. Mol. Endocrinol.* 3, R5-R8.
- Morgan, P.J., Davidson, G., Lawson, W. and Barrett, P. (1990)** Both pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins link melatonin receptor to inhibition of adenylate cyclase in the ovine pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* 2, 773-776.
- Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E. and Helliwell, R. (1994)** Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24, 101-146.
- Morgan, P.J., Williams, L.M., Barret, P., Lawson, W., Davidson, G., Hannah, L. and Maclean, A. (1996)** Differential regulation of melatonin receptors in sheep, chicken and lizard brains by cholera and pertussis toxins and guanine nucleotides. *Neurochem. Int.* 28, 259-269.
- Morrey, K.M., McLachlan, J.A., Serkin, C.D. and Bakouche, O. (1994)** Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. Immunol.* 153, 2671-2680.
- Mucha, S., Zylinska, K., Zerek-Melen, G., Swietoslowski, J. and Stepien, H. (1994)** Effects of interleukin-1 on in vivo melatonin secretion by the pineal gland in rats. *Adv. Pineal Res.* 7, 177-181.
- Mullins, U.L. and Eison, A.S. (1994)** Pharmacologic characterization of melatonin-mediated phosphoinositide hydrolysis in pigeon brain. *J. Pineal Res.* 17, 33- 38.
- Namboodiri, M.A.A., Weller, J.L. and Klein, D.C. (1980)** Evidence of inactivation of pineal indoleamine N-acetyltransferase by protein thiol: disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 255, 6032-6035.
- Neer, E.J. (1995)** Heterotrimeric G pteoin: organizers of transmembrane signal. *Cell* 80, 249-257.

- Nelson, R.J., Demas, G.E., Klein, S.L. and Kriegsfeld, L.J. (1995)** The influence of season, photoperiod, and melatonin on immune function. *J. Pineal Res.* 19, 149-165.
- Neri, B., Brocchi, A., Carossino, A.M., Cini-Neri, G., Gemelli, M.T., Tommasi, M.S. and Cagnoni, M. (1995)** Effects of melatonin administration on cytokine production in patients with advanced solid tumors. *Oncol. Rep.* 2, 45-47.
- Neubig, R.R., Connolly, M.P. and Remmers, A.E. (1994)** Rapid kinetics of G protein subunits association: a rate-limiting conformational change. *FEBS Lett.* 355, 251-253.
- Niles, L.P. (1985)** Effects of melatonin on adenylate cyclase activity in rat brain, pineal and retina. En: Brown, G.M. and Wainwrights, S.D. (eds), *The Pineal Gland, Endocrine Aspects*, Pergamon, Oxford, 283-288.
- Niles, L.P. (1989)** High affinity binding sites for melatonin in hamster spleen. *Med. Sci. Res.* 17, 179-180.
- Niles, L.P. and Hashemi, F. (1990)** Picomolar-affinity binding and inhibition of adenylate cyclase activity by melatonin in Syrian hamster hypothalamus. *Cell Mol. Neurobiol.* 10, 553-558.
- Niles, L.P., Wong, Y.W., Mishra, R.K. and Brown, G.M. (1979)** Melatonin receptors in brain. *Eur. J. Pharmac.* 55, 219-221.
- Niles, L.P., Ye, M., Pickering, D.S. and Ying, S.W. (1991)** Pertussis toxin blocks melatonin-induced inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in the chick brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 786-792.
- Ofermanns, S. and Simon, M.I. (1996)** Organization of transmembrane signalling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv.* 27, 177-198.
- O'Malley, B. and Conneely, O.M. (1992)** Orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation. *Mol. Endocrinol.* 6, 1359-1361.
- Oskche, A. and Hartwig, H.G. (1979)** Pineal sense organs: components of photoneuroendocrine system. *Prog. Brain Res.* 52, 113-130.
- Owen, A.D., Schapira, A.H.V., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1997)** Indices of oxidative stress in Parkinson's, Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *J. Neural. Trans.* 51, 167-173.
- Pablos, M.I., Agapito, M.T., Gutiérrez, R., Recio, J.M., Reiter, R.J., Barlow-Walden, L.R., Acuña-Castroviejo, D. and Menéndez-Peláez, A. (1995)** Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J. Pineal. Res.* 19, 111-115.
- Pangerl, B., Pangerl, A. and Reiter R.J. (1990)** Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 81, 17-29.
- Pappolla, M.A., Sos, M., Beck, R.A., Hickson-Bick, D.L.M., Reiter, R.J., Efthimiopolius, S., and Robakis, N.K. (1997)** Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to Alzheimer amyloid protein. *J. Neurosci.* 17, 1683-1690.
- Persengiev, S.P. and Kyurkchiev, S. (1993)** Selective effect of melatonin on proliferation of lymphoid cells. *Int. J. Biochem.* 3, 441-444.
- Persengiev, S., Patchev, V. and Velev, B. (1991a)** Steroid hormone receptors in the thymus: a site of immunomodulatory action of melatonin. *Int. J. Biochem.* 23, 1483-1485.

- Persengiev, S., Patchev, V. and Velev, B. (1991b)** Melatonin effects on thymus steroid receptors in the course of primary antibody responses: significance of circulating glucocorticoid levels. *Int. J. Biochem.* 23, 1487-1489.
- Pfeuffer, T. and Helmreich, J.M. (1975)** Activation of pigeon erythrocyte membrane adenylate cyclase by guanylnucleotide analogues and separation of a nucleotide binding protein. *J. Biol. Chem.* 250, 867-876.
- Pickering, D.S. and Niles, L.P. (1990)** Pharmacological characterization of melatonin binding sites in Syrian hamster hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 175, 71-77.
- Pickering, D.S. and Niles, L.P. (1992)** Expression of nanomolar-affinity binding sites for melatonin in Syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells. *Cell Signal* 4, 201-207.
- Pieri, C., Marra, M., Monori, F., Decchioni, R. and Marcheselli, F. (1994)** Melatonin; a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 55, 271-274.
- Pierpaoli, W. and Yi, C. (1990)** The involvement of the pineal gland and melatonin in immunity and aging. I. Thymus-mediated, immunoreconstituting and antiviral activity of thyrotropin-releasing hormone. *J. Neuroimmunol.* 27, 99-109.
- Pierrefiche, G. and Laborit, H. (1995)** Oxygen radicals, melatonin, and aging. *Exp. Gerontol.* 30, 213-227.
- Pioli, C., Caroleo, N.C., Nistico, G. and Doria, G. (1993)** Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non-specific signals for T-cell proliferation. *Int. J. Immunopharmacol.* 15, 463-468.
- Poeggeler, B., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D. and Manchester, L.C. (1993)** Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: a hypothesis. *J. Pineal Res.* 14, 151-168.
- Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R.J., Tan D.X., R. Chen, Manchester, L.C. and Barlow-Walden, L.R. (1994)** Melatonin - a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: news aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed *in vitro*. *Ann. NY Acad. Sci.* 738, 419-420.
- Pontoire, C., Bernard, M., Silvain, C., Collin, J.P. and Voisin, P. (1993)** Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. *Eur. J. Pharmacol.* 247, 111-118.
- Poon, A.M.S., and Pang, S.F. (1994)** Differential effects of guanine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTPγS) on the 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the chicken bursa of Fabricius and spleen. *Neurosci. Lett.* 173, 167-171.
- Poon, A.M.S., Liu, Z.M., Pang, C.S., Brown, G.M. and Pang, S.F. (1994)** Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. *Biol Signals* 3, 107-117.
- Poon, A.M.S., Mak, A.S.Y. and Luk, H.T. (1996)** Melatonin and 2[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the human colon. *Endocr. Res.* 22, 77-94.
- Popova, J.S. and Dubocovich, M.L. (1995)** Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J. Neurochem.* 64, 130-138.
- Power, R.F. Conneely, O., and O'Malley, B.W. (1992)** New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 318-323.
- Pozo, D., Reiter, R.J., Calvo, J.R. and Guerrero, J.M. (1994)** Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 55, PL455-PL460.

**Pozo, D., Delgado, M., Fernández-Santos, J.M., Calvo, J.R., Gomáriz, R.P., Martín-Lacave, I., Ortiz, G.G. and Guerrero, J.M. (1997a)** Expression of the Mel<sub>1a</sub>-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J.* 11, 466-473.

**Pozo, D., Reiter, R.J., Calvo, J.R. and Guerrero, J.M. (1997b)** Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J. Cell. Biochem.* 65, 430-442.

**Raffi-El-Idrissi, M., Calvo, J.R., Pozo, D., Harmouch, A. and Guerrero, J.M. (1995)** Specific binding of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production. *J. Neuroimmunol.* 57, 171-178.

**Raffi-El-Idrissi, M., Calvo, J.R., Giordano, M. and Guerrero, J.M. (1996)** Specific binding of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin by rat spleen crude membranes: day-night variations and effect of pinealectomy and continuous light exposure. *J. Pineal Res.* 20, 33-38.

**Raffi-El-Idrissi, M., Calvo, J.R., Harmouch, A., García-Mauriño, S. and Guerrero, J.M. (1998)** Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of rat. *J. Neuroimmunol.* 86, 190-197.

**Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L.M. and Robishaw, J.D. (1995)** Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein  $\gamma$  subunits, including three novel forms designated the  $\gamma 4, \gamma 10, \gamma 11$  subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 21765-21771.

**Reber, P.M. (1993)** Prolactin and immunomodulation. *Am. J. Med.* 95, 637-644.

**Reiter, R.J. and Hester, R.J. (1966)** Neuroendocrinological relationships. En: Sacktor, B., Reiter, R.J., Wilson, J.E., Smith, H.J., Tiekert, C., Hester, R.J.(Eds.), Research laboratory, U.S. Army Edgewood Arsenal, Maryland.

**Reiter R.J. (1981)** The mammalian pineal gland: structure and function. *Am. J. Anat.* 162, 287-313.

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

**Reiter, R.J. (1991a)** Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79, C153-C158.

**Reiter, R.J. (1991b)** The pineal gland: reproductive interactions. En: Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biochemical Implications. Vol. 4. Academic Press NY, 269-310.

**Reiter, R.J. (1994)** Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol. Exp.* 54, 31-39.

**Reiter, R.J. (1998)** Melatonin and human reproduction. *Ann. Med.* 30, 103-108.

**Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C. and Guerrero, J.M. (1993)** Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* 15, 103-116.

**Reiter, R.J. (1995)** The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp. Gerontol.* 30, 199-212.

**Reithman, C., Gierschik, P., Werdan, K. and Jakobs, K.H. (1991)** Role of inhibitory G-protein  $\alpha$ -subunits in adenylyl cyclase desensitization. *Mol. Cell Endocrinol.* 82, C215-C221.

**Reppert, S.M., Weaver, D.R., Rivkees, S.A. and Stopa, E.G. (1988)** Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 242, 78-81.

- Reppert, S.M., Weaver, D.R. and Ebisawa, T. (1994)** Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177-1185.
- Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A. and Gusella, J.F. (1995a)** Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel<sub>1b</sub> melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8734-8738.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Cassone, V.M., Godson, C. and Kolakowski, L.F. Jr (1995b)** Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15, 1003-1015.
- Rhee, S.G. and Choi, K.D. (1992)** Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267, 12393-12396.
- Ribeiro-Neto, F.A., Mattera, J.D., Hildebran, J., Codina, J.B., Field, J.B., Birnbaumer, L. and Sekura, R.D. (1985)** ADP-ribosylation of membrane component by pertussis and cholera toxin. *Methods Enzymol.* 109, 566-572.
- Rice, J.F. (1993)** Cellular and molecular mechanisms of aging. *Physiol. Rev.* 73, 149-159.
- Rivkees, S.A., Carlson, L.L. and Reppert, S.M. (1989a)** Guanine nucleotide-binding protein regulation of melatonin receptors in lizard brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 3882-3886.
- Rivkees, S.A., Cassone, V.M., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1989b)** Melatonin receptors in chick brain: characterization and localization. *Endocrinology* 125, 363-368.
- Rodbell, M., Krans, H.M.J., Pohl, S.L. and Birnbaumer, L. (1971a)** The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanyl nucleotides on binding of <sup>125</sup>I-glucagon. *J. Biol. Chem.* 246, 1872-1876.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L. and Krans, H.M.J. (1971a)** The glucagon-sensitive system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.* 246, 1877-1882.
- Rodbell, M., Lin, M.C. and Salomon, Y. (1974)** Evidence for interdependent action of glucagon and nucleotides on the hepatic adenylyl cyclase system. *J. Biol. Chem.* 249, 59-65.
- Roca, A.L., Godson, C., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1996)** Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel<sub>1a</sub> melatonin receptor. *Endocrinology* 137, 3469-3477.
- Rodríguez, A.B., Nogales, G., Ortega, E. and Barriga, C. (1998)** Melatonin controls superoxide anion level: modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 24, 9-14.
- Romero, M.P., García-Pergañeda, A., Guerrero, J.M. and Osuna, C. (1998)** Membrane-bound calmodulin in *Xenopus laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin. *FASEB J.* 12, 1401-1408.
- Roseboom, P.H. and Klein, D.C. (1995)** Norepinephrine stimulation of pineal CREB phosphorylation: primary role of a  $\beta$ -adrenergic/cyclic AMP mechanism. *Mol. Pharmacol.* 47, 439-449.
- Roseboom, P.H., Coon S.L., Baler, R., McCune, S.K., Weller, J.L. and Klein, D.C. (1996)** Melatonin synthesis: analysis of more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger. *Endocrinology*, 137, 3033-3045.

## ***Bibliografía***

---

- Sack, R.L., Lewy, A.J., Vollmer, W.M. and Singer, C.M. (1986)** Human melatonin production decreases with age. *J. Pineal Res.* 3, 379-388.
- Sack, R.L., Lewy, A.J. and Hughes, R. (1998)** Use of melatonin for sleep and circadian rhythm disorders. *Ann. Med.* 30, 115-121.
- Sáinz, R.M., Mayo, J.C., Uría, H., Kotler, M., Antolín, I., Rodríguez, C. and Menéndez-Peláez, A. (1995)** The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis in thymocytes. *J. Pineal Res.* 19, 178-188.
- Savarese, T.M. and Fraser, C.M. (1992)** *In vitro* mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 283, 1-19.
- Scaiano, J.C. (1995)** Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions and magnetic field effects in melatonin chemistry. *J. Pineal Res.* 19, 189-195.
- Scatchard, G., (1949)** The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51, 660-672.
- Schultz, R.M., Pavlidis, N.A., Stylos, W.A. and Chirigos, M.A. (1978)** Regulation of macrophage tumoricidal function: a role for prostaglandins of the E series. *Science* 202, 320-321.
- Schuurs, A.H. and Verheul, H.A.M. (1990)** Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid Biochem.* 35, 157-172.
- Schröder, M., Danielsson, C., Wiesenberg, I. and Carlberg, C. (1996)** Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR: interference with COUP-TF. *J. Biol. Chem.* 271, 19732-19736.
- Seamon, K. B., Padgett, W. and Daly, J.W. (1981)** Forskolin; unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 78, 3363-3367.
- Segura, J.J., Guerrero, J.M., Goberna, R. And Calvo, J.R. (1991)** Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat peritoneal macrophages. *Regulat. Pept.* 33, 133-143.
- Segura, J.J., Guerrero, J.M., Goberna, R. And Calvo, J.R. (1992)** Stimulation effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on cyclic AMP production in rat peritoneal macrophages. *Regulat. Pept.* 37, 195-203.
- Seweryneck, E., Abe, M., Reiter, R.J., Barlow-Walden, L.R., Chen, L.D., McCabe, T.J., Roman, L.J. and Díaz-López, B. (1995)** Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. *J. Cell. Biochem.* 58, 436-444.
- Shibuya, H., Toru, M. Watanabe, S. (1977)** A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res.* 138, 364-368.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P. and Gautam, N. (1991)** Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
- Sitaram, B.R., Lees, G.L. (1978)** Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in pineal gland of the rat. *J. Neurochem.* 31, 1021-1026.
- Siuciak, J.A., Fang, J.M. and Dubocovich, M.L. (1990)** Autoradiographic localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the brains of C3H/HeN and C57BL/6J strains of mice. *Eur. J. Pharmacol.* 180, 387-390.

- Slaugenhaupt, S.A., Roca, A.L., Liebert, C.B., Altherr, M.R., Gusella, J.F. and Reppert, S.M. (1995)** Mapping of the gene for the Mel<sub>1a</sub>-melatonin receptor to human chromosome 4 (MNTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics* 27, 355-357.
- Smrcka, A.V. and Sternweis, P.C. (1993)** Regulation of purified suntypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C  $\beta$  by G protein  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.* 268, 9667-9674.
- Spiegel, A.M. (1992)** Heterotrimeric GTP-binding proteins: an expanding family of signal transducers. *Med. Res. Rev.* 12, 55-71.
- Spiegel, A.M., Shenker, A. and Weinstein, L.S. (1992)** Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocrine Rev.* 13, 536-565.
- Stankov, B., Cozzi, B., Lucini, V., Fumagalli, P., Scaglione, F. and Fraschini, F. (1991a)** Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and shepp. A comparative *in vitro* binding study. *Neuroendocrinology* 53, 214-221.
- Stankov, B., Fraschini, F. and Reiter, R.J. (1991b)** Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 16, 245-256.
- Stankov, B., Biella, G., Panara, C., Licini, V., Capsoni, S., Fautek, J., Cozzi, B. and Fraschini, F. (1992)** Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system: using the rabbit cortex as a model. *Endocrinology* 130, 2152-2159.
- Stankov, B., Capsoni, S., Lucini, V., Fautek, J., Gatti, S., Gridelli, B., Biella, G., Cozzi, B. and Fraschini, F. (1993)** Autoradiographic localization of putative melatonin receptors in the brains of two old world primates: *Cercopithecus aethiops* and *Papio ursinus*. *Neuroscience* 52, 459-468.
- Steardo, L., Monteleone, P., d'Istria, M., Serino, I., Maj, M. and Cuomo V. (1996)** Sigma receptor modulation of noradrenergic-stimulated pineal melatonin biosynthesis in rats. *J. Neurochem.* 67, 287-293.
- Stehle, J.H., Foulkes, N.S., Molina, C.A., Simmonneaux, V., Pévet, P. and Sassone-Corsi, P. (1993)** Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, 365, 314-320.
- Steinhilber, D., Brungs, M., Werz, O., Wiesenberg, I., Danielson, C., Kahlen, J.O., Nayeri, S., Schröder, M. and Carlberg, C. (1995)** The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 7037-7040.
- Steinlechner, S. (1996)** Melatonin as a chronobiotic: PROS and CONS. *Acta. Neurobiol. Exp.* 56, 363-372.
- Strader, C.D., Fong, T.L.Z., Tota, M.R. and Winstein L.S. (1994)** Structure and function of G protein-cupled receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 101-132.
- Studnička, F. (1905)** Parietalorgane. En: Til, V., Oppel, A. (Eds.), Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere, Vol. 5. Fisher, Jena.
- Sugden, D. (1989)** Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*, 45, 922-932.
- Sugden, D. (1991)** Aggregation of pigmentgranules in single cultured *Xenopus laevis* melanophores by melatonin analogues. *Br. J. Pharmac.* 104, 922-927.

## ***Bibliografia***

---

- Sugden, D. and Chong, N.W.S. (1991)** Pharmacological identity of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res.* 539, 151-154.
- Summers, S.T., Walker, J.M., Sando, J.J. and Cronin, M.J. (1988)** Phorbol esters increase adenylate cyclase activity and stability in pituitary membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 16-24.
- Tamarkin, L., Danforth, D., Lichter, A., Demons, E., Cohen, M., Chabner, B. and Lippman, M. (1982)** Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science*, 216, 1003-1005.
- Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C. and Reiter, R.J. (1993)** Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1, 57-60.
- Tan, D.X., Reiter, R.J., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C. and Barlow-Walden, L.R. (1994)** Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis*, 15, 215-218.
- Tang, W.J. and Gilman, A.G. (1991)** Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Science* 254, 1500-1503.
- Tang, W.J. and Gilman, A.G. (1992)** Adenylyl cyclases. *Cell* 70, 869-872.
- Taussig, R. and Gilman, A.G. (1995)** Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 270, 1-4.
- Tenn, C., Niles, L.P. (1993)** Physiological regulation of melatonin receptors in rat supraquiasmatic nuclei: diurnal rhythmicity and effects of stress. *Moll. Cell. Endocrinol.* 98, 43-48.
- Tini, M., Fraser, R.A. and Giguère, V. (1995)** Functional interactions between retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor (ROR $\alpha$ ) and retinoic acid receptors in the regulation of the  $\gamma$ F-crystallin promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 20156-20161.
- Ubeda, A., Trillo, M.A., House, D.E. and Blackman, C.F. (1995)** Melatonin enhances junctional transfer in normal C3H/10T1/2 cells. *Cancer Lett.* 91, 241-245.
- Ueck, M. (1979)** Innervation of the vertebrate pineal. *Prog. Brain Res.* 52, 45-88.
- Vacas, M.I., Sarmiento, K.M.I. and Cardinali, D.P. (1981)** Melatonin increases cGMP and decreases cAMP levels in rat medial basal hypothalamus *in vitro*. *Brain Res.* 225, 207-211.
- Vacas, M.I., Berria, M.I., Cardinali, D.P. and Lascano, E.F. (1984a)** Melatonin inhibits  $\beta$ -adrenoceptor-stimulated cyclic AMP accumulation in rat astroglial cell cultures. *Neuroendocrinology* 38, 176-181.
- Vacas, M.I., Sarmiento, K.M.I. and Cardinali, D.P. (1984b)** Pineal methoxyindoles depress calcium uptake by rat brain synaptosomes. *Brain Res.* 294, 166-168.
- Vakkuri, O., Lamsa, E., Rahkamaa, E., Ruotsalainen, H. and Leppaluoto, J. (1984a)** Iodinate melatonin: preparation and characterization of molecular structure by mass or HNMR spectroscopy. *Anal. Biochem.* 142, 284-289.
- Vakkuri, O., Leppaluoto, J. and Vuolteenaho, O. (1984b)** Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin tracer. *Acta Endocrinol.* 106, 152-157.

- Van Dogen, A.M.J., Codina, J., Olate, J., Mattera, R., Joho, R., Birnbaumer, L. and Brown A.M. (1988)** Newly identified brain potassium channels gated by guanine nucleotide binding protein  $G_o$ . *Science* 242, 1433-1437.
- Vanecek, J. (1988a)** Melatonin binding sites. *J. Neurochem.* 51, 1436-1440.
- Vanecek, J. (1988b)** The melatonin receptors in rat ontogenesis. *Neuroendocrinology* 48, 201-203.
- Vanecek, J. and Vollrath, L. (1989)** Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res.* 505, 157-159.
- Vanecek, J. and Vollrath, L. (1990)** Melatonin nodulates diacylglycerol and arachidonic acid metabolism in the anterior pituitary of immature rats. *Neurosci. Lett.* 110, 199-203.
- Vanecek, J. and Klein, D.C. (1992a)** Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 130, 701-707.
- Vanecek, J. and Klein, D.C. (1992b)** Sodium-dependent effects of melatonin on membrane potential of neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 131, 939-946.
- Vanecek, J. and Klein, D.C. (1993)** A subpopulation of neonatal gonadotropin-releasing hormone-sensitive pituitary cells is responsive to melatonin. *Endocrinology* 133, 360-367.
- Vanecek, J. and Kosar, E. (1994)** Ontogenesis of melatonin receptors in anterior pituitary and pars tuberalis of golden hamsters. *Physiol. Res.* 43, 379-382.
- Vanecek, J., Kosar, E. and Vorlicek, J. (1990)** Daily changes in melatonin binding sites and the effects of castration. *Moll. Cell. Endocrinol.* 73, 165-170.
- Van Vuuren, R.J.J., Pitout, M.J., Van Aswegen, C.H. and Theron, J.J. (1992)** Putative melatonin receptor in human spermatozoa. *Clin. Biochem.* 25, 125-127.
- Vernadakis, A.J., Bemis, W.E. and Bittman, E.L. (1998)** Localization and partial characterization of melatonin receptors in amphioxus, hagfish, lamprey, and skate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 67-78.
- Vijayalaxmi, Reiter, R.J. and Meltz, M. (1995)** Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mut. Res.* 346, 23-31.
- Viswanathan, M., Laitinen, J.T. and Saavedra, J.M. (1990)** Expression of melatonin receptors in arteries involved in the thermoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6200-6203.
- Watson, A., Katz, A. and Simon, M.I. (1994)** A fifth member of the mammalian G protein  $\beta$ -subunit family. *J. Biol. Chem.* 269, 22150-22156.
- Watterson, D.M., Sharief, F. and Vanaman, T.C. (1980)** The complete amino acid sequence of the  $Ca^{2+}$ -dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255, 962-975.
- Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1996)** The  $Mel_{1a}$  melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8, 109-112.
- Weaver, D.R., Rivkees, S.A. and Reppert, S.M. (1989)** Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by *in vitro* autoradiography. *J. Neurosci.* 9, 2581-2590.

**Weaver, D.R., Carlson, L.L. and Reppert, S.M. (1990)** Melatonin receptor and signal transduction in melatonin-sensitive and melatonin-insensitive populations of the white-foot mice (*Peromyscus leucopus*). *Brain Res.* 506, 353-357.

**Weaver, D.R., Liu, C. and Reppert, S.M. (1996)** Nature's knockout: the Mel<sub>1b</sub> receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol. Endocrinol.* 10, 1478-1487.

**Weeb, S.M. and Puig-Domingo, M. (1995)** Role of melatonin in health and disease. *Clinical Endocrinology*, 42, 221-234.

**White, B.H., Sekura, R.D. and Rollag, M.D. (1987)** Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores. *J. Comp. Physiol. B* 157, 153-159.

**Wiechmann, A.F. and Wirsig-Wiechmann, C.R. (1991)** Localization and quantification of high-affinity melatonin binding site in *Rana pipiens* retina. *J. Pineal. Res.* 10, 174-179.

**Wiechmann, A.F. and Wirsig-Wiechmann, C.R. (1993)** Distribution of melatonin receptors in the brain of frog *Rana pipiens* as revealed by *in vitro* autoradiography. *Neuroscience* 52, 469-480.

**Wiechmann, A.F. and Wirsig-Wiechmann, C.R. (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, J.P., Schröder, M. and Carlberg, C. (1995)** Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR $\alpha$  by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 23, 327-333.

**Williams, L.M. (1989)** Melatonin binding sites in the rat brain and pituitary mapped by *in vitro* autoradiography. *J. Mol. Endocrinol.* 3, 71-75.

**Williams, L.M. and Morgan, P.J. (1988)** Demonstration of melatonin binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J. Endocrinol.* 119, 1-3.

**Williams, L.M., Morgan, P.J., Hastings, M.H., Davidson, G. and Howell, H.E. (1989)** Melatonin receptor sites in the Syrian hamster brain and pituitary: localization and characterization using [<sup>125</sup>I] iodomelatonin. *J. Neuroendocrinol.* 1, 315-329.

**Withyachumnarnkul, B., Limpanawattanakul, M. and Trakulrungsi, W. (1986)** Retention of radioactive substances in the hypothalamus, anterior pituitary, and reproductive organs of male rats after <sup>3</sup>H-melatonin administration. *Life. Sci.* 38, 1757-1765.

**Withyachumnarnkul, B., Nonaka, K. O., Attia M.A. and Reiter, R.J. (1990a)** Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon- $\gamma$ . *J. Pineal Res.* 8, 313-322.

**Withyachumnarnkul, B., Nonaka, K. O., Santana, C., Attia M.A. and Reiter, R.J. (1990b)** Interferon- $\gamma$  modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J. Interferon Res.* 10, 403-411.

**Withyachumnarnkul, B., Reiter, R.J., Lerchl, A., Nonaka, K. O. and Stokkan, K.A. (1991)** Evidence that interferon- $\gamma$  alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. *Int. J. Biochem.* 12, 1397-1401.

**Yatani, A., Mattera, R., Codina, J., Graf, R., Okabe, K., Padrell, E., Iyengar, R., Brown, A.M. and Birnbaumer, L. (1988)** The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel is stimulated by three distinct G<sub>i</sub>  $\alpha$ -subunits. *Nature* 336, 680-682.

- Yeaman, C. and Rapraeger, A.C. (1993)** Post-transcriptional regulation of syndecan-1 expression by cAMP in peritoneal macrophages. *J. Cell. Biol.* 122, 941-950.
- Yous, S., Andrieux, J., Howell, H.E., Morgan, P.J., Renard, P., Pfeiffer, B., Lesieur, D. and Guardiola-Lemaitre, B. (1992)** Novel naphthalenic ligands with high affinity for the melatonin receptor. *J. Med. Chem.* 35, 1484-1486.
- Yu, Z.H., Tuan, H., Lu, Y. and Pang, S.F. (1991)** [<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. *Life Sci.* 125, 1785-178.
- Yuan, H., Lu, Y. and Pang, S.F. (1991)** Binding characteristics and regional distribution of [<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the brain of the human fetus. *Neurosci. Lett.* 130, 229-232.
- Yung, L.Y., Tsim, S.T. and Wong, Y.H. (1995)** Stimulation of cAMP accumulation by the cloned *Xenopus* melatonin receptor through G<sub>i</sub> and G<sub>z</sub> proteins. *FEBS Lett.* 372, 99-102.
- Zalewski, P.D., Forbes, I.J., Giannakis, C., Cowled, P.A. and Betts, W.H. (1990)** Synergy between zinc and phorbol ester in translocation of PKC to cytoskeleton. *FEBS Lett.* 273, 131-134.
- Zemkova, H. and Vanecek, J. (1997)** Inhibitory effect of melatonin on gonadotrophin-releasing hormone-induced Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in pituitary cell of newborn rats. *Neuroendocrinology* 65, 276-283.
- Zisapel, N. and Laudon, M. (1983)** Inhibition by melatonin of dopamine release in rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res.* 272, 378-381.
- Żylińska, K., Komorowski, J., Robak, T., Mucha, S. and Stępień, H. (1995)** Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *J. Neuroimmunol.* 56, 187-190.

El Presidente

D. Alms

El Secretario



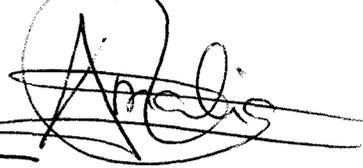
Vocal 1

C Osuna

Vocal 2

Cet elms Alms

Vocal 3



Fecha, 29/10/99

Calificación: Sobraliente Cum-laudo



El Doctorando