

819332592

011866317

124568326

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
folio 07 número 378 del libro
correspondiente. 10-05-07
Sevilla, 10-05-07
El Jefe del Negociado de Tesis,
Pedro Laffitte



TD
134

SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL SISTEMA INMUNE EN
DIFERENTES MODELOS MURINOS Y
DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR KNOCKOUT
CONDICIONAL PARA MELATONINA

Tesis Doctoral presentada por
ARACELI GÓMEZ
ARACELI GÓMEZ CORVERA



Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla 2007

ABREVIATURAS

$^{125}\text{I-Mel}$	2- ^{125}I - iodomelatonina
AADC	5-hidroxitriptófano descarboxilasa
AANAT	Arilalkilamina-N-acetiltransferasa
AC	Adenilato ciclasa
AcCoA	Acetil Coenzima A
ACTH	Hormona corticotropina
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AMPc	Adenosín monofosfato ciclico
AP-1	proteína activadora-1
BCA	Ácido bicinconínico
BKCa^{2+}	Canales de potasio activados por calcio
CaM	Calmodulina
CAT	Catalasa
CFU-GM	Células progenitoras para macrófagos y granulocitos
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
Ci	Curio
CKII	Caseína quinasa tipo II
CMV	Citomegalovirus
ConA	Concavalina A
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
CRF	Factor liberador de corticotropina
CRX	Factor de transcripción (cone-rod homeobox)
DAG	Diacilglicerol
DBD	Dominio de unión a ADN
dNTPs	Desoxinucleótidos fosfato
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ER	Receptor de estrógenos
FSH	Hormona folículo estimulante
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GC	Guanilato ciclasa
GIRK	Canales de potasio rectificadores entrantes
GMPc	Guanidil monofosfato ciclico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPx	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GRP	Péptido de liberación de gastrina
HIOMT	Hidroxindol-O-metiltransferasa
HPA	Eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal
HREs	Elementos de respuesta a hormona
ICER	Represor temprano de los genes inducibles por AMPc
IEG	Genes de expresión temprana
IFN γ	Interferón γ
IML	Células intermediolaterales

IP ₃	Inositoltrifosfato
IPTG	Isopropil-β-D-tio-galactósido
LBD	Dominio de unión al ligando
LH	Hormona luteinizante
LPS	Lipopolisacárido
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MEL	Melatonina
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
MIOS	Citoquinas opioides
MRR	Receptores relacionados con melatonina
MT ₁	Receptor de membrana para melatonina tipo 1
MT ₂	Receptor de membrana para melatonina tipo 2
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NAS	N-acetilserotonina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
OT	Oxitocina
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCE-1	Elemento conservado de fotoreceptor
PHA	Fitohemaglutinina
PIRE	Elemento regulador pineal
PK	Proteína quinasa
PLC	Fosfolipasa C
PT	Pars tuberalis
PVN	Núcleo paraventricular hipotalámico
QR ₂	Enzima quinona reductasa
RGCs	Células ganglionares retinales
RHT	Tracto retinohipotalámico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROR	Receptores huérfanos retinoicos
ROREs	Elementos de respuesta a ROR
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Transcriptasa reversa-PCR
RZR	Receptores Z retinoicos
SadM	S-adenosil-L-metionina
SCG	Ganglio cervical superior
SCN	Núcleo supraquiasmático
SOD	Superóxido dismutasa
SOM	Somatostatina
SP	Sustancia P
TCR	Receptor de células T
TetO ₂	Operadores de tetraciclina
TetR	Proteína represora que une tetraciclina
TPH	Triptófano hidroxilasa
VP	Vasopresina
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

INDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- LA GLÁNDULA PINEAL	3
1.1. Anatomía de la glándula pineal	3
1.1.1. Morfología	3
1.1.2. Células presentes en la glándula pineal	4
1.2. Inervación	6
1.2.1. Vía Retino-Hipotalámico-Pineal	6
1.2.2. Vías centrales y parasimpáticos	8
2. LA MELATONINA	9
2.1. Biosíntesis de melatonina	10
2.1.1. Enzimas clave en la síntesis de melatonina	11
2.1.1.1. Arilalquilamina-N-Acetiltransferasa	11
2.1.1.2. Hidroxindol-O-Metiltransferasa	14
2.1.2. Transducción de señal noradrenérgica en la glándula pineal	17
2.1.3. Síntesis circadiana	22
2.1.4. Síntesis extrapineal de melatonina	24
2.2. Mecanismos de acción de la melatonina	25
2.2.1. Receptores de membrana para melatonina	26
2.2.1.1. Identificación y localización de los sitios de unión para melatonina ...	26
2.2.1.2. Nomenclatura y estructura molecular	27
2.2.1.3. Distribución y respuestas fisiológicas de los receptores de membrana	28
2.2.1.4. Transducción de señal a través de los receptores MT ₁ y MT ₂	30
2.2.1.5. Regulación de la transducción de señal	31
2.2.2. Receptores nucleares para melatonina	32
2.2.2.1. Generalidades de los receptores nucleares	32
2.2.2.2. Subfamilia ROR/RZR	34
2.2.2.3. Ligandos de los receptores ROR/RZR	34
2.2.2.4. Distribución y regulación	34
2.2.2.5. Participación de los receptores ROR/RZR en la regulación de procesos fisiológicos	35
2.3. Funciones biológicas mediadas por la melatonina	36
2.3.1. La melatonina y la reproducción	36
2.3.2. La melatonina como sincronizador de los ritmos circadianos	38
2.3.3. Melatonina y sistema inmune	41
2.3.3.1. Red neuro-endocrino-inmune	41
2.3.3.2. Interconexión entre la pineal y el sistema inmune	43
2.3.3.3. Sistema inmune y fotoperiodo	43
2.3.3.4. Efectos de la pinealectomía sobre el sistema inmune	45
2.3.3.5. Efectos de la administración de melatonina sobre el sistema inmune	46
2.3.3.5. Receptores de melatonina en el sistema inmune	50
2.3.4. La melatonina como agente antioxidante	51

2.3.5. Efectos oncostáticos de la melatonina	53
II.- OBJETIVOS	57
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	61
1.- SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL SISTEMA INMUNE EN DIFERENTES MODELOS MURINOS	63
1.1. Animales	63
1.2. Obtención de las muestras	63
1.2.1. Obtención de plasma y células	63
1.2.2. Obtención de tejidos	65
1.3. Cultivos de células	65
1.4. Extracción de ARN	65
1.4.1. Extracción a partir de células	65
1.4.2. Extracción a partir de tejidos	66
1.5. Retrotranscripción	67
1.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	68
1.6.1. Diseño de la PCR	68
1.7. Medida de la actividad N-acetiltransferasa	70
1.8. Medida de la actividad hidroxindol-O-metiltransferasa	72
1.9. Cuantificación de proteínas	74
1.10. ELISA	75
2.- DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR KNOCKOUT CONDICIONAL PARA MELATONINA	76
2.1. Diseño experimental	76
2.1.1. Vector de expresión	76
2.1.2. Vector represor	77
2.1.3. Mecanismo de Represión	78
2.1.4. Modelo celular	79
2.2. Secuencia génica de la HIOMT y diseño de los cebadores	79
2.3. Amplificación de la HIOMT mediante PCR	80
2.3.1. <i>Touchdown</i> PCR	81
2.4. Extracción del DNA a partir del gel	81
2.5. Clonación de la HIOMT en el vector pGEM-T	82
2.6. Transformación de células competentes con pGEMT-HIOMT	83
2.7. Purificación del plásmido pGEMT-HIOMT	84
2.8. Secuenciación	85
2.9. Liberación de la secuencia insertada (HIOMT) tras la digestión con enzimas de restricción	85
2.10. Clonación de la HIOMT en el vector de expresión del sistema TReX	86
2.10.1. Ligación	86
2.11. Transformación	87
2.1.2. Comprobación de la presencia del inserto en el vector tras la digestión con enzimas de restricción	87

2.13. Secuenciación del vector TREx-HIOMT de la secuencia antisentido clonada	88
2.14. Maxiprep de TREx-HIOMT	88
2.15. Transfección de las células JurkatTet	89
2.16. Inducción de la expresión del ARN	90
3. Análisis estadístico	91
IV.- RESULTADOS	93
1.- EXPRESIÓN DEL GEN AANAT EN DIFERENTES TEJIDOS DEL SISTEMA INMUNE EN TRES CEPAS DE RATÓN	95
1.1. Expresión de la enzima AANAT en glándula pineal	95
1.1.1. Estudio de los exones 3 y 4, exones 1 y 2	95
1.2. Expresión del enzima AANAT en timo, bazo y médula ósea	96
1.2.1. Estudio de los exones 3 y 4	96
1.2.2. Estudio de los exones 1 y 2	97
2.- SÍNTESIS DE MELATONINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) EN TRES CEPAS DE RATÓN. ESTIMULADAS CON PHA.....	98
2.1. Expresión del gen del enzima AANAT	98
2.1.1. Estudio de los exones 3 y 4	98
2.1.2. Estudio de los exones 1 y 2	99
2.2. Actividad Enzimática	100
2.2.1. Medida de la actividad N-Acetiltransferasa (NAT)	100
2.2.2 Medida de la actividad Hidroxi-O-metiltransferasa (HIOMT)	100
2.3. Producción de melatonina	101
2.3.1. Producción de melatonina en glándula pineal	101
2.3.2. Producción de melatonina en plasma	102
2.3.3. Producción de melatonina en sobrenadantes de PBMC	103
3.- DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR KNOCKOUT CONDICIONAL PARA MELATONINA	104
3.1. Amplificación de la HIOMT mediante PCR	104
3.2. Clonación de la HIOMT en el vector pGEMT y transformación	105
3.3. Secuenciación de la HIOMT	106
3.4. Liberación de la secuencia insertada (HIOMT) de pGEMT tras la digestión con las enzimas de restricción	106
3.5. Clonación de la HIOMT en el vector de expresión del sistema TREx	108
3.5.1 Digestión del vector de expresión	108
3.5.2. Ligación	108
3.6. Transformación	109

3.7. Secuenciación del vector TREx-HIOMT de la secuencia antisentido clonada.....	110
3.8. Maxiprep de TREx-HIOMT	111
3.9. Curva de sensibilidad a la zeocina	111
3.10. Transfección de las células JurkatTet	112
3.11. Inducción de la expresión del ARN antisentido	113
3.11.1 Actividad enzimática	113
3.11.2 Cuantificación de melatonina	114
V.- DISCUSIÓN	115
1. In vivo: estudiar la biosíntesis de melatonina en diferentes órganos y células del sistema inmune de tres cepas ratón: C57BL/6 y Swiss (deficientes en la síntesis de melatonina pineal) y C3H/HeNHsd (control).....	117
2. Estudio <i>in vitro</i> : desarrollo de un modelo celular knockout condicional para la síntesis de melatonina en una línea linfocítica humana (células Jurkat), utilizando un RNA antisentido frente al enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) último enzima y específico de la ruta biosintética de melatonina	124
VI.- CONCLUSIONES	129
VII.- BIBLIOGRAFÍA	133

INTRODUCCIÓN

1. - LA GLÁNDULA PINEAL

El ciclo solar ha influenciado la vida en la tierra desde los comienzos. Para adaptarse a los cambios de luz en el medio ambiente, los vertebrados han desarrollado un sistema especializado en generar un “mensaje fotoperiódico”, esto es la neurohormona melatonina. Noche a noche, la melatonina es rítmicamente sintetizada en la glándula pineal y secretada al torrente sanguíneo. De esta manera representa un “mensaje de la oscuridad” que codifica cambios estacionales en la duración del día y la noche. En mamíferos las células que producen melatonina en glándula pineal (pinealocitos) han perdido la sensibilidad directa a la luz y la capacidad para generar un ritmo endógeno, siendo características de los pinealocitos en la mayoría de las especies que no son mamíferos (Stehle y col., 2002). La regulación rítmica de la síntesis y secreción de la melatonina es controlada por un reloj endógeno localizado en el núcleo supraquiasmático (SCN), el cual está sincronizado con el ciclo luz/oscuridad mediante el tracto retinohipotalámico (RHT). La información lumínica es percibida por la retina y es transmitida al SCN, este transmite señales neuronales a la glándula pineal a través de una vía multisináptica. Este sistema permite a los mamíferos incluidos el hombre responder de manera anticipada a los cambios en el medio ambiente (fotoperiodo).

1.1.- Anatomía de la glándula pineal

1.1.1.- Morfología

La glándula pineal de mamíferos es una estructura neuroendocrina, secretora de la hormona melatonina (Lerner, 1958). Se deriva del tubo neural y está localizada entre el mesencéfalo y el diencefalo en el cerebro. Neuroanatómicamente, la pineal es descrita como una parte del epítalamo y de ese modo como parte del diencefalo (Figura 1a). La glándula pineal en humanos tiene una forma piramidal y esta localizada directamente sobre la parte dorsal del tallo cerebral. Sin embargo en otras especies tiene una estructura elongada. En roedores la glándula se subdivide en tres partes: (1) una glándula pineal superficial localizada en la superficie dorsal del cerebro, que esta inervada masivamente y contiene una densa red de vasos sanguíneos dentro de los cuales la melatonina es liberada, (2) una glándula pineal profunda localizada cerca del tercer ventrículo, constituida de pinealocitos funcionales que expresan los genes que codifican las enzimas para la síntesis

de melatonina y (3) una tercera parte denominada tallo pineal, que conecta la pineal profunda con la superficial (Figura 1b) (Moller y col., 2002a).

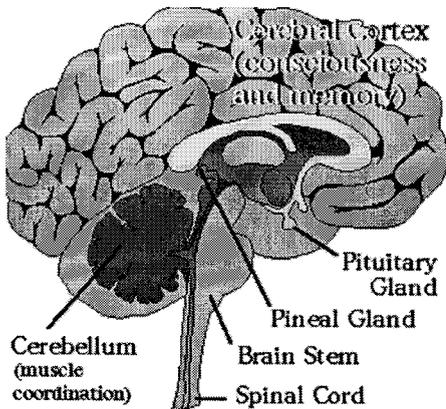


Figura 1a. Localización de la glándula pineal en humanos.

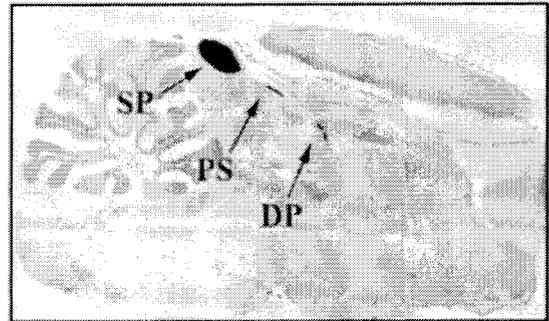


Figura 1b. Sección parasagital, cerebro de rata. Donde se observan las tres partes características de la pineal de roedores: DP, pineal profunda; SP, superficial; PS, tallo pineal.

1.1.2.- Células presentes en la glándula pineal

En el curso de la filogénesis, la glándula pineal ha sufrido notables transformaciones (Collin y col., 1971; Korf y col., 1998), desde los vertebrados inferiores que poseen verdaderos fotorreceptores hasta los mamíferos que tienen células neuroendocrinas. En todos los mamíferos investigados cinco tipos celulares han sido descritos: a) pinealocitos productores de hormona, b) células intersticiales, c) células fagocíticas perivasculares, d) neuronas y e) células similares a neuronas peptidérgicas (fig. 2).

El principal tipo celular del parénquima de la glándula pineal es el pinealocito, histológicamente se observan como grandes células (7-12 μm), con núcleo prominente y una apariencia granular. Del cuerpo celular emergen varias prolongaciones que a menudo terminan con un ensanchamiento en estrecho contacto con el endotelio capilar (Figura 2).

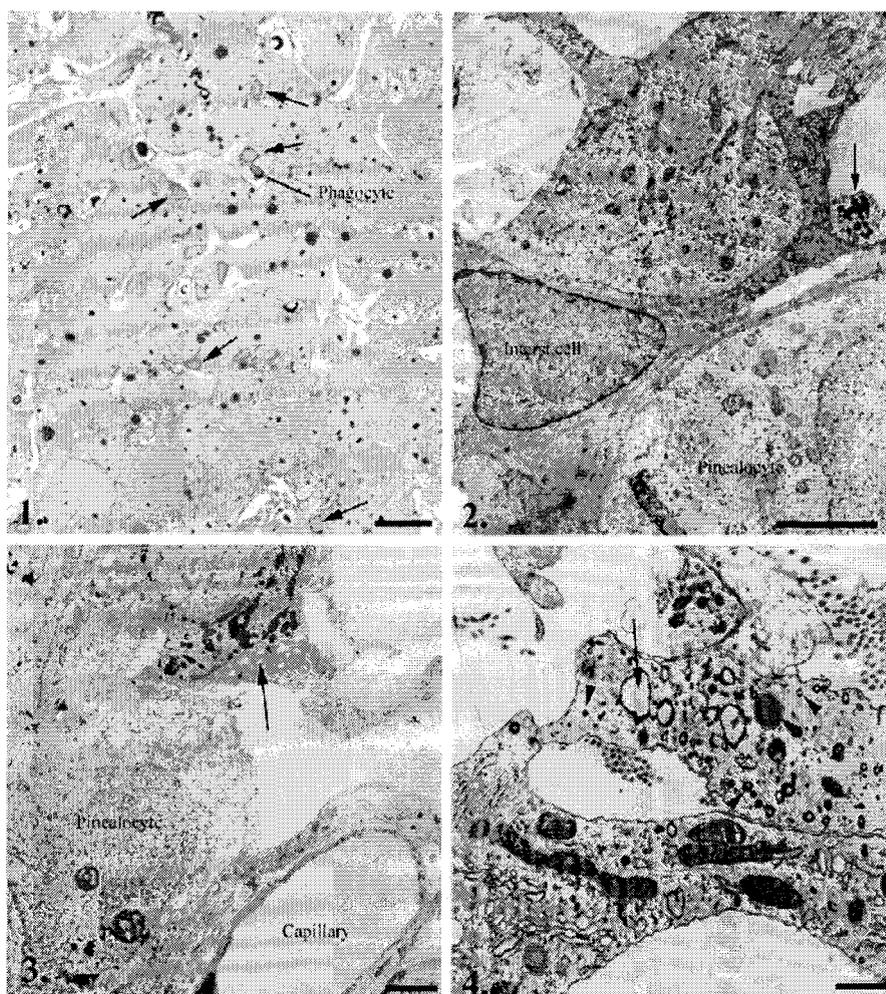


Figura 2. Micrografías de las células encontradas en la glándula pineal.

Las células intersticiales son más pequeñas que los pinealocitos y presentan un núcleo oscuro con forma triangular, también el citoplasma es más oscuro que el pinealocito. Estas células tienen forma de estrella con escasas prolongaciones citoplásmicas.

El tercer tipo de células son las fagocíticas confinadas a espacios perivasculares y han sido descritas en la última década. Estudios inmunocitoquímicos han revelado que estas células perivasculares contienen proteínas de superficie, las cuáles son marcadores para macrófagos y células microgliales. Los fagocitos también son células presentadoras de antígeno ya que presentan inmunoreactividad para el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) (Sato y col., 1996)

En algunas especies de mamíferos, por ejemplo el hombre, la glándula pineal contiene neuronas clásicas, caracterizadas por la sustancia Nissl (Matsushima y col., 1994). En

algunas especies, estas neuronas forman un ganglio dentro de la glándula pineal. El concepto actual es que muchas de las neuronas intrapineales son de origen parasimpático y están inervadas por ganglios periféricos.

Finalmente células similares a neuronas peptidérgicas han sido observadas en pineales de algunos roedores, como el hámster europeo y en pineales humanas, estas células presentan inmunoreactividad a encefalina y en otras especies a vasopresina y oxitocina. Su presencia en la glándula pineal de varias especies sugiere una función regulatoria paracrina de los pinealocitos. (Moller y col., 2002b).

1.2.- Inervación

Desde hace más de cuatro décadas se conoce que la síntesis y secreción de melatonina por la glándula pineal es inhibida por la luz recibida por los fotorreceptores retinales y transmitida al cerebro por medio del nervio óptico. Después de que el núcleo supraquiasmático fuera identificado como el reloj circadiano endógeno para el ritmo de melatonina en la glándula pineal, muchos estudios basados en lesiones selectivas, animales knockout y trazadores neuroanatómicos han mapeado las conexiones entre el núcleo supraquiasmático y la glándula pineal (Moller y col., 2002). La glándula pineal de mamíferos esta inervada principalmente a través de una vía central y otra de origen parasimpático. En la actualidad se puede afirmar que la glándula pineal es una estructura neuroendócrina diana de un gran número de neurotransmisores de diversos orígenes que llegan a ella a través de diversas vías neurales (Simonneaux y col., 2003).

1.2.1.- Vía Retino-Hipotalámico-Pineal

Es una vía neural multisináptica que comunica la retina con la glándula pineal a través del SCN. La información lumínica es transmitida desde la retina por medio de fotorreceptores circadianos no visuales (melanopsina) a la región ventrolateral del SCN, a través del RHT. Las llamadas células ganglionares retinales (RGCs) productoras de melanopsina, envían proyecciones axonales al SCN a través de una vía monosináptica, el RHT, transmitiéndole la señal lumínica. En respuesta a la luz, glutamato (Glu) (Ding y col., 1997) y el péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) (Hannibal y col., 1997) son liberados desde las terminales del RHT, estimulando a sus receptores presentes en las neuronas del SCN (Figura 3).

hipotálamo-pineal, la síntesis de melatonina está regulada por el SCN a través de neuronas principalmente gabaérgicas, las cuales inervan al núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) (Klein y col., 1983). Las neuronas dorsales y parvocelulares del PVN ricas en VIP, VP y oxitocina (OT), inervan las células intermediolaterales (IML) de la zona cervical de la espina dorsal, las cuales envían sus aferencias hacia la zona rostral del ganglio cervical superior (SCG), que en último lugar proyecta sobre la glándula pineal a través de terminaciones noradrenérgicas, provocando la estimulación de la síntesis de melatonina.

1.2.2.- Vías centrales y parasimpáticas

En humanos y otros mamíferos la inervación pineal mejor estudiada es la vía simpática noradrenérgica (NE), formada por cuerpos celulares localizados en el ganglio cervical superior (SCG) que alcanza la pineal a través del nervio coronario.

Numerosos estudios con trazadores neuroanatómicos, frecuentemente combinados con técnicas inmunohistoquímicas para neurotransmisores, han confirmado la existencia de conexiones neuronales entre el cerebro y la glándula pineal en diversas especies. Aferencias procedentes de diversas estructuras centrales como el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), el IGL, núcleo rafe dorsal, el núcleo habernular y el hipotálamo lateral llegan a la glándula pineal. Los neurotransmisores observados en esas fibras centrales son principalmente neuropéptidos, especialmente VP y OT.

La inervación parasimpática de la glándula pineal procede fundamentalmente de los ganglios pterigopalatino, esfenopalatino y ótico. La demostración de fibras colinérgicas y VIPérgicas han sido observadas en la glándula pineal de diversas especies. La demostración de receptores y efectos bioquímicos de ligandos colinérgicos y VIPérgicos en la glándula pineal confirman la existencia de un control parasimpático de la actividad pineal (Simonneaux y col., 2003).

Además de las tres vías descritas, nuevos estudios anatómicos han mostrado que el ganglio trigémino, hasta ahora considerado un ganglio sensorial, emite proyecciones ricas en sustancia P (SP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y PACAP hacia la glándula pineal de mamíferos (Figura 3).

2.- LA MELATONINA

La melatonina es una neurohormona sintetizada y secretada principalmente en la glándula pineal. Fue aislada por primera vez por el dermatólogo americano Aaron Lerner y sus colaboradores en 1958 (Lerner, 1958), mientras investigaban la sustancia que causaba el aclaramiento en la piel de anfibios y que estaba contenida en la glándula pineal de mamíferos. Debido a esta propiedad y al descubrimiento de que en su ruta biosintética estaba involucrada la serotonina, se le dio el nombre de melatonina. Esta sustancia fue identificada como una indolamina que se denomina químicamente N-acetil-5-metoxitriptamina (figura 4).

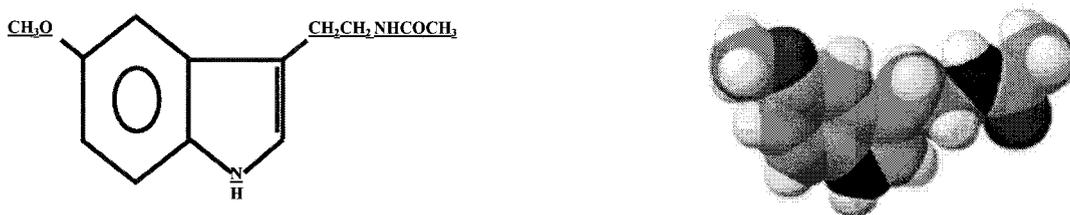


Figura 4. Estructura química (C₁₃H₁₆N₂O₂) y tridimensional de la melatonina.

Es una molécula altamente lipofílica siendo poco soluble en agua y muy soluble en etanol, debido a esto y a su pequeño tamaño, tras su síntesis en el pinealocito difunde a través de la membrana plasmática, no almacenándose en la célula y vertiéndose al torrente sanguíneo, así llega a los diferentes órganos diana, como son el sistema nervioso central y otros tejidos periféricos. En plasma la mayor parte de la melatonina (60-70 %) viaja unida a albúmina (Pardridge y col., 1980), y el resto circula libremente. Su vida media es de aproximadamente 20 minutos (Gibbs y col., 1981), alrededor del 90% de la melatonina es degradada por el hígado y eliminada por los riñones (Kveder y col., 1961).

2.1 Biosíntesis de melatonina

Axelrod y sus colaboradores en 1960 describieron la presencia en la glándula pineal de las dos enzimas clave involucradas en la biosíntesis de melatonina, lo cual dio a conocer la ruta biosintética. La síntesis de la melatonina en la glándula pineal está bien documentada (Sugden y col., 1985). Dicha biosíntesis se inicia con la captación de triptófano de la circulación de forma activa por los pinealocitos el cual se emplea de forma mayoritaria para la síntesis de indolaminas (Figura 5). El paso inicial de la ruta consiste en la hidroxilación de triptófano a 5-hidroxitriptófano por la acción de la triptófano hidroxilasa (TPH) en las mitocondrias de los pinealocitos. El 5-hidroxitriptófano producido es descarboxilado a serotonina (5-hidroxitriptamina) por medio de la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (AADC) en el citosol. Parte de la serotonina es derivada hacia la síntesis de melatonina (ruta fisiológica más importante), proceso que se lleva a cabo en dos pasos. En el primero, la arilalkilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) cataliza la acetilación de la serotonina a N-acetilserotonina que finalmente es transformada a melatonina por la acción de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) que le transfiere un grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina.

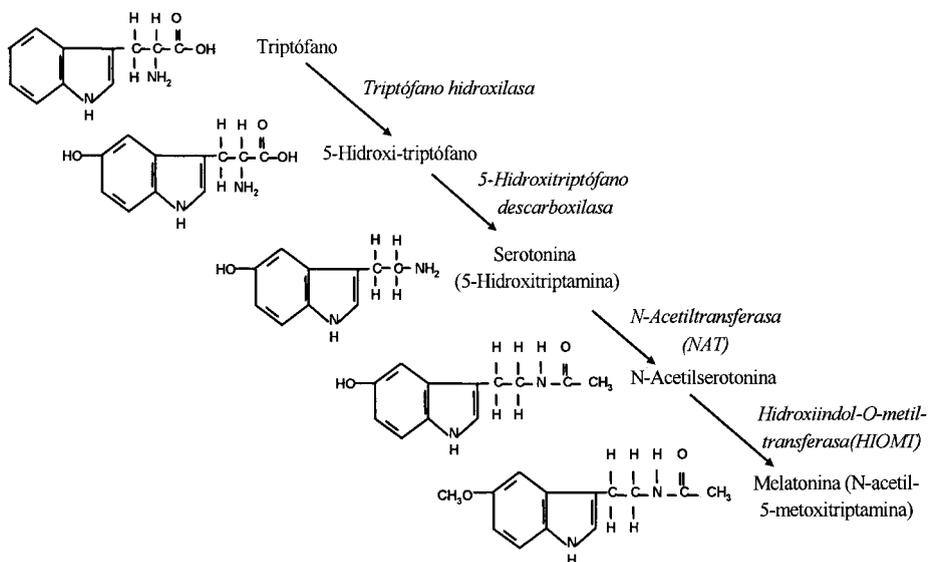


Figura 5. Ruta biosintética de la melatonina.

2.1.1.- Enzimas clave en la síntesis de melatonina

2.1.1.1.- Arilalquil-N-acetiltransferasa (AANAT)

En la glándula pineal existen dos enzimas capaces de N-acetilar a la serotonina, denominadas genéricamente N-acetiltransferasas (NAT). La primera que se identificó fue la arilamina-N-acetiltransferasa (A-NAT o NAT), mientras que la segunda se denomina arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT) y es la principal responsable de N-acetilar a la serotonina en el pinealocito, usando como donador al acetyl Coenzima A (acetyl-CoA) (Voisin y col., 1984), por ello también se le denomina serotonina-N-acetiltransferasa.

El cDNA que codifica para la AA-NAT ha sido clonado en diferentes especies de mamíferos, primero en rata (Borjigin y col., 1995), en humanos (Coon y col., 1996) y en ratón (Roseboom y col., 1998), presentando escasas diferencias interespecíficas en su secuencia génica (Klein y col., 1997). El gen de la *Aa-nat* está localizado en el cromosoma 11 en el ratón, en posición 10q32.3 (Yoshimura y col., 1997) y en el humano en el cromosoma 17q25 (Coon y col., 1996). Está constituido por cuatro exones y tres intrones (Figura 6). En mamíferos, el gen codifica para un solo transcrito el cual puede variar entre 1 y 1.7 Kb dependiendo de la especie. En la mayoría de las especies se expresan altos niveles de AA-NAT en la glándula pineal y retina, y en menor grado en tejidos nerviosos como pars tuberalis (PT), SCN e hipocampo, y en estructuras periféricas, principalmente testículos y ovarios (Simonneaux y Ribelayga, 2003).

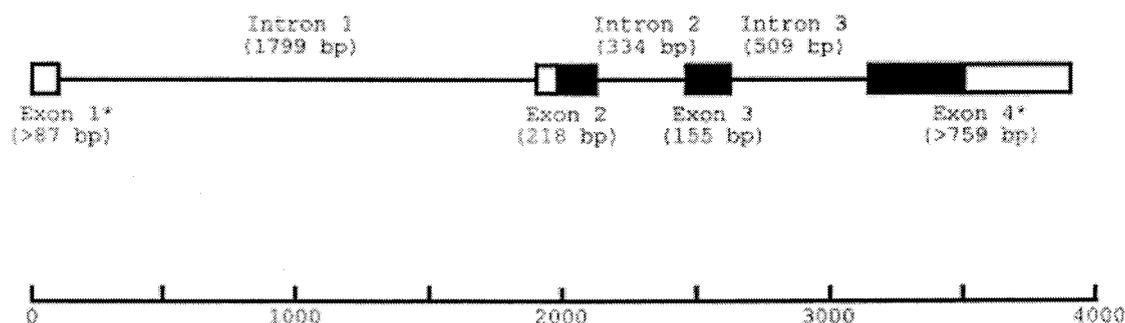


Figura 6. Estructura parcial del gen de la AA-NAT de ratón.

La región promotora del gen *Aa-nat* contiene un elemento de respuesta a AMPc (CRE), una secuencia similar al CRE, una caja CCAAT invertida, un sitio de activación para la proteína activadora-1 (AP-1), además de una secuencia denominada caja-E (E-box). También posee un elemento regulador pineal (PIRE) que une el factor de transcripción

CRX (*cone-rod homeobox*) exclusivo de fotorreceptores y pinealocitos. El sitio CRE es capaz de unir la forma fosforilada de la proteína de unión a CRE (CREB), p-CREB, mientras que la activación de la caja CCAAT por proteínas de unión específicas y la activación del sitio CRE también parecen importantes para la activación del gen (Figura 7).

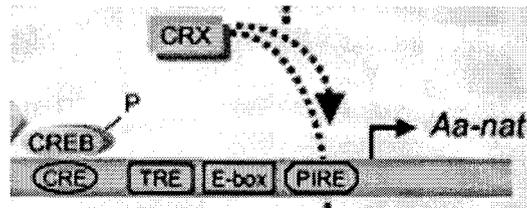


Figura 7. Región promotora del gen *Aa-nat* en pinealocitos.

La AA-NAT de vertebrados es una proteína citosólica soluble de aproximadamente 23 kDa. Tiene una región N-terminal involucrada en la unión a arilalquilaminas, mientras que la C-terminal está implicada en la unión del cofactor acetyl-CoA. Posee varios sitios de fosforilación para PKA, PKC y caseína quinasa tipo II (CKII) (Figura 8). En los últimos años se ha descubierto que la activación de la proteína está mediada por fosforilación de la PKA sobre los residuos T³¹ y/o S²⁰⁵. Esta fosforilación promueve la formación de un complejo entre la AA-NAT y la proteína 14-3-3, lo cuál no solo promueve la activación de la enzima, aumentando hasta diez veces su afinidad por la serotonina, sino que también la protege de la destrucción por el sistema proteosomal citosólico y fosfatasas (Ganguly y col., 2001 ;Klein y col., 2002). La formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína (Cys) 61 y 177 ha sido también descrita como un hecho fundamental para la activación catalítica de la enzima.

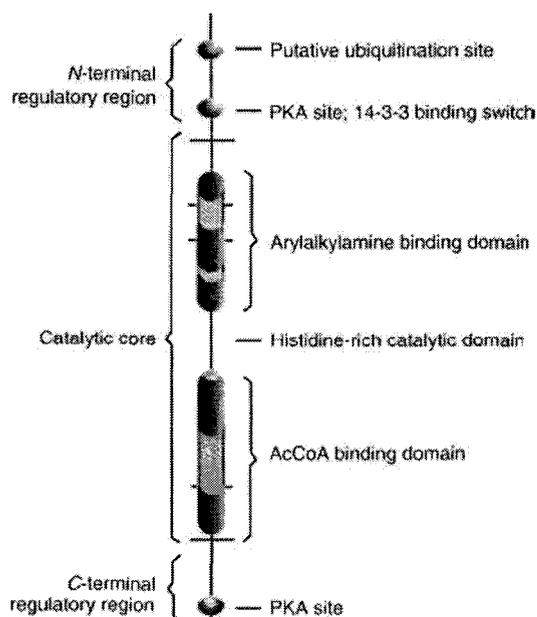


Figura 8. Estructura de la AA-NAT. Los dominios funcionales de la proteína están indicados en el dibujo.

La actividad de la AA-NAT se incrementa en la noche, requiriendo una neo-transcripción de su gen y una neo-síntesis de su proteína. La proteína es muy inestable ($T_{1/2}$ aproximadamente de 3 a 5 min), así como la actividad enzimática. Al término de la noche o después de la exposición a la luz, existe una disminución rápida (pocos minutos) de la actividad AA-NAT, la cuál es independiente de los niveles de ARNm y depende de mecanismos post-traduccionales principalmente. Debido al pronunciado aumento de la actividad AA-NAT observado en la noche en la glándula pineal, esta enzima es considerada la enzima generadora del ritmo, así como la enzima limitante de la síntesis de melatonina. Sin embargo, se ha observado que tras la estimulación del pinealocito, tanto *in vivo* como *in vitro*, no toda la NAS sintetizada por la AA-NAT es utilizada por la HIOMT para la síntesis de melatonina (Miguez y col., 1997), sugiriéndose que al menos en condiciones de máxima estimulación del pinealocito, más que la AA-NAT, la HIOMT podría ser la enzima limitante del proceso.

2.1.1.2. Hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT)

La HIOMT se presenta de forma muy abundante en la glándula pineal, representando entre un 2 y un 4% de su fracción proteica, siendo la encargada de transferir un grupo metilo desde el cofactor S-adenosil-L-metionina (SadM) a su sustrato indólico, la NAS (Baldessarini y col., 1966).

El cDNA fue aislado por primera vez de la vaca (Ishida y col., 1987), después en humanos (Donohue y col., 1993), presentando grandes diferencias entre especies. El gen de la *Hiomt* humano es el mejor estudiado (Donohue y col., 1993; Rodríguez y col., 1994; Bernard y col., 1995), está localizado en la región pseudoautosomal del cromosoma X y presenta dos regiones promotoras, las cuales contienen diferentes elementos reguladores (Figura 9). El promotor A contiene una secuencia CAATTAAG en la posición -27 no presente en el promotor B, denominada elemento conservado de fotoreceptor (PCE-1), el cual reconoce factores de transcripción específicos de retina. El promotor B contiene una secuencia ATGCAAAT en la posición -59, la cual puede ser reconocida por dos factores de transcripción, Oct-1 (ubiquamente expresado) y Oct-2 (específico de células linfoides). También presenta una secuencia de reconocimiento para el factor Ap-1 en la posición -166 y un elemento CRE en la posición -419. A pesar de las diferencias descritas, ambos promotores también presentan semejanzas. En este sentido, se ha descrito la presencia de una secuencia muy conservada presente en ambos promotores (TAATC/T), denominada elemento regulador pineal (PIRE), también presente en el promotor de la AA-NAT, el cual es un sitio de unión para el factor de transcripción CRX, actuando como activador transcripcional del gen de la *Hiomt*. Actualmente se piensa que el promotor B es el usado en la mayoría de los tejidos que portan el gen, ya que se ha detectado su presencia en todos aquellos estudiados (retina, cerebro y pineal), y además presenta en su secuencia el elemento reconocido por Oct-1, un factor ubiquamente expresado. En cambio, el promotor A parece ser exclusivo de retina, debido a que sólo se ha detectado en este tejido y a que presenta en su secuencia el elemento PCE-1, específico de retina. Dependiendo del uso de uno u otro de los promotores, el transcrito de la HIOMT puede tener 9 o 10 exones. Los exones 1A y 1C son el resultado de la expresión a través del promotor A, mientras que a partir de la transcripción del promotor B se obtiene un transcrito más corto ya que carece del exon 1A y posee el 1B, el cual es idéntico al 1C a excepción de una adición de 36 pb en dirección 5' (Bernard y col., 1995; Li y col., 1998; Bernard y col., 2001) (Figura 9).

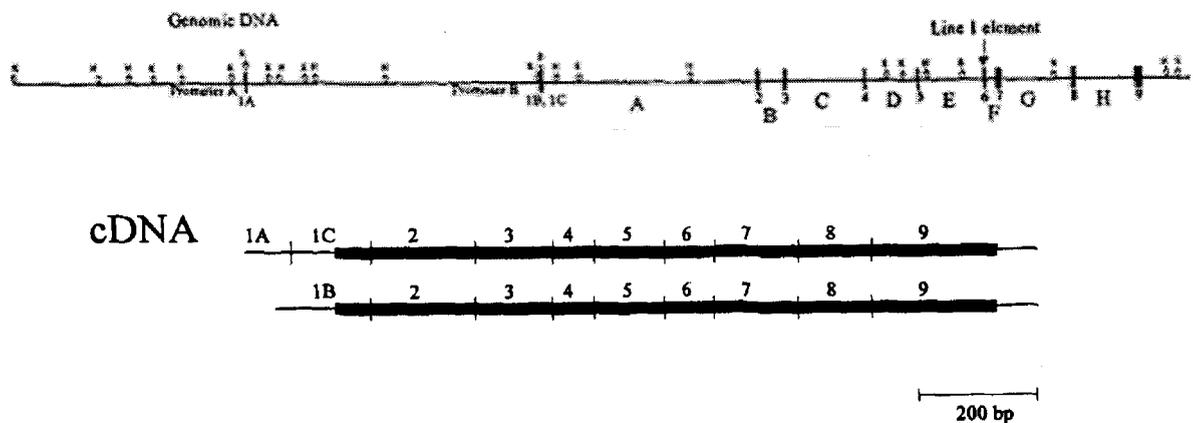


Figura 9. Gen (arriba) y transcritos (abajo) de la *Hiomt* humana.

Además del uso diferencial de promotores, a partir del gen *Hiomt* humano se pueden codificar tres transcritos diferentes, producto de *splicing* alternativo en los exones 6 y/o 7 (Figura 10). Los transcritos que carecen del exon 6, el cuál esta formado por un elemento repetitivo del tipo LINE-1, parecen ser los más abundantes (el producto 2 en la figura 10). Con respecto a los promotores, a partir del B se pueden obtener los tres transcritos, mientras que a través del A sólo se ha detectado la transcripción de dos de ellos, no presentándose el que porta el exon 6 (Rodríguez y col., 1994).

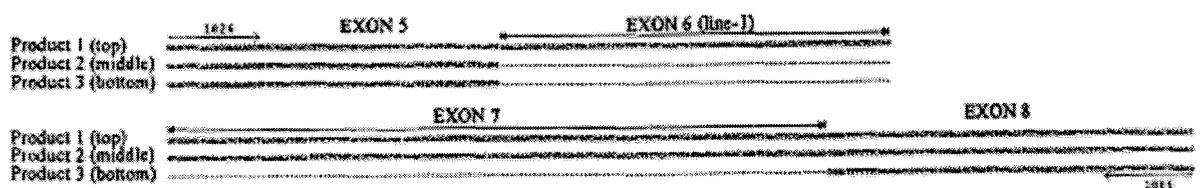


Figura 10. Transcritos alternativos de la *Hiomt* humana, productos 1, 2 y 3. Los exones son mostrados con líneas gruesas y las porciones perdidas con líneas delgadas. Los límites de los exones 6 y 7 son definidos con flechas.

La secuencia de aminoácidos de la HIOMT presenta sitios sensibles a fosforilación por PKC, CKII y tirosina quinasa. En las especies estudiadas hasta ahora, la enzima tiene masa molecular de 76-78 kDa y está compuesta por dos subunidades similares de 39 kDa cada una (Voisin y col., 1988; Bernard y col., 1995)). Experimentos inmunoquímicos han

revelado gran heterogeneidad en la estructura proteica y en las propiedades enzimáticas entre especies. La proteína posee una gran estabilidad ($t_{1/2} > 24$ h).

En los últimos años se han publicado una serie de estudios sobre la regulación de la actividad de la HIOMT que, en contraste a lo que generalmente se había descrito al respecto, sugieren una implicación de la enzima en la regulación de la síntesis de melatonina. La actividad de la HIOMT en rata muestra un débil pero significativo aumento nocturno del 40-50% con respecto a los valores diurnos, este incremento persiste bajo condiciones constantes de oscuridad y es inhibido bajo luz constante (Ribelayga y col., 1999).

La expresión génica de la *Hiomt* también presenta altos valores diurnos, los cuales se duplican durante la noche, persistiendo en oscuridad constante y descendiendo rápidamente tras exposición lumínica nocturna. Estudios *in vivo* han evidenciado que la expresión rítmica del gen *Hiomt* en la pineal de rata presenta regulación β -adrenérgica, en cambio no ocurre lo mismo con la regulación de su actividad enzimática nocturna, la cual a corto plazo (6h), no está controlada por el sistema noradrenérgico. En cambio la actividad enzimática de la HIOMT a largo plazo sí parece estar regulada por la estimulación nocturna noradrérgica de la glándula pineal y parece deberse a la gran estabilidad que posee la proteína. Estos resultados parecen indicar que la expresión y la actividad de la HIOMT de pineal de rata, al menos a corto plazo, parecen estar sometidas a una compleja regulación en la que están involucrados diferentes neurotransmisores.

La demostración de una regulación específica de la actividad de la HIOMT sugiere que esta enzima, al contrario de lo que generalmente está descrito en la literatura, está involucrada en el ritmo de síntesis de la melatonina, sobre todo el ritmo en el patrón nocturno de aumento de melatonina, un parámetro importante para la transmisión de la información fotoperiódica. La actividad de la AA-NAT es más baja durante el día que la de la HIOMT y podría ser el factor limitante para la síntesis de melatonina. Por el contrario, durante la noche la actividad HIOMT es menor que la actividad AA-NAT y podría ser, por lo tanto, la enzima limitante para la producción de la hormona. Estas observaciones sugieren que la HIOMT está involucrada en la modulación fotoperiódica/estacional de la amplitud del pico nocturno de melatonina observado en varias especies fotoperiódicas (Simonneaux y Ribelayga, 2003).

2.1.2.- Transducción de señal noradrenérgica en la glándula pineal

Las observaciones de que la glándula pineal tiene una innervación noradrenérgica densa (Kappers, 1960), junto con aquellas que mostraban una supresión de la síntesis de melatonina tras la gangliotomía del SCG (Moore y col., 1974) fueron el origen de numerosos estudios farmacológicos, bioquímicos y moleculares, diseñados para conocer los efectos de la noradrenalina (NA) sobre la actividad metabólica de la glándula pineal.

La síntesis rítmica de melatonina se genera por el oscilador endógeno, localizado en el SCN, el cual traslada su actividad rítmica a través del eje hipotálamo-pineal, provocando una activación nocturna del SCG, con la subsecuente liberación de NA desde las terminaciones del nervio pineal simpático que estimula la síntesis de melatonina en la glándula pineal. La cantidad de NA liberada desde estas terminaciones simpáticas es cien veces superior durante la noche que durante el día (Drijfhout y col., 1996).

Tras la liberación de NA en la pineal, ésta se une a receptores β_1 adrenérgicos, ampliamente distribuidos en la membrana postsináptica pineal, los cuales están acoplados a través de una proteína Gs a una adenilato ciclasa (AC) sensible a calcio/calmodulina (Figura 11).

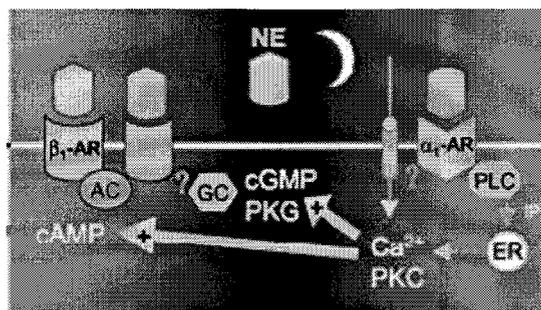


Figura 11. Interacción de la NA liberada desde las terminales simpáticas postganglionares con los receptores adrenérgicos en la membrana del pinealocito.

La densidad de los receptores β_1 presenta una variación circadiana, con una densidad más alta al término del día y comienzo de la noche, produciéndose un aumento nocturno en los niveles de AMPc que solo corresponden al 10 % de los niveles intracelulares nocturnos observados. El incremento máximo en los valores de AMPc solo se alcanza mediante un

mecanismo sinérgico que involucra la activación simultánea de los receptores α_1 adrenérgicos (Vanecek y col., 1985); (Sugden y col., 1985). Aunque la activación de los receptores α_1 no tienen un efecto directo sobre los niveles de AMPc, ésta potencia su producción inducida por los receptores β_1 a través de la activación de una proteína quinasa C (PKC) inducida por aumentos intracelulares de calcio y por la fosfolipasa C (PLC) mediante diacilglicerol (DAG). Este mecanismo sinérgico induce una producción nocturna de AMPc cien veces superior a la diurna. Ha sido demostrado un claro papel de la PKII en el control de la síntesis de melatonina mediado por AMPc.

Además del aumento intracelular de AMPc tras la estimulación noradrenérgica, también se observa un aumento en los niveles de GMPc de la misma magnitud que el observado sobre el AMPc. Al igual que sucede con la producción de AMPc, la activación de los receptores β_1 solo induce un ligero aumento en los niveles de GMPc, mientras que la activación conjunta de los receptores β_1 y α_1 inducen una liberación de GMPc 5-10 veces superior. El incremento inducido por los receptores β_1 esta mediado por una guanilato ciclasa (GC) acoplada a una proteína Gs, mientras que la potenciación inducida por los receptores α_1 involucra la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS), que a través de un aumento en los niveles de óxido nítrico (NO) estimula a la GC citosólica y por consiguiente la producción de GMPc (Spessert y col., 1995).

La estimulación noradrenérgica, también provoca un aumento en los niveles intracelulares de calcio (Marin y col., 1996), el cual está mediado por la activación específica de los receptores α_1 adrenérgicos que, por un lado, a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC) provocan un aumento en los niveles de inositoltrifosfato (IP_3) el cual induce la liberación de calcio desde los almacenes intracelulares y por otro, provoca una apertura en los canales de calcio permitiendo la entrada de calcio extracelular (Figura 11). Este aumento de calcio, sobre todo de origen extracelular, es el principal inductor de la traslocación y activación de la PKC. Por lo tanto, el efecto de los receptores α_1 sobre la acumulación de AMPc y GMPc está mediado por calcio y PKC. Concretamente, la potenciación de la acumulación de AMPc parece estar inducida por calcio a través de la activación de PKC y el posterior efecto de ésta sobre proteínas Gs o la AC, mientras que el efecto sobre el GMPc esta mediado por un complejo calcio/PKC y una PKC dependiente de calcio calmodulina requerida para la activación de la NOS.

El incremento inducido por la NA de los segundos mensajeros citados, provocan la activación de 4 vías de transcripción diferentes: a) fosforilación del factor de transcripción CREB, el cuál activa la transcripción de genes que portan sitios CRE en sus promotores, como la *Aa-nat* e *Icer*; b) expresión de genes de expresión temprana (IEG); c) expresión de genes reloj y d) expresión de factores de transcripción específicos de retina y pineal.

- a) La modulación a través de la vía de señalización dependiente de AMPc es un evento fundamental para el inicio, el mantenimiento y la terminación de la síntesis rítmica de melatonina. Los estímulos intracelulares dependientes de esta vía convergen básicamente en dos factores de transcripción, CREB e ICER, cuyo balance resulta fundamental sobre la expresión de los genes codificantes para las enzimas responsables de la síntesis de melatonina, las cuales poseen un sitio CREB en su región promotora, especialmente la *Aa-nat* (Burke y col., 1999). El aumento nocturno en los niveles de AMPc inducidos por la estimulación noradrérgica provoca una activación de la PKA II cuya subunidad catalítica se trasloca al núcleo provocando una intensa y rápida fosforilación del elemento CREB (p-CREB), la cual provoca su activación (Figura 12) (von Gall y col., 2000). La traslocación de la PKA II presenta una fuerte correlación con la secreción de melatonina. Entre los reguladores de CRE también se encuentran los productos del gen *Crem* (modulador de CRE). En la glándula pineal, *Crem* codifica una pequeña proteína la cual ejerce una fuerte inhibición sobre la transcripción inducida por CRE, debido a esto, recibió el nombre de represor temprano de los genes inducibles por AMPc (ICER).

Análisis comparativos entre las cinéticas de fosforilación de CREB y de transcripción de *Icer* a lo largo de la noche en glándula pineal de las cepas de ratón C3H (proeficiente para melatonina) y C57BL (deficiente), muestran que la transcripción rítmica de los genes que portan sitios CRE en la glándula pineal de roedores es directamente regulada por el balance entre el factor activador p-CREB y el inhibidor ICER. Los niveles de p-CREB son elevados durante la primera mitad de la noche decayendo gradualmente durante la segunda, mientras que la concentración máxima de proteína ICER se encuentra dos horas después de su máximo transcripcional, mostrando altos niveles de proteína durante el final de la noche y al amanecer. Sorprendentemente este perfil fue similar en las dos cepas de ratón,

indicando que esta regulación es independiente de la síntesis de melatonina (Stehle y col., 2002).

- b) Tras la activación noradrenérgica de la glándula pineal se ha observado la expresión de una serie de IEGs, los cuales, dan lugar a proteínas que mediante diferentes combinaciones en forma de dímeros actúan como factores de transcripción sobre los sitios AP-1 (Figura 12). Específicamente se ha detectado la expresión de *c-fos*, *c-jun*, *junB*, *junD*, NGFI-A y *Fra-2*, cuya expresión podría ser iniciada por PKA vía (p-CREB/CREB) PKC. La expresión de *c-fos* y *JunB* presentan un rápido y transitorio incremento al comienzo de la noche, el cual disminuye gradualmente a lo largo de la misma. La expresión de *c-jun* es parcialmente suprimida durante la noche. NGFI-A se incrementa al inicio de la noche manteniéndose elevado a lo largo de la misma. La regulación de la expresión de *Fra-2*, un factor de transcripción de carácter inhibitorio, es la mejor caracterizada, presentando niveles indetectables de ARNm y proteína durante el día y marcadamente altos durante la noche. Estas variaciones presentan un perfil circadiano y dependen principalmente de la regulación de los niveles de AMPc (Baler y col., 1995).
- c) Cada vez son más numerosos los datos que muestran que una gran cantidad de tejidos, además del SCN, están dotados con la maquinaria molecular propia de los osciladores circadianos, constituida por un grupo de genes que se expresan rítmicamente denominados genes reloj (Balsalobre y col., 1998; Yamazaki y col., 2000). En la glándula pineal de mamíferos se han identificado un nutrido grupo de ellos *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* y *Cry2*, cuya expresión muestra un perfil circadiano con un máximo nocturno que presenta un adelanto de dos horas con respecto al máximo de expresión observado en el gen *Aa-nat* (fig.12). El aumento nocturno en los niveles de *Per1* y *Cry2* está dirigido por el SCN a través de la inducción noradrenérgica de los receptores β_1 y el subsiguiente aumento en los niveles de AMPc, mientras que las variaciones en *Per2*, *Per3* y *Cry1* no están reguladas por NA. También los genes *Clock* *Bmal1*, se expresan en la glándula pineal con un ritmo circadiano opuesto, mientras que el máximo de expresión de *Clock* se detecta durante la noche, la expresión máxima de *Bmal1* se presenta durante el día. Aunque se ha mostrado la presencia de la maquinaria molecular propia de los osciladores circadianos en la glándula pineal, se necesitan más estudios para dilucidar si son solo

una reminiscencia evolutiva de la pineal de vertebrados inferiores o realmente ejercen una función específica sobre el metabolismo pineal.

- d) El factor de transcripción CRX ha sido caracterizado tanto en la glándula pineal como en la retina (Li y col., 1998) donde regula la expresión de genes mediante la unión al elemento regulador PIRE. La relación entre CRX y la síntesis de melatonina se sustenta en varias observaciones: El gen *Crx* se expresa fuertemente en la glándula pineal con un incremento nocturno tres veces superior al diurno; los promotores de los genes *Aa-nat* e *Hio1mt* presentan tres y dos copias del elemento PIRE, respectivamente (Figura 12) y la expresión de *Aa-nat* está fuertemente reprimida en ratones deficientes en CRX. Estas observaciones sugieren que CRX podría ejercer una importante función sobre la síntesis de melatonina actuando sinérgicamente con la vía activada por los receptores β_1 adrenérgicos (Simonneaux y Ribelayga 2003).

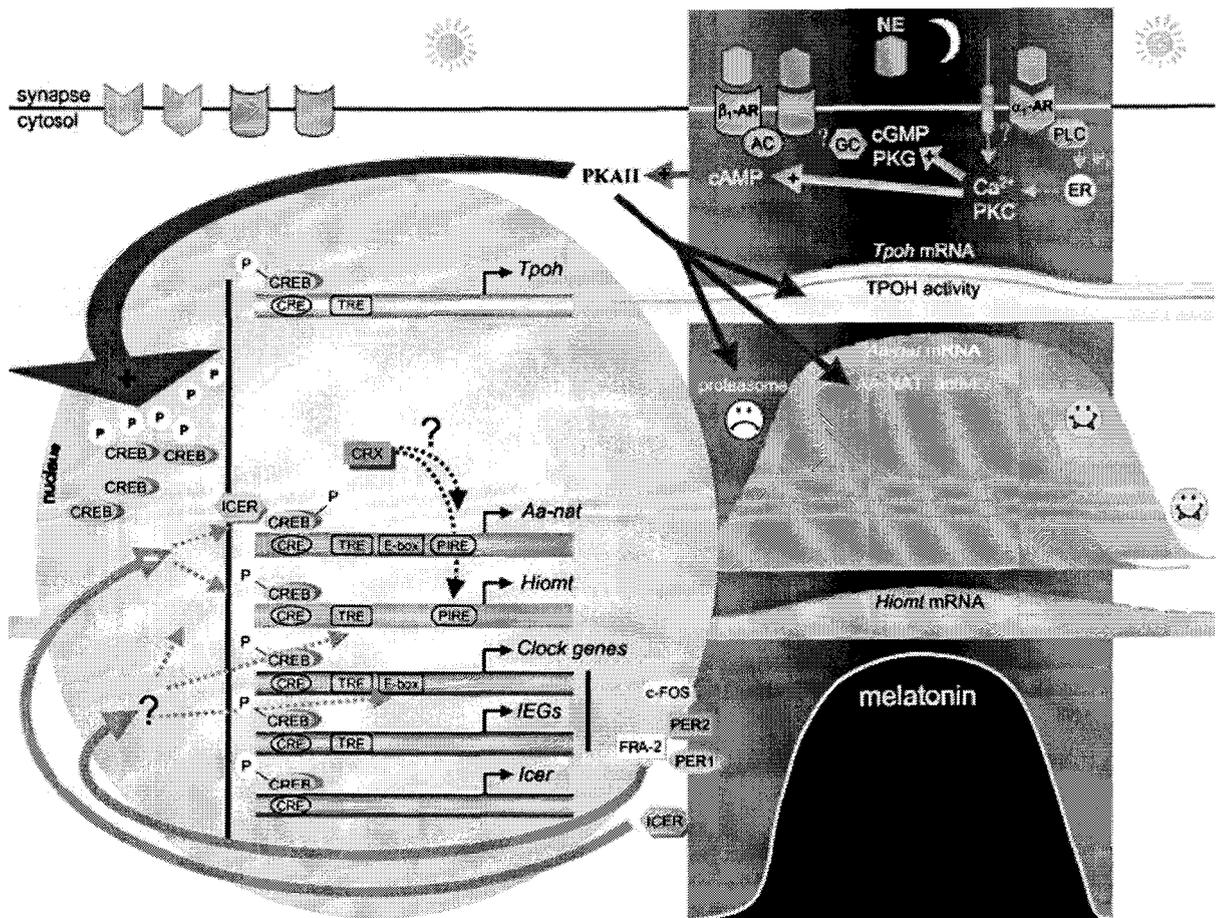


Figura 12. Regulación noradrenérgica de la síntesis de melatonina en glándula pineal. Durante la noche la NA a través de los receptores β_1 y α_1 adrenérgicos induce un aumento de AMPc y GMPC lo que provoca la activación de 4 vías de transcripción diferentes: a) fosforilación del factor de transcripción CREB, el cuál activa la transcripción de genes que portan sitios CRE en sus promotores, como la *Aa-nat* e *Icer*; b) expresión de genes de expresión temprana (IEG); c) expresión de genes reloj y d) expresión de factores de transcripción específicos de retina y pineal.

2.1.3.- Síntesis circadiana

Los ritmos diarios en los procesos fisiológicos y de comportamiento son una característica común en los organismos vivos. Esto depende de un complejo sistema que permite una organización temporal anticipatorio en relación a alteraciones periódicas del medio ambiente. La duración de la noche se refleja con la duración de la secreción de melatonina. Consecuentemente la MEL es una señal hormonal eferente que lleva un mensaje endocrino tanto circadiano como estacional. (Pevet y col., 2006).

La síntesis rítmica de melatonina depende esencialmente de tres factores independientes: El oscilador circadiano endógeno localizado en el SCN, el ciclo luz/oscuridad, que sincroniza al oscilador endógeno y la luz que ejerce una fuerte inhibición sobre la síntesis

nocturna. En la glándula pineal de la mayoría de los vertebrados se observa una oscilación circadiana del metabolismo pineal (Figura 13), caracterizada por bajos niveles nocturnos de serotonina (con ratios máximos de hasta 10:1) y altos de NAS y melatonina con respecto a los diurnos (Ganguly y col., 2002). Este perfil circadiano de la síntesis de melatonina está regido por el incremento nocturno en la actividad de la enzima AA-NAT (Klein y col., 1997) promovido por los eventos moleculares disparados por la NA. En resumen la liberación nocturna de NA en el pinealocito, dirigida por el SCN, provoca un aumento intracelular en los niveles de AMPc, el cual se traduce en la fosforilación de CREB a través de la activación de la PKII. pCREB ejerce como el principal modulador del sistema regulador de la síntesis circadiana de melatonina en el pinealocito, actuando directamente sobre el promotor del gen *Aa-nat* y del represor *Icer* promoviendo su activación.

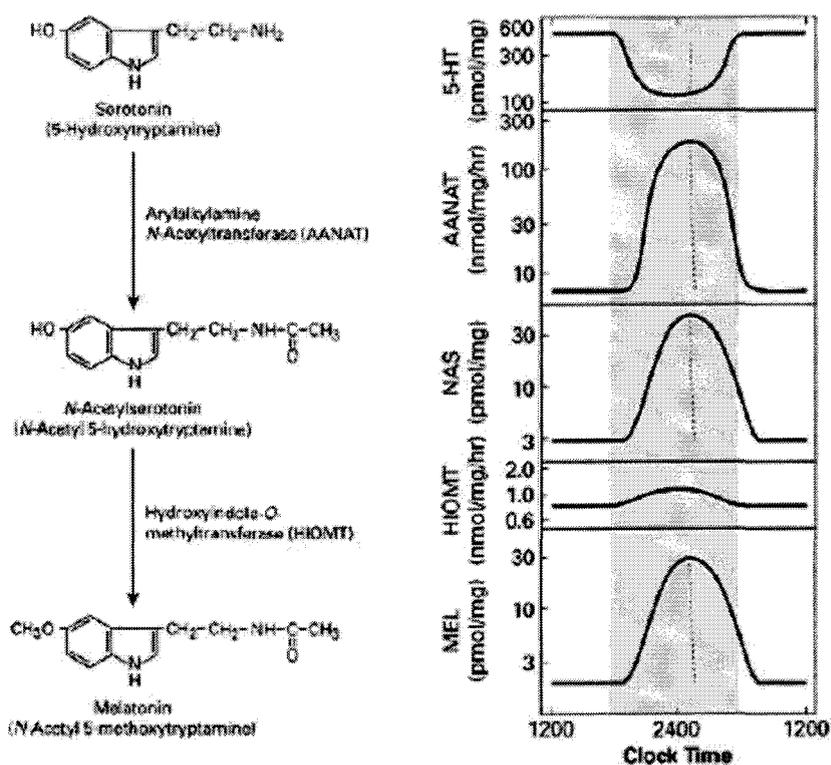


Figura 13. Ritmo circadiano en el metabolismo de la glándula pineal.

El control de la síntesis de melatonina nocturna, además de ejercerse mediante la regulación transcripcional/traducciona descrita, también se lleva a cabo mediante mecanismos post-traduccionales. En este sentido el rápido descenso en los niveles

intracelulares de AMPc provocado por el cese del estímulo noradrenérgico durante la noche (Klein y col., 1978) promueve el principal evento implicado en la terminación de la síntesis de melatonina en la glándula pineal, la degradación proteolítica de la AA-NAT, que junto con la disminución de su actividad provocan un inmediato declive en la producción de melatonina.

Se han descrito diferencias fundamentales en los mecanismos involucrados en la formación de la AA-NAT estable y activa. En función de estos mecanismos, se pueden diferenciar dos tipos de grupos de mamíferos: las especies roedores (tipo “rata”) en las cuales el incremento nocturno de melatonina requiere un aumento en la expresión del gen de la *Aa-nat* y la síntesis de nueva proteína y las especies no roedoras, principalmente ungulados y primates (“tipo oveja”), en las que se presentan altos niveles constitutivos de ARNm del *Aa-nat*, por lo que el aumento nocturno de la enzima no requiere transcripción de *novo*, sino la estabilización de la proteína traducida constitutivamente, a través fundamentalmente de los mecanismos postraducionales de protección proteolítica descritos. Esta regulación diferencial se pone de manifiesto tras observarse que en las especies roedoras la síntesis de melatonina sufre un retraso de varias horas con respecto al comienzo de la fase oscura, mientras que en las especies no roedoras este periodo de tiempo es de pocos minutos, fenómeno debido a la mayor rapidez de un mecanismo proteolítico frente a la síntesis proteica de *novor* (Klein y col., 1997 ; Simonneaux y Ribelayga 2003).

Comparaciones llevadas a cabo entre cepas deficientes (C57BL) y proeficientes en melatonina (C3H) revelaron que la expresión rítmica de algunos genes reloj (ej. *Per1*) y la actividad locomotora son idénticas en ambas cepas de ratón. Esos resultados sugieren que la generación del ritmo circadiano en el SCN es independiente de las señales de melatonina. (Korf y col., 2006).

2.1.4.- Síntesis extrapineal de melatonina

Durante muchos años la melatonina ha sido considerada una hormona exclusiva de la glándula pineal. Tan pronto como se dispuso de anticuerpos altamente sensibles a indolalquilaminas (Grotta y col., 1974), así como el desarrollo de nuevas técnicas de radioinmunología y biología molecular, la melatonina ha sido identificada no solo en la glándula pineal sino también en tejidos extrapineales. La síntesis extrapineal se puso de

manifiesto cuando se detectó la presencia de melatonina en la sangre y orina de animales pinealectomizados (Kvetnoy y col., 1997).

En los últimos años se ha descrito la presencia de melatonina en un gran número de sitios extrapineales como retina, glándula harderiana, mucosa gástrica, cerebelo, hígado, riñón, tiroides, páncreas, ovario, cuerpo carótido, placenta, endometrio y piel.

En relación al sistema inmune, ha sido localizada en timo, mastocitos, células NK, eosinófilos, plaquetas y células endoteliales (Kvetnoy, 1999; Tan y col., 1999). Además, se han descrito altas concentraciones de melatonina y presencia de su maquinaria biosintética en la médula ósea (Conti y col., 2000). La producción de melatonina se ha demostrado en leucocitos mononucleares de sangre periférica humanos expuestos a serotonina y/o interferón γ (IFN γ) (Finocchiaro y col., 1991) En estas mismas células se describió por primera vez que cultivos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica en reposo y estimuladas con PHA, sintetizan y liberan al medio melatonina (Carrillo-Vico y col., 2004). Recientemente se ha estudiado la producción de melatonina en timo de rata en diferentes estadios del desarrollo incluidos fetal, neonatal y adulto (Jimenez-Jorge y col., 2005), así como la síntesis de melatonina endógena en timo humano y de rata (Naranjo y col., 2007).

La melatonina producida en órganos extrapineales parece desempeñar un papel de tipo autocrino, intracrino y paracrino, al menos en los mamíferos, no contribuyendo de forma significativa a los niveles existentes en sangre periférica, los cuales son el reflejo de la actividad pineal.

2.2.- Mecanismos de acción de la melatonina

Buena parte de las acciones de la melatonina son mediadas a través de su unión a receptores específicos en los tejidos diana. Dos clases de receptores se han descrito para la melatonina: receptores de membrana ampliamente distribuidos y que unen melatonina con alta afinidad, pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y receptores nucleares que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares. Se conocen otros mecanismos alternativos para las acciones de la melatonina no mediadas por receptor como son, su unión a la proteína citosólica calmodulina así como su

acción neutralizadora de radicales libres (Carlberg., 2003; Witt-Enderby y col., 2003). La melatonina puede unirse a calmodulina con alta afinidad, modulando de esta manera la actividad de enzimas citosólicos dependientes de calcio y calmodulina. La acción neutralizadora de radicales libres, concretamente del radical $\text{OH}\cdot$, junto con su capacidad de regular la expresión de enzimas detoxificantes forman parte de su acción como un importante antioxidante (Figura 14).

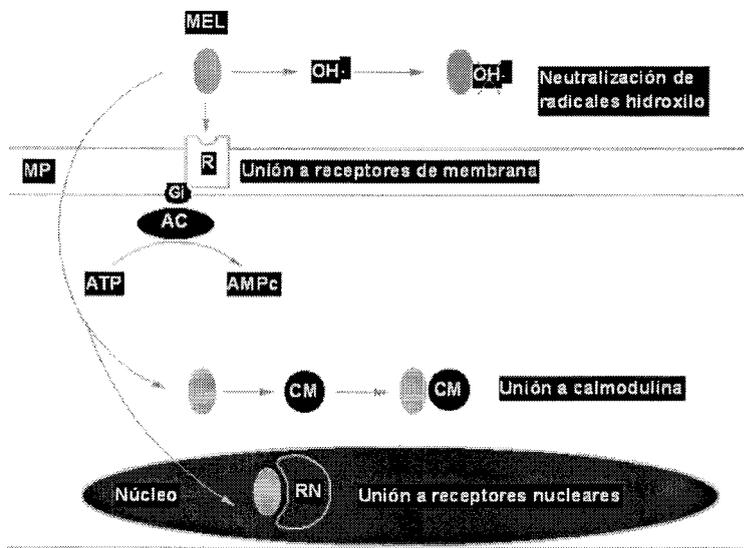


Figura 14. Mecanismos de acción de la melatonina

2.2.1.- Receptores de membrana para melatonina

2.2.1.1.- Identificación y localización de los sitios de unión para melatonina

La síntesis del radioligando 2-[^{125}I]-iodomelatonina (^{125}I -Mel), el cual posee alta afinidad por los sitios de unión a la melatonina permitió por primera vez una eficaz identificación y localización de los mismos mediante inmunoensayos, convirtiéndose en una técnica usada ampliamente para examinar las características de los receptores de melatonina (Dubocovich y col., 1987; Vanecek y col., 1987). El desarrollo y caracterización de métodos autoradiográficos para detectar ^{125}I -Mel permitió la localización anatómica de los

receptores para melatonina (Duncan y col., 1989). La distribución tisular de los sitios de unión para la melatonina muestran una gran variabilidad interespecífica. En la mayoría de los mamíferos estudiados, incluidos los humanos, se ha encontrado gran afinidad por la 125 I-Mel en el SCN y en la PT. Los sitios de unión del SCN parecen mediar las acciones circadianas de la melatonina, mientras que los sitios en la PT contribuyen a la respuesta reproductora. En los últimos años se han detectado sitios de unión para la melatonina en la mayoría de las estructuras periféricas estudiadas: sistema gastrointestinal, cardiovascular e inmune, órganos como hígado, pulmón, próstata además de células sanguíneas (Song y col., 1995); (Mahle y col., 1997; Paul y col., 1999; Guerrero y col., 2002).

2.2.1.2.- Nomenclatura y estructura molecular

El primer receptor de alta afinidad para melatonina fue clonado a partir de una genoteca de expresión realizada con ARNm de una línea inmortalizada de melanóforos de *Xenopus laevis* (Ebisawa y col., 1994). El cDNA de dicho receptor codifica para una proteína de 420 aminoácidos con 7 dominios transmembrana pertenecientes a la GPCRs. La identificación de la secuencia del receptor en *Xenopus* permitió, a través de métodos de exploración basados en homología, identificar tres subtipos de receptores para melatonina en vertebrados, los cuales se denominaron Mel_{1a}, Mel_{1b} y Mel_{1c} (Reppert y col., 1996). Solo los receptores Mel_{1a} y Mel_{1b} se expresan en mamíferos, mientras que Mel_{1c}, el clonado originalmente por Ebisawa y cols., se expresa en organismos no mamíferos, como anfibios, aves, peces. También se ha clonado un receptor adicional, el cual aún presentando >40% de homología y una relación estructural con la familia de receptores para melatonina no une la indolamina. Se conocen como receptores relacionados con melatonina (MRR), los cuales se consideran miembros huérfanos de la GPCRs y parecen estar ampliamente distribuidos en los tejidos neuroendocrinos (Reppert y col., 1995); (Drew y col., 2001).

El comité de nomenclatura de la IUPHAR estableció en 1998 una nomenclatura oficial para los receptores de melatonina, la cual dictaba que el receptor Mel_{1a} pasaba a llamarse mt1 (posteriormente se llamó MT₁), mientras que el Mel_{1b} se denomina MT₂. La nomenclatura IUPHAR no contempla a los receptores no mamíferos. Los sitios de unión ML-2 fueron renombrados a receptor MT₃ por la IUPHAR. El perfil farmacológico diferente de estos receptores con los de alta afinidad, permitió el desarrollo de ligandos específicos y la subsiguiente purificación del sitio de unión (Nosjean y col., 2000). La

secuencia del producto aislado mostró que el sitio MT₃ no es un receptor acoplado a proteínas G, como se había sugerido previamente, sino que es el reflejo de la unión de la melatonina a la enzima quinona reductasa (QR₂).

Los receptores de alta afinidad están acoplados a proteínas G sensibles a toxina pertúsica, las cuales median la inhibición de la adenilato ciclasa, presentan un 60% de homología en su secuencia de aminoácidos y se localizan en diferentes cromosomas (Masana y col., 2001). El receptor MT₁ consta de 350 aminoácidos, mientras que el MT₂ está formado por 362, con un peso molecular estimado entre 37 y 40 Kda. El receptor MT₁ posee dos sitios de glicosilación en su región N-terminal, mientras que el MT₂ dispone de uno. Ambos poseen regiones sensibles a fosforilación por PKC, CKI, CK2 y PKA, los cuales participan en la regulación de su función (Navajas y col., 1996). Las siete hélices transmembrana (TM 1-7) que constituyen su estructura molecular están unidas por tres lazos intracelulares (IL₁₋₃) y tres extracelulares (EL₁₋₃) (Figura 15).

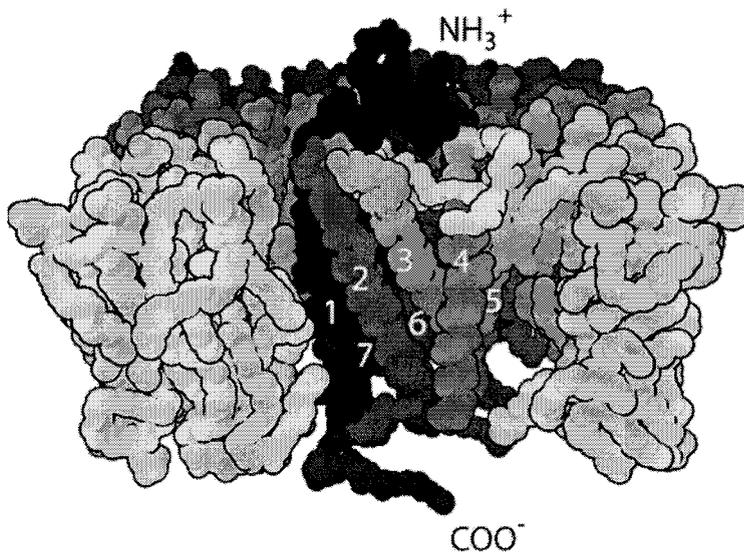


Figura 15. Estructura general de los receptores acoplados a proteínas G

2.2.1.3.-Distribución y respuestas fisiológicas de los receptores de membrana

Aunque los primeros estudios indicaban una distribución más restringida de los receptores para melatonina en mamíferos, en los últimos años se ha detectado su presencia en numerosas estructuras del SCN además de en un amplio espectro de tejidos periféricos y

tipos celulares. La diversidad de los efectos biológicos de la melatonina podría ser un reflejo de esta amplia distribución de sus receptores. En roedores usando la técnica de hibridación *in situ*, se conoció que el ARNm del receptor MT₁ se encuentra en pars tuberalis de la hipófisis, en el núcleo supraquiasmático y paraventricular del tálamo SCN.

La melatonina juega un papel fundamental en la adaptación del organismo a los cambios ambientales y estacionales. Además, tanto la melatonina endógenamente sintetizada, como la melatonina exógenamente administrada regulan un gran número de respuestas fisiológicas, muchas de las cuales están mediadas por un efecto de la melatonina sobre sus receptores de membrana. Concretamente se han descrito respuestas fisiológicas mediadas por los receptores de membrana en el SNC, el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal, el sistema cardiovascular y el sistema inmune, entre otros (tabla 1).

System	Function	Receptor	Signaling	Tissue
CNS	Phase shift of the circadian rhythm of wheel running activity	MT ₂	UNK	
	Phase shift of the circadian rhythm of neuronal firing rate in the SCN slice	MT ₂	PKC activation	SCN
	Inhibition of PACAP-stimulated CREB phosphorylation	MT ₁ MT ₂ ?	Inhibition of cAMP	SCN
	Inhibition of neuronal firing in the SCN	MT ₁	Increase in K ⁺ conductance?	SCN
	Inhibition of DA release from rabbit retina	MT ₂	UNK	Rabbit retina
	Reduction of intraocular pressure	MT ₂	UNK	Rabbit eye
Hypothalamic-Hypophyseal-Gonadal Axis	Inhibition of prolactin secretion	MT ₁	UNK	Anterior pituitary
	Regulation of <i>Pev1</i> gene expression	MT ₁	Inhibition of cAMP	Anterior pituitary
Cardiovascular	Vasoconstriction	MT ₁	Activation of BK _{Ca} channel	Rat caudal artery Cerebral arteries
	Vasodilation	MT ₂	UNK	Rat caudal artery
Immune	Enhancement of splenocyte proliferation i.e., cell-mediated immunity	MT ₂	UNK	Spleen

Tabla 1. Respuestas fisiológicas mediadas por los receptores de melatonina en varios sistemas.

2.2.1.4.- Transducción de señal a través de los receptores MT_1 y MT_2

Los receptores MT_1 presentan numerosas respuestas celulares a través de vías sensibles y no sensibles a toxina pertúsica. La activación del MT_1 a través de proteínas G_i (G_{i2} y G_{i3}) promueve tanto una inhibición de la estimulación de AMPc inducida por forskolina, como de la actividad PKA y de la subsecuente fosforilación de CREB (Massana y Dubocovich., 2001), mientras que a través de las proteínas G_q , la melatonina incrementa la movilización de IP_3 y calcio intracelular mediado por PLC. La activación del MT_1 , vía subunidades $G_{\beta\gamma}$, también potencia el efecto de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, tanto sobre la activación de la PLC, como sobre la liberación de ácido araquidónico. Los receptores MT_1 también modulan los canales de potasio activados por calcio ($BKCa^{2+}$) y los canales de potasio rectificadores entrantes (GIRK Kir 3), a través de proteínas G_i o G_o y $G_{i\beta\gamma}$, respectivamente. Adicionalmente, la activación de dicho receptor estimula la actividad quinasa N-terminal de *c-Jun* (JNK) a través tanto de proteínas G sensibles a toxina pertúsica (G_i) como insensibles a ella (G_s , G_z y G_{16}) (Chan y col., 2002)(Figura 16).

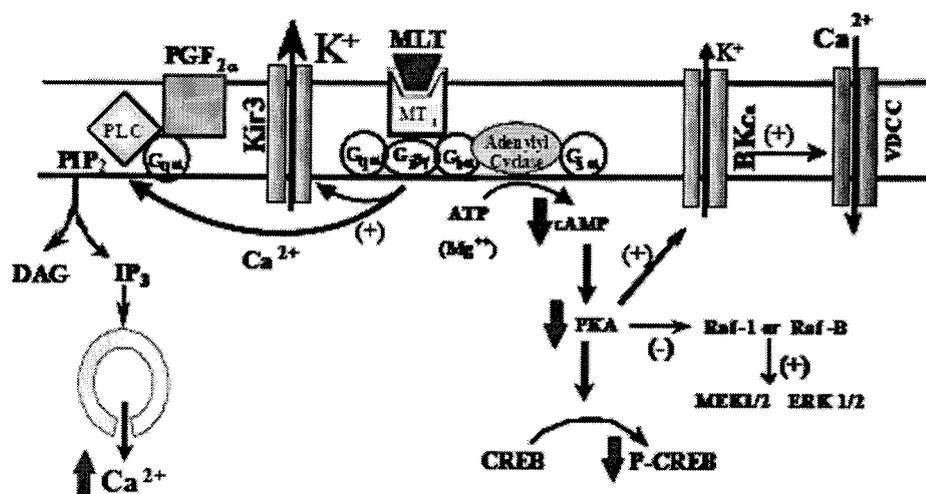


Figura 16. Esquemas de las vías de señalización activadas a través de los receptores MT_1

La activación del receptor MT_2 inhibe la formación de AMPc inducida por forskolina y la acumulación de $GMPc$, también aumenta la hidrólisis de fosfoinositol. A través de este receptor, la melatonina también induce la activación de JNK a través tanto de proteínas G_i sensibles a toxina pertúsica como de proteínas G_{16} insensibles a la misma (Chan y col., 2002) (Figura 17).

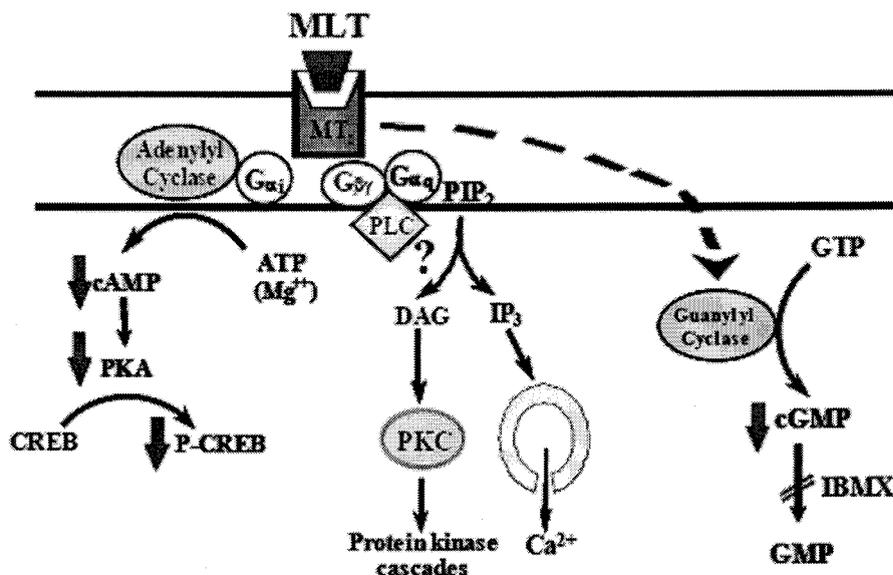


Figura 17. Esquemas de las vías de señalización activadas a través de los receptores MT_2

2.2.1.5.- Regulación de la transducción de señal

Para mantener una respuesta celular eficiente y oportuna es esencial la regulación de los eventos implicados en la transducción de señal a través de los receptores. En este sentido, al igual que ocurre con la mayoría de los miembros de GPCR, los receptores para melatonina también están regulados, pudiéndose hablar de una regulación homóloga cuando se ejerce por la propia melatonina, o heteróloga a través de otros estímulos como el fotoperíodo. Ya que los receptores están expuestos diariamente durante prolongados períodos de tiempo a la melatonina (durante la noche), la regulación de los mismos mediante el fenómeno de la desensibilización ha sido ampliamente estudiado. El fenómeno de desensibilización se puede llevar a cabo mediante desacoplamiento de la unión receptor-proteína G, la internalización de receptores y/o la *down* regulación de los mismos (Witt-Enderby y col., 2003). Respecto a la *down* regulación, algunos autores han sugerido que la disminución en la densidad de receptores observada tras la larga exposición a melatonina o tras el aumento nocturno de la misma se debe a un descenso en los niveles de ARNm de dichos receptores. La melatonina, además de ejercer una regulación negativa sobre sus receptores, también puede regularlos positivamente.

Los receptores para melatonina también están sujetos a regulación por otros elementos, además de la melatonina. Los receptores presentes en el SCN de rata, están regulados por el ciclo luz-oscuridad, ya que presentan bajos niveles durante la noche comparados con los niveles diurnos, incluso en animales pinealectomizados (Masson-Pevet y col., 2000).

2.2.2.- Receptores nucleares para melatonina

2.2.2.1.- Generalidades de los receptores nucleares

Aunque los primeros estudios que indicaban la existencia de receptores nucleares datan de mediados de los 60, no fue hasta los 80 cuando se identificó el primer cDNA de una proteína que codificaba para el receptor de estrógenos (ER). En los dos años siguientes a la identificación de este primer miembro de la superfamilia de receptores nucleares, se identificaron los receptores para todas las hormonas esteroideas, las hormonas tiroideas y el ácido retinoico, entre otras. Debido a que el descubrimiento de estos receptores nucleares no iba precedido en la mayoría de los casos de estudios fisiológicos, a la gran mayoría de los alrededor de 200 miembros que actualmente tiene la superfamilia de los receptores nucleares no se les conoce ligando, de ahí que se denominaran receptores nucleares huérfanos (Smirnov, 2001). Los receptores nucleares proveen a los organismos de la posibilidad de controlar directamente la expresión génica en respuesta a un amplio rango de cambios a nivel ambiental, fisiológico y de desarrollo. La actividad de los receptores nucleares puede estar controlada al menos por tres mecanismos distintos: 1) unión de pequeños ligandos lipofílicos al receptor o al complejo heterodimérico formado por el mismo; 2) modificación covalente, principalmente en forma de fosforilación regulada por eventos disparados en la membrana celular o durante el ciclo celular; y 3) interacciones proteína-proteína, generalmente a través de contactos con otros factores de transcripción incluyendo los propios receptores nucleares. Estos mecanismos pueden darse individual y/o conjuntamente (Figura 18).

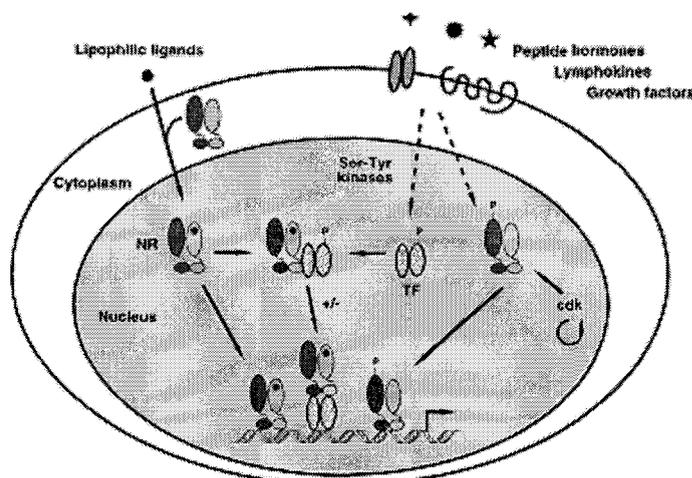


Figura 18. Vías de señalización que regulan las acciones genómicas de los receptores nucleares

La estructura general de un receptor nuclear (Figura 19) incluye un dominio modulador (A/B) en la región aminoterminal, el cual presenta la mayor variabilidad en longitud y secuencia primaria, debido al uso diferencial de promotores, a *splicing* alternativo y al uso diferencial de sitios de inicio de traducción. Este dominio suele contener una función de transactivación, conocida como AF-1. Un segundo dominio de unión a ADN (DBD), también denominado dominio C. Los receptores se pueden unir al ADN como monómeros, homodímeros o heterodímeros, dependiendo de la familia en cuestión. Las secuencias de ADN reconocidas por el DBD se denominan elementos de respuesta a hormona (HREs) y están formadas por una o dos secuencias consenso de 6 nucleótidos (generalmente AGGTCA). El dominio DBD es el más conservado de todos, está compuesto por dos regiones en dedos de zinc formadas por 66-70 aminoácidos y una extensión aminoterminal (CTE) de unos 25 residuos. El tercer dominio o el dominio D, es la región bisagra, la cual presenta gran variabilidad tanto en longitud como en secuencia y su función principal es servir de bisagra entre la región DBD y la LBD, por ello posee gran flexibilidad, también se ha observado que esta región puede constituir un sitio de unión de proteínas correpresoras. El dominio LBD (E) recibe su nombre porque es el responsable de unir al ligando, aunque tiene carácter multifuncional ya que además media los procesos de dimerización y de transactivación. La transactivación está mediada por un motivo altamente conservado presente en el dominio denominado función de activación 2 (AF-2), localizado en el extremo carboxiterminal del LBD. El dominio F es el situado en el extremo carboxiterminal, es un dominio opcional de corto tamaño (Giguere, 1999).

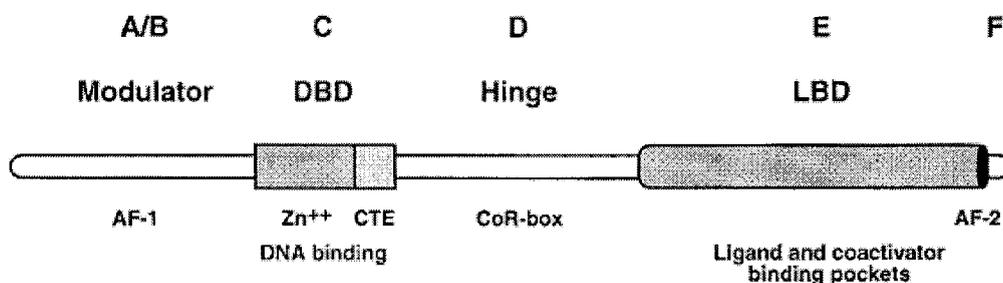


Figura 19. Estructura general de un receptor nuclear

2.2.2.2.- Subfamilia ROR/RZR

La subfamilia de los receptores Z retinoicos (RZR) o receptores huérfanos retinoicos (ROR) incluye los productos de tres genes: las variaciones de *splicing* del ROR α (ROR α 1, ROR α 2, ROR α 3 y RZR α o ROR α 4) las cuales difieren en su dominio aminoterminal, el RZR β y el ROR γ , los cuales contienen 523, 556, 548, 468, 459 y 560 aminoácidos en humanos, respectivamente y poseen una organización estructural en dominios típica de los receptores nucleares (Smirnov., 2001).

2.2.2.3.- Ligandos de los receptores ROR/RZR

Aunque las hormonas retinoides dan el nombre a esta subfamilia de receptores, éstas no son ligandos de los mismos. De hecho, el único ligando descrito hasta la fecha es la melatonina, la cual se une a dichos receptores con una Kd del orden de nM o sub-nM. El descubrimiento de la interacción de los receptores RZR/ROR con la melatonina estimuló la búsqueda de otros ligandos. El primero de ellos se identificó en 1995, cuando Wiesenberg y col. mostraron que el compuesto CGP 52608, perteneciente a la familia de las tiazolidindionas, era un ligando sintético de los receptores RZR/ROR, pudiendo actuar como análogo funcional de la melatonina sobre sus receptores nucleares. Actualmente se han descrito varios miembros de la familia de las tiazolidindionas que pueden actuar como agonistas o antagonistas nucleares de melatonina (Missbach y col., 1996), mediante los cuales se ha descrito que la melatonina puede regular ciertos procesos fisiológicos por medio de la unión a sus receptores nucleares.

2.2.2.4.- Distribución y regulación

La expresión de los miembros de la subfamilia muestra una variedad significativa entre tejidos. La expresión de RZR β es la más limitada, detectándose casi exclusivamente en tejido neuronal, relacionado con los sistemas sensorial, neuroendocrino y límbico. ROR γ se expresa mayoritariamente en músculo esquelético, hígado riñón y adipocitos, mientras que su variante ROR γ -t (TOR) es específica de timo, donde se expresa mayoritariamente en timocitos CD4⁺/CD8⁺. Las isoformas RZR α / ROR α se expresan en un gran número de tejidos como hipófisis, tálamo, bulbo olfatorio, cerebelo (particularmente en células de Purkinge), tejido adiposo, hígado, cartílago, piel y testículos, entre otros. Los receptores

RZR/ROR son diana de factores que determinan la diferenciación celular y la actividad funcional de células diferenciadas.

La actividad de los receptores RZR/ROR, al igual que la de otros receptores nucleares, puede ser regulada, además de por sus propios ligandos, por proteínas quinasa. Concretamente, se ha descrito que la proteína quinasa IV dependiente de calcio/calmodulina potencia la actividad transcripcional de los receptores ROR α 1, ROR α 2 y ROR γ . Al contrario de lo que cabría pensar, el efecto de esta quinasa no involucra una fosforilación del receptor, en cambio parece actuar regulando la interacción de una clase de péptido que contiene un motivo LXXLL, característico de coactivadores que interactúan con AF-2 del LBD (Kane y col., 2000).

2.2.2.5.- Participación de los receptores RZR/ROR en la regulación de procesos fisiológicos

La identificación de elementos de respuesta a ROR (ROREs) en los promotores de genes codificantes para proteínas implicadas en diversas funciones, la expresión y regulación diferencial de diferentes miembros de la subfamilia, al igual que la regulación de los RZR/ROR por diversos ligandos sugiere que la actividad de estos receptores abarca un amplio espectro de procesos fisiológicos. Los mejor documentados son la participación de dichos receptores en la regulación de procesos inmunes, en la diferenciación del SCN y la modulación del metabolismo de los lípidos.

La expresión del ROR γ -t protege a hibridomas de células T contra la muerte celular inducida en el proceso de activación, por medio de la inhibición de *fas* ligando y de la formación de interleuquina 2 (IL-2). Además la expresión de esta isoforma aumenta drásticamente justo antes de la activación del timocito, sugiriéndose su participación en el proceso de maduración del TCR, ya que también se ha detectado un RORE en la región 5' del *cluster* TCR-J α . La participación RZR α y ROR α en la regulación del sistema inmune se basa en la inhibición observada a través de estos receptores sobre la 5-lipoxigenasa, una de las enzimas claves involucradas en la ruta biosintética de leucotrienos proinflamatorios en los linfocitos B. Al contrario que en timocitos tanto la melatonina como sus agonistas nucleares son capaces de estimular la producción de IL-2 e IL-6 a través de los receptores RZR/ROR.

Se ha identificado una cepa de ratón cuyos miembros portan un receptor ROR α truncado en su región carboxiterminal, denominados *staggerer mice*, los cuales presentan un gran número de anomalías, como temblores, desequilibrios de peso o disminución de la talla. El cerebelo de tales animales (donde se expresan normalmente dos isoformas del ROR α : el ROR α 1 y el RZR α) muestran un subdesarrollo, presentándose una disminución en las células de Purkinje, las cuales presentaron unas características electrofisiológicas diferentes a los animales controles. Estos animales también presentaron defectos en el bulbo olfatorio y en los procesos del desarrollo cerebral mediado por hormonas tiroideas. La expresión de la apolipoproteína A-1 en intestino delgado también se encuentra muy disminuida en estos animales, sugiriendo la participación del receptor ROR α en el metabolismo lipídico.

También se ha relacionado al receptor ROR β en los procesos de desarrollo ocular, ratones doble negativos para el receptor presentan una degeneración retinal que conduce a una ceguera en los animales adultos. Estos animales también presentaron anomalías en su comportamiento circadiano y en su manera de andar (Smirnov., 2001).

2.3.- Funciones biológicas mediadas por la melatonina

Con respecto a las acciones biológicas de la melatonina, se encuentra plenamente aceptado que la melatonina regula un gran número de procesos biológicos a través de sus amplias funciones como sincronizador de los ritmos circadianos y estacionales. Así mismo actúa como modulador de la maduración sexual y los ciclos vigilia/sueño, además de poseer capacidad antioxidante, oncostática e inmunomoduladora. En los últimos años también se la ha relacionado con la regulación del sistema cardiovascular, del metabolismo óseo y en determinados desórdenes psiquiátricos y neurológicos.

2.3.1.- La melatonina y la reproducción

Además de la sincronización de los ritmos circadianos, una de las funciones mejor establecidas de la melatonina en mamíferos es la regulación de los ritmos estacionales a través de la transducción de la información fotoperiódica, ya que en todos los mamíferos estudiados hasta la fecha, la adaptación de los cambios estacionales a las condiciones

ambientales es un fenómeno directamente relacionado con la glándula pineal. El mejor ejemplo de ello es la activación/inhibición del eje reproductor. En este sentido, se ha observado que animales pinealectomizados no presentan cambios estacionales en su *estatus* reproductor o éstos pierden su sincronización con el ciclo anual, volviendo a recuperarse tras la administración de melatonina exógena (Hoffman y Reiter., 1965; Kennaway y col., 1987). La modificación en la duración de la producción nocturna de melatonina es la señal mediante la cual el cerebro es capaz de integrar los cambios fotoperiódicos y transmitirlos al sistema reproductor (Pevet, 2003). En aquellos animales en los cuales fotoperíodos cortos (otoño/invierno) inducen una activación del eje reproductor, como en el caso del hamster, una mayor duración en la secreción nocturna de melatonina induce la regresión gonadal, mientras que en aquellos que se reproducen en fotoperíodos largos (primavera/verano), como las ovejas o los siervos, induce una estimulación del desarrollo gonadal.

El ritmo estacional en la fertilidad que presentan algunas especies está dirigido principalmente por los cambios en la frecuencia de liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, la cual regula la liberación de las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) desde la hipófisis y consecuentemente la función de los órganos reproductores. La melatonina parece actuar sobre el eje hipotálamo-adenohipofisiario-gonadal a través de sus efectos sobre diferentes áreas del hipotálamo. La identificación de receptores para melatonina en el hipotálamo de diversas especies apoya el efecto directo de la melatonina sobre el proceso (Sallinen y col., 2005). La melatonina también actúa sobre la pars tuberalis (PT), la cual presenta una gran densidad de receptores para melatonina en todos los mamíferos estudiados, los cuales presentan cambios estacionales, solo en aquellas especies fotoperiódicas. Recientemente se ha descrito un efecto directo de la melatonina a través de sus receptores MT₁ en el testículo de hámster, mediante el cual promueve una inhibición en la producción de andrógenos y gonadotropina coriónica (Frungeri y col., 2005).

Aunque la especie humana no se caracteriza por la presencia de fuertes patrones estacionales, estudios realizados en diversas áreas geográficas sugieren una distribución estacional de las concepciones. En latitudes septentrionales en las cuales puede haber hasta 2 horas extras de secreción de melatonina en invierno, se han observado descensos invernales en la concentración de esteroides y en las concepciones (Rojansky y col.,

1992). Se ha observado que la exposición a la luz brillante en la mañana estimula la producción de cortisol y hormona luteinizante (LH) (Arendt, 2006). Una evidencia adicional de la estacionalidad en humanos son los desórdenes afectivos estacionales (SAD), caracterizados por episodios depresivos recurrentes asociados al invierno, los cuales van remitiendo espontáneamente con el aumento del fotoperíodo.

La conexión entre la glándula pineal y la función reproductiva humana se estableció hace más de un siglo a través de las observaciones clínicas de los efectos de los tumores pineales sobre el desarrollo de la sexualidad humana. Se ha sugerido una relación causal entre el comienzo de la pubertad y el descenso en la producción de melatonina (Attanasio y col., 1985). Elevados niveles de melatonina han sido encontrados en hombres con hipogonadismo primario o infertilidad con oligospermia o azoospermia (Karasek y col., 1990). Ha sido demostrado que los niveles de melatonina están inversamente relacionados con los niveles de estrógenos en mujeres con amenorrea secundaria funcional (Okatani y col., 1994).

2.3.2.- La melatonina como sincronizador de los ritmos circadianos

Durante la evolución de la vida en la tierra, las variaciones día/noche han ejercido un gran impacto en la adaptación de la mayoría de las formas de vida a su medio ambiente. Como consecuencia directa de esto, los humanos poseen un ritmo con una periodicidad aproximada de 24 horas (circadiano) en muchos de sus procesos bioquímicos, fisiológicos y comportamentales como el ciclo vigilia/sueño, la temperatura corporal, el metabolismo, la presión sanguínea y la producción de ciertas hormonas como el cortisol, la prolactina, la hormona del crecimiento y la melatonina. En mamíferos, el control de este ritmo se ejerce por el reloj biológico principal, localizado en el SCN, el cual es sincronizado por los niveles lumínicos medioambientales percibidos por la retina a través del RTH, extendiendo su sincronización a todo el organismo mediante la síntesis rítmica de melatonina, el transductor endocrino que transforma la información lumínica en una señal química proporcional a la longitud nocturna (Rajaratnam y col., 2001; Arendt y col., 2005). Recíprocamente, la melatonina, a través de sus receptores de membrana, actúa sobre el SCN alterando tanto la actividad como el cambio de fase en la tasa de disparo de las neuronas que lo componen (Liu y col., 1997) (Figura 20).

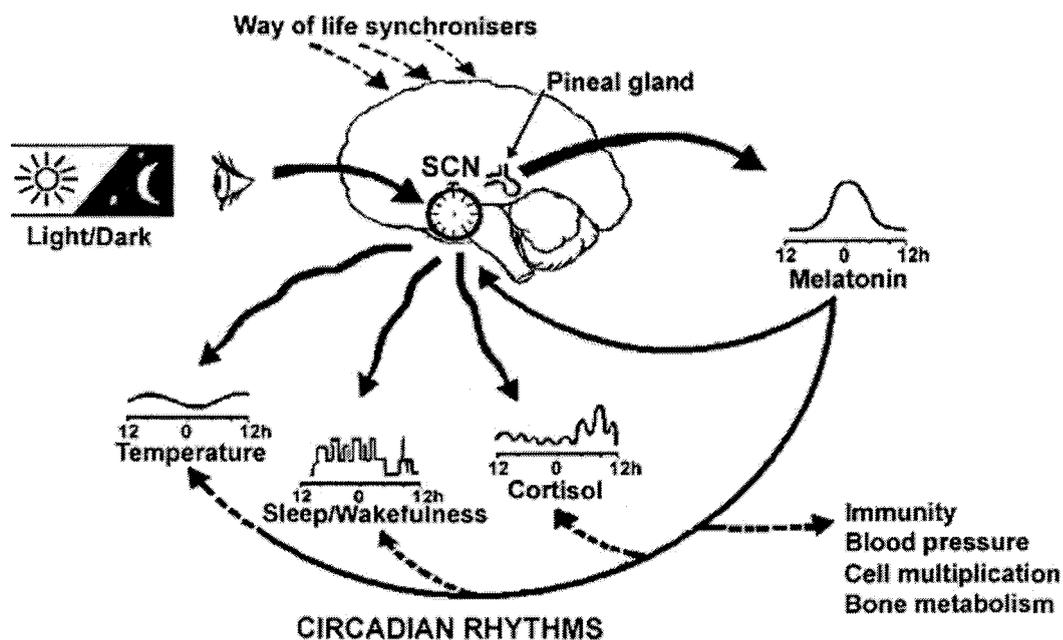


Figura 20. Acciones de la melatonina como sincronizador endógeno.

Uno de los efectos mejor conocidos y más aceptados de la melatonina es su capacidad para sincronizar los ritmos circadianos. El efecto de la melatonina sobre la organización circadiana se observa claramente en aves y reptiles, en estos organismos la pinealectomía provoca la abolición de los comportamientos rítmicos, los cuales se revierten mediante implante pineal (Vanecek, 1998). En los mamíferos estudiados hasta la fecha, la supresión de la síntesis de melatonina no tiene efectos tan evidentes sobre la organización circadiana. A pesar de ello se ha descrito la desincronización parcial o total de varias funciones fisiológicas tras la pinealectomía, como el metabolismo de glúcidos y lípidos (Lima y col., 1998), el ritmo en la tasa de disparo neuronal y la actividad metabólica en el SCN o la expresión rítmica de sus receptores en pars tuberalis (PT) (Gauer y col., 1993). Otros datos han mostrado que la melatonina contribuye a la disminución de la temperatura ya que se han identificado receptores para melatonina en vasos sanguíneos periféricos, se propone que esto podría ser el resultado de una vasodilatación provocada por la estimulación de los receptores para melatonina. Se ha propuesto que la melatonina modula directamente la secreción de cortisol ya que se han demostrado receptores para melatonina en la glándula adrenal de primates y dosis fisiológicas de melatonina inhiben la producción de cortisol *in vitro* (Claustrat y col., 2005).

El papel de la melatonina exógena como agente cronobiótico, ha sido mostrado en un gran número de trabajos, se ha observado que la administración de melatonina a ratas con un ritmo circadiano libre de control medioambiental (*free-running*), las cuales carecían del periodo intrínseco de aproximadamente 24 h promovía una sincronización del ritmo circadiano (Redman y col., 1983). El modelo de *free-running* más estudiado en humanos es el derivado de la ceguera, donde numerosos trabajos han mostrado la capacidad sincronizadora de la melatonina (Sack y col., 2001).

Arendt y col., demostraron el efecto de la melatonina sobre la fase del sistema circadiano en humanos, los cuales mostraron que la administración diaria de 2 mg de melatonina a las 17.00 h. durante 3 semanas provoca un avance de fase (1-3 h) en 5 de los 11 sujetos estudiados (Arendt y col., 1985). Estudios posteriores, han mostrado que la administración de melatonina al final de la etapa diurna o comienzo de la nocturna induce un avance de fase, mientras que la administración al final de la noche o al comienzo del día promueve un retraso de la misma (Lewy y col., 1992).

Aunque una característica fundamental del reloj biológico es su capacidad para reajustarse o resincronizarse (mediante un avance o un retraso de fase) ante cambios ambientales, la melatonina, a través de sus acciones cronobióticas, es capaz de acortar los tiempos de adaptación circadiana de dicho reloj. Esta propiedad es la base de la relevancia clínica que la melatonina posee sobre los desequilibrios fisiológicos relacionados con ciertos desórdenes del ritmo circadiano como el *jet-lag* y el trabajo por turnos.

2.3.3.- Melatonina y sistema inmune

2.3.3.1.- Red neuro-endocrino-inmune

Uno de los descubrimientos más notables en la biología moderna, es el hallazgo de que el sistema neuroendocrino y el sistema inmune utilizan un lenguaje químico común. Esta inter-relación se pone de manifiesto a través de un completo circuito de comunicación bidireccional por medio de neurotransmisores, hormonas neuroendocrinas, citoquinas y sus respectivos receptores (Blalock, 2005).

Esta red neuro-endocrino-inmune, une al cerebro con el sistema inmune por medio de dos vías principales: el sistema nervioso autónomo y el flujo neuroendocrino a través de la pituitaria. Ambas vías liberan moléculas capaces de interactuar con células del sistema inmune. Tanto las vías noradrenérgicas como peptidérgicas liberan en el sistema inmune moléculas como el neurotransmisor noradrenalina y los péptidos SP, somatostatina y VIP, estas sustancias son capaces de interactuar con sus receptores localizados en los diversos órganos y células linfoides, provocando numerosos efectos sobre la regulación inmune (Ader y col., 1995). Por otra parte, diversas hormonas y neuropéptidos como la hormona del crecimiento, la prolactina, el factor liberador de corticotropina (CRF), la hormona corticotropina (ACTH) y los opioides ejercen varias funciones en el sistema inmune, donde se han descrito receptores para la gran mayoría de estas sustancias. Lesiones específicas en las vías simpáticas, en el hipotálamo, sistema límbico, hipófisis o en la glándula adrenal también promueven cambios significativos en el sistema inmune.

Al igual que el sistema inmune puede ser diana de los mediadores neuroendocrinos, el sistema también se comunica en sentido contrario, de ahí que cambios en el sistema inmune puedan ir acompañados de cambios en el hipotálamo, en el sistema autónomo y en diversos procesos endocrinos (Figura 21). Los principales mediadores de esta acción son las interleuquinas, algunas de las cuales influyen en la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) y procesos como la fiebre, el sueño, la conducta locomotora y los estados de ánimo (Ader y col., 1995).

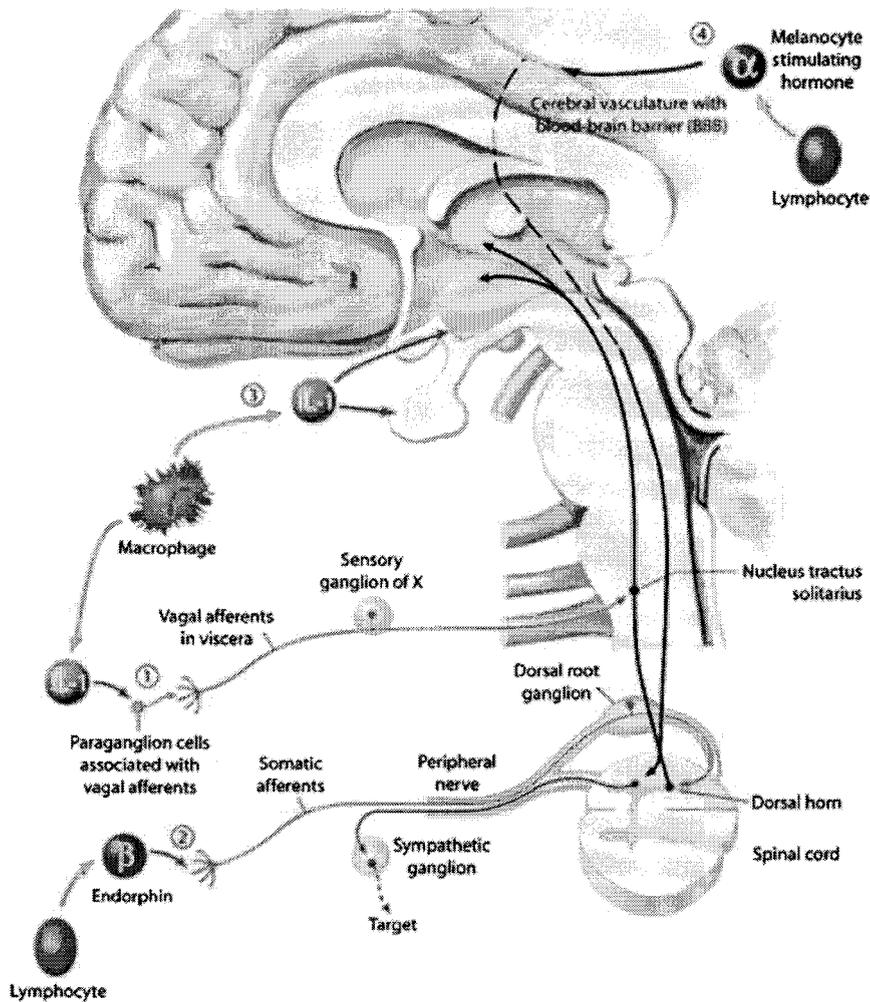


Figura 21. Algunos ejemplos sobre las acciones del sistema inmune sobre el neuroendocrino

Además de la interconexión directa entre ambos sistemas mediada por la actuación de las sustancias propias de uno sobre receptores específicos situados en el otro y viceversa, en los últimos años se ha descrito que esta comunicación se puede llevar a cabo a través de un lenguaje común, ya que se ha identificado síntesis endógena en el sistema inmune de toda una constelación de compuestos peptídicos, neurotransmisores, hormonas neuroendocrinas y endorfinas (tabla 2).

Source	Hormone/neurotransmitters
Peripheral blood lymphocytes	Acetylcholine, melatonin
T lymphocytes	ACTH, endorphins, TSH, chorionic gonadotropin, GH, PRL, [Met]enkephalin, parathyroid-hormone-related protein, IGF-1, VIP
B lymphocytes	ACTH, endorphins, GH, IGF-1
Macrophages	ACTH, endorphins, GH, substance P, IGF-1, atrial natriuretic peptide
Splenocytes	LH, FSH, CRH, adrenaline, endomorphins
Thymocytes	CRH, LHRH, AVP, OT, adrenaline
Mast cells and PMN cells	VIP, somatostatin
Megakaryocytes	Neuropeptide Y

Tabla 2. Péptidos, hormonas y neurotransmisores liberados por células del sistema inmune.

2.3.3.2.- Interconexión entre la pineal y el sistema inmune

Actualmente la glándula pineal y su principal producto, la melatonina, se consideran miembros de la compleja red neuro-endocrino-inmune. El concepto de que la glándula pineal está relacionada con el sistema inmune, fue propuesto por Berman y col. en 1926. En un experimento tras alimentar gatos con extractos pineales de buey durante dos años, postularon que el aumento en la actividad, tamaño, inteligencia y resistencia que presentaban dichos animales en comparación a los no tratados se debía a una mejor protección frente a enfermedades infecciosas. A lo largo de los últimos 30 años muchos artículos han documentado la existencia de una relación entre la glándula pineal y el sistema inmune.

2.3.3.3.- Sistema inmune y fotoperiodo

Muchas respuestas neuroendocrinas tienen ritmicidad circadiana y/o estacional y dada la estrecha relación entre el sistema inmune y neuroendocrino no es sorprendente que algunos parámetros inmunes muestren ambos tipos de ritmicidad. Diversos autores han estudiado la asociación entre el perfil rítmico en la producción de melatonina y la sincronización de la respuesta inmune. Diversos estudios han mostrado una ritmicidad circadiana y/o estacional en parámetros inmunes como la proliferación celular en médula ósea (Haus y col., 1983),

el ratio de linfocitos CD8+ vs CD4+ (Paglieroni y col., 1994), la actividad celular NK y la producción de citoquinas (Petrovsky y col., 1997). El primer indicio acerca de una relación entre el fotoperíodo y el sistema inmune fue publicado por Vaughan en 1973, demostrando una correlación directa entre los días cortos y un incremento del peso del timo en ratas de campo, similares resultados fueron obtenidos en hámster. Desde entonces, numerosos estudios han sido realizados al respecto, cuya conclusión general indica una asociación entre los días cortos y la estimulación del sistema inmune (Nelson, 2004).

El primer trabajo indicando un control fotoperiódico mediado por la melatonina del sistema inmune fue realizado por Kuci y col. (1988), observaron que el máximo nocturno de producción de melatonina estaba estrechamente sincronizado con el valor máximo de proliferación de células progenitoras para macrófagos y granulocitos (CFU-GM) en ratones C57BL/6JHAN. En la última década, la asociación entre la secreción rítmica de melatonina y el comportamiento rítmico del sistema inmune ha sido confirmada a lo largo de numerosas publicaciones realizadas en diversas especies, incluyendo humanos. Así, Giordano y col., describieron en 1993 que la administración diaria de melatonina era capaz de promover variaciones estacionales en la ADCC, provocando un aumento de la misma en verano y no afectándola en invierno. En aves también se ha descrito una estrecha relación entre el incremento nocturno de melatonina y el aumento en la actividad fagocítica en heterófilos, las principales células fagocíticas en aves (Rodríguez y col., 1999).

Se ha propuesto que el patrón nocturno de melatonina en fotoperíodos cortos promueve un aumento en la función inmune en previsión de las dificultades invernales, cuando las bajas temperaturas y la menor disponibilidad de alimento podrían comprometer la respuesta inmune. Por lo tanto, el incremento en la síntesis de melatonina podría actuar como indicador para dirigir la energía destinada al crecimiento y a la reproducción hacia la termogénesis y la función inmune (Nelson y col., 2004).

La interconexión pineal-inmune, como parte constituyente de la red neuro-endocrino-inmune, es un circuito bidireccional, varios estudios han mostrado como el sistema inmune también ejerce sus efectos sobre la glándula pineal. Se ha demostrado que el IFN- γ aumenta la producción de melatonina en cultivos de pineal de rata en condiciones basales, mientras que en aquellos estimulados con isoproterenol el IFN- γ ejercía un efecto dual dependiente de la dosis del agonista (Withyachumnarnkul y col., 1991). Otros

experimentos han mostrado que la administración de IL-1 β recombinante inhibe los niveles séricos de melatonina en rata a través de un mecanismo mediado por sus receptores, mientras que los factores estimuladores de colonias tanto de granulocitos (G-CSF) como de granulocitos y monocitos (GM-CSF) estimulan la síntesis de melatonina tanto *in vivo* como *in vitro* (Zylinska y col., 1995).

2.3.3.4.- Efectos de la pinealectomía sobre el sistema inmune

El papel de la glándula pineal sobre la regulación del sistema inmune ha sido ampliamente estudiado en roedores y aves sometidos a pinealectomía quirúrgica y funcional. Esta última se puede llevar a cabo por la eliminación o lesión de las estructuras que inervan la pineal, como el SCG, manteniendo los animales bajo luz continua o inyectándolos con antagonistas de los receptores β -adrenérgicos (propranolol), los cuales bloquean la activación adrenérgica pineal y la consecuente producción de melatonina.

La pinealectomía presenta una relación directa con el peso de órganos linfoides primarios y secundarios. Así, el timo y el bazo de ratones, ratas y hámster pinealectomizados presentan un significativo descenso de peso, que en algunos casos puede llegar a ser del 70% (Vaughan y col., 1971; McKinney y col., 1975). En ratones BALB/c sometidos a luz continua se ha observado una anormal involución tímica, presentándose una ausencia de linfoblastos y una masiva depleción de linfocitos en la corteza. La mayor alteración observada en bazo es la pérdida de centros germinales y una aparente inactividad de la pulpa roja, mientras que la pinealectomía produjo una disminución en el peso en los nódulos linfáticos asociada a una pérdida folicular en la corteza exterior, un área dependiente de células B, junto con una reducción en el número de linfocitos en el paracortex, área dependiente de células T (Maestroni y col., 1986).

La pinealectomía en ratas recién nacidas conlleva una desorganización tímica (Csaba y col., 1975), mientras que en ratas adultas disminuye la actividad de las enzimas L-ornitina-decarboxilasa (ODC) y la S-adenosil-L-metionina decarboxilasa (SAMd) tímicas (Scalabrino y col., 1979; Fraschini y col., 1980), ambas pertenecen a la ruta biosintética de las poliaminas y están relacionadas con el crecimiento y la diferenciación celular.

La respuesta inmune también se observa afectada tras la inactivación pineal, ratas pinealectomizadas a las 6 semanas de vida presentan una respuesta inmune disminuida, cuantificada como reactividad de Arthus (Jankovic y col., 1970). Se ha descrito que la pinealectomía neonatal en ratas retrasa la curación de heridas, provoca alteraciones hematológicas a nivel de linfocitos, eritrocitos y leucocitos y provoca una deficiencia en la respuesta del cerebro a la infección causada por *Staphylococcus aureus* (Beskonakli y col., 2000). La exposición de luz continua causa un descenso en la producción de péptidos tímicos como la timosina $\alpha 1$ y timulina (Molinero y col., 2000) y potencia el efecto de la inmunosupresión inducida por catecolaminas a través de los receptores α -adrenérgicos. Ratones BALBc tratados con propanolol también presentan una disminución en la producción primaria y secundaria de anticuerpos en respuesta a la inyección de eritrocitos de oveja (SRBC) solo cuando el antagonista es administrado al atardecer (Maestroni y col., 1986).

2.3.3.5.- Efectos de la administración de melatonina sobre el sistema inmune

La administración de melatonina en aves y mamíferos incluidos los humanos influye sobre el sistema inmune. La mayoría de los datos publicados en esta línea han confirmado que la administración de melatonina *in vivo* promueve un aumento en la morfología de los órganos inmunes (Guerrero y col., 2002). Observándose un aumento en el peso del timo y/o el bazo en varios roedores tanto en condiciones basales como en condiciones de inmunosupresión inducidas por glucocorticoides (Haldar y col., 2004) o la edad (Tian y col., 2003). La administración de melatonina también protegió a ratas contra los efectos inducidos por la dexametasona, como la pérdida de peso corporal o la atrofia tímica y adrenal (Mori y col., 1984).

La administración de melatonina incrementa la respuesta mitogénica en esplenocitos de ratón en respuesta a concavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS). También se han observado efectos sobre la respuesta mediada por células en mamíferos, en los cuales se ha demostrado un efecto inmunoestimulador de la melatonina. En ratones, la administración de melatonina provoca un aumento del número de células NK y monocitos en médula ósea (Currier y col., 2000) y un aumento en la ADCC, en el caso de ratones BALB/c (Giordano y col., 1993), mientras que en humanos se ha descrito un incremento en la actividad NK inducida por la administración de melatonina (Lissoni y col., 1986).

Los efectos de la melatonina sobre la respuesta humoral en animales no inmunodeprimidos no son tan claros. Una función adicional de la melatonina en el sistema inmune es su participación en la regulación de la expresión génica de citoquinas y otros mediadores inmunológicos en bazo, timo, nódulos linfáticos y médula ósea. Numerosos estudios realizados en diversas cepas han mostrado que la melatonina es capaz de aumentar la presentación antigénica por los macrófagos esplénicos a la vez que incrementa la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y la producción de IL-1 y TNF- α (Pioli y col., 1993). En ratas, la melatonina aumenta la producción del péptido tímico timosina $\alpha 1$ a través de un incremento en la expresión del gen de la protimosina α (Molinero y col., 2000). La melatonina inyectada al atardecer aumenta la producción de IFN- γ en suero de hámster sirio (Champney y col., 1998).

Una de las funciones por las cuales la melatonina ejerce su control sobre el sistema inmune es la apoptosis. Mientras que la administración oral de melatonina inhibe la apoptosis de células B en su estadio pre-B en médula ósea murina (Yu y col., 2000), las acciones antiapoptóticas sobre las células T se llevan a cabo en todas las etapas del desarrollo tímico en ratas (Sainz y col., 1995).

Quizá las situaciones en las cuales los efectos estimuladores de la melatonina sobre el sistema inmune son mejor demostradas son aquellas en donde existe inmunosupresión. Maestroni y col., han puesto de manifiesto el efecto de la melatonina sobre ratones inmunosuprimidos con propanolol o corticosterona, en los cuales la melatonina contrarrestó la disminución en la respuesta de anticuerpos primarios contra la inmunización por SRBC (Maestroni y col., 1986). En ratones ancianos o tratados con ciclofosfamida, el tratamiento con melatonina aumenta la actividad de las células T helper y la producción de IL-2 (Caroleo y col., 1990; 1992). En base a diversos trabajos, Maestroni y col. han propuesto que estos efectos podrían estar mediados por péptidos opioides, ya que el uso de naltrexona, un antagonista opioide específico, previene los efectos inmunoestimuladores de la melatonina (Maestroni y col., 1987; 1989).

A diferencia de los estudios *in vivo*, los resultados acerca del uso de melatonina en modelos *in vitro* parecen contradictorios. Estudios en esplenocitos de ratón han mostrado

que la melatonina incrementa la producción de IFN- γ (Colombo y col., 1992). También se ha observado en cultivos primarios de linfocitos humanos, que la melatonina a una concentración de 1nM, incrementa la proporción de células que portan receptores de IL-2 (IL-2R) en presencia de fitohemaglutinina (PHA) (Fraschini y col., 1990). Linfocitos aislados de niños con amigdalitis aguda presentaron una disminución de la subpoblación de linfocitos B, la cual fue restaurada tras el cultivo con 1nM de melatonina (Lopez-Gonzalez y col., 1998). Dosis de melatonina entre 10^{-12} y 10^{-6} incrementan significativamente la proliferación en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Kuhlwein y col., 2001). Se ha demostrado que la melatonina a una concentración de 0.1 nM, es capaz de activar células T (Th1) humanas a través de un incremento en la producción de IL-2 e IFN- γ (Garcia-Mauriño y col., 1997). Estos autores también han descrito un aumento en la producción de IL-2 por la línea celular linfocítica Jurkat, tras la subestimulación de las células con PHA o con PMA (Garcia-Mauriño y col., 2000). Se ha descrito un efecto represor de la melatonina sobre la expresión génica de la 5-lipoxigenasa en células B humanas (Steinhilber y col., 1995). Contrariamente, otros estudios no han encontrado efectos de la melatonina, ni en células en reposo ni estimuladas con PHA, ConA o PMA. Así la melatonina, tanto a bajas como a altas concentraciones no activa la proliferación de células inmunes en humanos (Wolfler y col., 1998), rata y ratón (Pahlavani y col., 1997). Además de linfocitos, los monocitos también son una diana para la acción de la melatonina. Así la combinación de 0.1 nM de melatonina y LPS induce citotoxicidad en monocitos humanos a través de un incremento en la producción de IL-1 y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Morrey y col., 1994). Otros autores han descrito que la misma concentración de melatonina activa la producción de IL-6 e IL-12 (Garcia-Mauriño y col., 1999) y disminuye la de IL-10 en PBMC (Kuhlwein y col., 2001). Tanto el incremento en IL-12 como el descenso de IL-10 inducidos por la melatonina pueden actuar sobre la célula T causando una respuesta Th1. La melatonina también aumenta la producción de TNF- γ y disminuye la liberación del factor tisular (TF), el disparador más potente de la coagulación sanguínea en monocitos (Fjaerli y col., 1999). Finalmente, la melatonina a concentraciones farmacológicas reduce la producción de NO en macrófagos inmunoestimulados con LPS a través de un descenso en la expresión génica de la NOS inducible (iNOS) asociado a la inhibición del factor de transcripción (NF κ B) y una disminución de la cantidad de proteína (Gilad y col., 1998; Zhang y col., 2004).

En médula ósea, la melatonina actúa sobre el sistema hematopoyético, donde promueve una actividad estimuladora de colonias asociada a la inducción de citoquinas opioides (MIOS) derivadas de células Th (Maestroni y col., 1994; Maestroni y col., 1986). Estos efectos parecen ejercerse a través de los receptores opioides del tipo 1 κ , identificados en macrófagos de médula ósea, y por la IL-1 (Maestroni y col., 1999).

La respuesta inmune innata también ha sido estudiada en ensayos *in vitro* y se ha observado que la melatonina tiene un efecto bifásico sobre el estallido respiratorio inducido por PMA en neutrófilos, mientras que bajas dosis (10 nM) incrementa la respuesta, dosis altas (2 nM) la inhiben (Pieri y col., 1998). También, se ha descrito que la melatonina inhibe la producción de TNF- α e IL-8 inducida por LPS en neutrófilos (Silva y col., 2004). En la figura 22 se resumen las posibles funciones de la melatonina en diferentes células del sistema inmune.

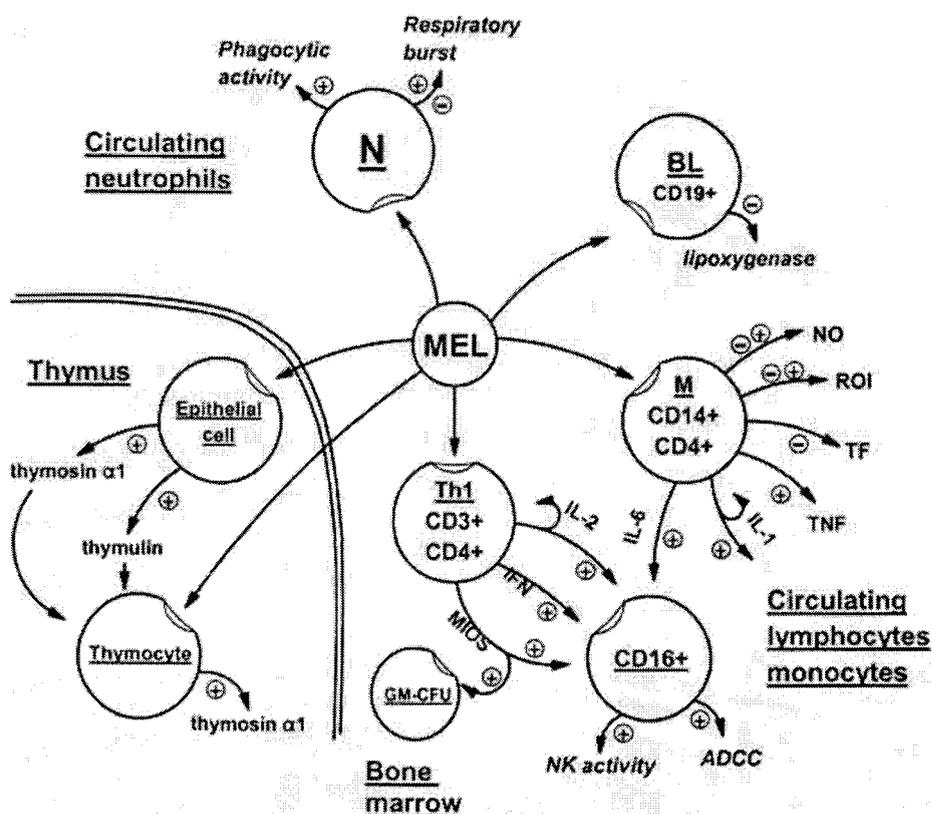


Figura 22. Regulación de la melatonina sobre el sistema inmune

2.3.3.6.- Receptores de melatonina en el sistema inmune

Otro hecho que pone de manifiesto la relación existente entre la melatonina y el sistema inmune es la presencia de receptores en el mismo en una gran diversidad de órganos y células inmunes de diversas especies: aves y mamíferos, incluidos los humanos. Los primeros estudios con ¹²⁵I-Mel mostraron sitios de unión, la mayoría de alta afinidad para la melatonina, en bolsa de Fabricio de diversas aves, bazo y timo de aves y roedores y células inmunes humanas como linfocitos, monocitos y granulocitos, con valores de Kd que oscilaban entre 0.03-1 nM.

La localización celular de los receptores de melatonina ha sido ampliamente discutida por los investigadores. Aunque los primeros estudios hicieron creer que los receptores estaban localizados únicamente en la membrana plasmática, la existencia de receptores nucleares para la melatonina es cada vez más evidente. Actualmente existen suficientes evidencias y para afirmar no sólo que la melatonina interacciona con receptores de membrana y nucleares, sino que además ejerce a través de los mismos importantes efectos reguladores sobre el sistema inmune:

- a) Se han detectado sitios de unión en membrana de timo y bazo de diversas aves (Poon y col., 1993; Rafii-El-Idrissi y col., 1996) y roedores (Lopez-Gonzalez y col., 1993; Martin-Cacao y col., 1993), en linfocitos humanos y macrófagos peritoneales murinos (Garcia-Pergañeda y col., 1999). Mediante estudios funcionales se ha mostrado que los receptores de membrana presentes en linfocitos humanos están acoplados a proteínas G sensibles a toxina pertúsica, a través de los cuales la melatonina es capaz de inhibir la producción de AMPc inducida por forskolina y estimular la de DAG y GMPc (Lopez-Gonzales y col., 1992; García-Pergañeda y col., 1997). Por otro lado, la primera demostración de un sitio de unión específico para melatonina a nivel nuclear fue realizada en 1993, cuando Liu y col., observaron que el 50% de la unión de un homogenado a la bolsa de Fabricio se realizaba a la fracción nuclear y solo el 15% a la membrana (Liu y col., 1993). Se han localizado sitios de unión nucleares en homogenado de bazo de cobayas (Poon y col., 1992), en homogenado de timo murino y más recientemente en núcleos celulares aislados de timo y bazo de rata (Rafii-El-Idrissi y col., 1998).

- b) En la última década se han podido detectar la expresión génica de los ARNm que codifican algunos receptores para melatonina en ciertos órganos y células del sistema inmune. Se ha detectado la expresión del receptor de membrana MT₁ en subpoblaciones de linfocitos T y B de timo y bazo de rata (Pozo y col., 1997). Posteriormente se demostró la expresión del receptor de membrana MT₁ y los receptores nucleares RZR α , ROR α 1 y ROR α 2, en células Jurkat (Garcia-Mauriño y col., 2000), así como la presencia de ARNm para MT₁, RZR α , ROR α 1 y ROR α 2, en diversas subpoblaciones de PBMC (Pozo y col., 2004).
- c) El desarrollo de agonistas y antagonistas específicos para ambos tipos de receptores de melatonina (Missbach y col., 1996; Dubocovich y col., 2003) ha permitido la caracterización de diversos efectos de la melatonina en el sistema inmune mediados por receptor. Se ha observado en macrófagos peritoneales de ratón, que el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la producción de AMPc mediada por forskolina puede bloquearse por luzindole (Garcia-Pergañeda y col., 1999). La administración de luzindole tanto *in vivo* como *in vitro* atenúa la activación de la proliferación de linfocitos esplénicos, tanto en ratones silvestres como MT₁ -/- sugiriendo una implicación directa del receptor MT₂ (Drazen y col., 2001). A través del uso de diversas tiazolidindionas como análogos de los receptores nucleares de melatonina, se ha puesto de manifiesto que el efecto estimulador de la melatonina sobre la producción de IL-2 e IL-6 en PBMC humanos parece deberse a una interacción con sus receptores nucleares, ya que el CGP 52608 fue capaz de mimetizar los efectos de la melatonina, mientras que el S 20098 no produjo ningún efecto (Garcia-Mauriño y col., 1997; 1998), similares resultados fueron obtenidos por los mismos autores en células Jurkat (Garcia-Mauriño y col., 2000).

2.3.4.- La melatonina como agente antioxidante

El estudio pionero de Tan y col. mostró que la melatonina puede neutralizar los OH \cdot generados por fotólisis de H₂O₂ de una manera dependiente de la dosis y con una eficiencia entre 5 y 10 veces superior a neutralizadores como el glutatión y el manitol. Estudios posteriores tanto *in vivo* como *in vitro* han confirmado este hecho. El producto formado por la neutralización de dos moléculas de OH \cdot por la melatonina se ha identificado como la 3-hidroxi-melatonina cíclica (Tan y col., 1998), la cual se excreta por

orina de una forma proporcional tanto a la cantidad de melatonina administrada como al grado de oxidación, por ello los niveles de este compuesto se consideran un índice de la capacidad neutralizadora de la melatonina frente al OH \cdot . Recientemente se ha demostrado que la 3-hidroximelatonina cíclica posee capacidad neutralizadora de radicales libres por sí misma (Tan y col., 2003). La melatonina también posee capacidad para neutralizar H₂O₂ (Tan y col., 2000), aunque el mecanismo mediante el cual ocurre no ha sido bien detallado, producto de esta interacción se obtiene el metabolito N₁-acetil-N₂-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), cuya capacidad antioxidante contra el daño oxidativo inducido por H₂O₂ en ADN y lípidos también se ha puesto de manifiesto (Tan y col., 2001). La capacidad neutralizadora sobre la formación y la citotoxicidad del singlete de oxígeno (¹O₂) también se ha mostrado. ¹O₂ es una forma de oxígeno de alta energía generada normalmente por reacciones de fotosensibilización de colorantes y pigmentos biológicos. Al igual que el proceso de neutralización del H₂O₂, la oxidación que la melatonina sufre en la neutralización genera el metabolito AFMK (de Almeida y col., 2003). La melatonina se considera un eficiente neutralizador del radical peroxilo (LOO \cdot) *in vivo*, tanto por su acción directa sobre dichos radicales como a través de la neutralización de radicales hidroxilo (OH \cdot) y el anión peroxinitrito (ONOO $^-$) (Reiter y col., 2003). La detoxificación de HOCL, agente altamente oxidante formado por la mieloperoxidasa en neutrófilos activados, también ha sido evidenciada entre las acciones antioxidantes de la melatonina (Dellegar y col., 1999) al igual que la neutralización de diversas especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el NO \cdot , ONOO $^-$ y el anión peroxinitroso (ONOOH) (Blanchard y col., 2000).

Las enzimas antioxidantes son un mecanismo de defensa fundamental contra el daño inducido por radicales libres, ya que mediante su metabolización dichas enzimas los convierten en especies menos reactivas o productos no tóxicos. La primera relación entre la melatonina y un enzima antioxidante se describió hace más de 10 años cuando se observó que la administración de dosis farmacológicas de melatonina en ratas y pollos aumentaban marcadamente la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx). Además la melatonina también estimula la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que aunque no se considera una enzima antioxidante como tal, genera NADPH el cual es usado como cofactor por la GR. La melatonina también induce un aumento en las actividades de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Por otra parte, estudios moleculares han mostrado que la melatonina también

induce un aumento en la expresión de los ARNm de GPx, CuZnSOD (dependiente de cobre y zinc) y MnSOD (dependiente de manganeso) (Rodríguez y col., 2004; Reiter y col., 2004). Cuando la melatonina se comparó individualmente con los antioxidantes clásicos como las vitaminas E y C en modelos *in vivo* de alto estrés oxidativo, la melatonina exhibió una potencia superior a dichas vitaminas (Tan y col., 2002).

Debido a que numerosas patologías humanas cursan con daño oxidativo, muchos estudios han mostrado los efectos beneficiosos de la melatonina en diversas situaciones patofisiológicas. Así se ha observado que la melatonina reduce el daño neuronal en la enfermedad de Alzheimer, protege de la muerte a neonatos prematuros que presentan shock endotóxico o asfixia neonatal, así como en el síndrome de dificultad respiratoria (RDS) y en diversos modelos de isquemia/repercusión (Reiter y col., 2003; 2004; 2005).

Aunque los mecanismos de acción a través de los cuales la melatonina ejerce sus efectos antioxidantes están siendo activamente estudiados, todos los estudios realizados al respecto indican que la acción directa de la melatonina sobre la neutralización de radicales libres se ejerce a través de mecanismos independientes de receptor, favorecido por la gran facilidad que posee la melatonina para alcanzar cualquier rincón del organismo debido a su solubilidad en cualquier medio biológico. Por otra parte, el efecto de la melatonina sobre el sistema de enzimas antioxidantes parece ejercerse a través de mecanismos mediados por receptor (Carrillo-Vico y col., 2006).

2.3.5.- Efectos oncostáticos de la melatonina

Los efectos *in vivo* en animales han mostrado que la administración de la melatonina disminuye la progresión de tumores espontáneos, transplantados o inducidos por agentes cancerígenos en ratas, ratones y hámsteres. La melatonina endógena secretada por la glándula pineal también se considera una señal oncostática, ya que tras la pinealectomía se ha observado una aceleración en el crecimiento de diversos tumores, la cual se contrarresta tras la administración exógena de melatonina (Macchi y col., 2004; Sánchez-Barceló y col., 2005). En humanos, el uso de la melatonina reduce el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia frente a algunos tipos de tumores. Los estudios en humanos son especialmente relevantes ya que la mayoría de los mismos se han realizado en sujetos que no respondieron a ninguna de las terapias convencionales. Los efectos oncostáticos de la

melatonina son especialmente importantes en aquellos tumores dependientes de hormonas reproductoras, como el de mama o el de ovario (Hill y col., 1992; Sánchez-Barceló y col., 2003). En este sentido, una reciente revisión sobre diversos estudios epidemiológicos ha mostrado un posible incremento en el riesgo de contraer cáncer de mama en aquellas mujeres que trabajan por turnos, auxiliares de vuelo y en aquellas sometidas a campos magnéticos y luz artificial nocturna (Travis y col., 2004), situaciones en las cuales en las cuales se produce una eliminación o desorganización de la síntesis rítmica de melatonina.

Los estudios *in vitro* también han mostrado la capacidad antiproliferativa de la melatonina en diversas líneas celulares tanto humanas como murinas (mama, endometrio, ovario, coriocarcinoma, próstata, colon, melanoma, neuroblastomas, etc.). Sin embargo algunos trabajos no han mostrado efectos de la melatonina, incluso algunos han descrito efectos oncogénicos (Blask y col., 2002). Algunos estudios *in vitro* han mostrado que mientras que concentraciones fisiológicas de melatonina tienen un efecto oncostático, cuando se usa a concentraciones farmacológicas ejerce un efecto oncogénico.

Con respecto a los mecanismos de acción implicados en los efectos de la melatonina, uno de ellos está basado en la capacidad antioxidante, a través de la cual la melatonina reduce el daño en el ADN inducido por ROS y RNS, el cual es de gran importancia en el comienzo de un proceso oncogénico, como en la progresión tumoral. Una vez formado el tumor, la melatonina puede alterar su crecimiento mediante otras vías. Blask y col. definieron un mecanismo mediante el cual la melatonina, a través de un proceso mediado por sus receptores de membrana, inhibe la captación de ácido linoleico (LA) y su posterior conversión intracelular a ácido 13-hidroxicanoico (13-HODE), un metabolito que induce proliferación celular a través de un aumento en la mitogénesis mediada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) por medio de la vía de las MEK y las ERK1/2 quinasas, tanto en células de hematoma como en células de cáncer de mama transplantadas (Blask y col., 2003; 2004). Se ha descrito que la melatonina es capaz de inhibir la actividad telomerasa en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. La telomerasa es solo activa en la mayoría de las células tumorales, células de la línea germinal y en aquellas con una alta tasa de recambio (sangre, piel e intestino). La melatonina inhibió tanto la subunidad catalítica como la subunidad compuesta por ARN de la enzima, promoviendo una reducción en el crecimiento tumoral de dichas células cuando fueron transplantadas en ratones nude (Leon-Blanco y col., 2003). Las acciones antiestrogénicas de la melatonina

también se han descrito como posible base de la inhibición que la melatonina ejerce en ciertos tumores mamarios dependientes de hormona. La melatonina suprime la actividad transcripcional del receptor de estrógeno a través de su receptor de membrana MT_1 (Kiefer y col., 2005). Otros estudios también han mostrado que la melatonina inhibe la transcripción del receptor de estrógenos a través de una vía mediada por calmodulina (del Rio y col., 2004), mientras que el receptor nuclear $RZR\alpha$ también ha sido involucrado en el proceso. En esta misma línea celular también se ha descrito que la melatonina puede actuar sobre la síntesis local de estrógenos, ya que es capaz de inhibir la actividad aromatasa, enzima encargada de la biosíntesis de estrógenos a partir de testosterona (Cos y col., 2005). Además de los mecanismos descritos la melatonina posee una clara acción antiapoptótica en diferentes líneas tumorales, la cual potencia sus efectos oncostáticos (Sainz y col., 2003).

OBJETIVOS

La melatonina, el principal producto de la glándula pineal, tiene entre sus acciones biológicas un importante papel inmunomodulador, regulando la producción de un gran número de citocinas. Además el efecto directo de esta hormona se ha confirmado al demostrar la existencia de receptores específicos en células inmunocompetentes. En los últimos años, se ha demostrado síntesis de melatonina en diferentes tejidos extrapineales, entre las que se encuentran células y tejidos del sistema inmune.

En este proyecto nos proponemos analizar el papel de la melatonina y sus acciones en diferentes tejidos y células inmunocompetentes, realizando para ello un doble abordaje:

In vivo:

- 1.- Estudiar la expresión del gen del enzima arilalkilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) en diferentes tejidos del sistema inmune en dos cepas de ratón: Swiss y C57BL/6 (deficientes en la síntesis de melatonina pineal) y en la cepa C3H/HeNHsd (usado como control),
- 2.- Estudiar la síntesis de melatonina en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en las tres cepas de ratón en reposo y estimuladas con PHA.

In vitro:

- 3.- Desarrollo de un modelo celular knockout condicional para la síntesis de melatonina en una línea linfocítica humana (células Jurkat), utilizando un RNA antisentido frente al enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) último enzima de la ruta biosintética de melatonina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL SISTEMA INMUNE EN DIFERENTES MODELOS MURINOS.

1.1.- Animales

Se utilizaron tres cepas de ratón: La cepa C57BL/6J, la cuál se ha descrito como deficiente en la producción de melatonina, debido a un error en el *splicing* de la AANAT (Roseboom y col., 1998). La cepa Swiss que presenta bajos niveles de melatonina (Vivien-Roels y col., 1998) y por último la cepa C3H/HeNHsd como control (Goto y col., 1989). Todos los ratones fueron machos y se adquirieron en el laboratorio Harlan Ibérica, S.L. Se mantuvieron en el animalario de la facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, hasta su sacrificio. Todos los animales recibieron agua y dieta comercial de fórmula cerrada (Safe, Francia) *ad libitum* y fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura (22°C) y humedad (45 ± 5%), así como en un ciclo controlado de luz-oscuridad con 14 horas de luz y 10 de oscuridad (14:10). La luz se apaga desde las 20.00 hasta las 06.00 horas. Todos los protocolos llevados a cabo han seguido las recomendaciones de la Unión Europea relativas a la experimentación animal (Directiva del Consejo de Europa 86 /609 /CEE).

1.2.- Obtención de las muestras

Los animales fueron sacrificados a las 9 semanas de edad, entre las 9 y 10 de la mañana, por decapitación sin anestesia. Tras el sacrificio de los animales se obtuvieron y se preservaron muestras de sangre de cada animal por separado, en tubos vacuette® de 3 ml. con EDTA como anticoagulante, manteniéndose a 4 °C hasta su procesamiento. Se tomaron muestras de médula ósea de las patas traseras del animal (Conti y col., 2000), de las que se obtuvieron células y se criopreservaron hasta su utilización. También se obtuvieron tejidos tales como la glándula pineal, el bazo y el timo.

1.2.1.- Obtención de plasma y células

Para obtener el plasma de las tres cepas de ratón, los tubos con las muestras de sangre se centrifugan a 1800 rpm por 5 minutos a 4 °C en una centrífuga (Beckman 21 R, Palo Alto, CA, USA), quedando el paquete globular en el fondo del tubo y en la parte superior

un líquido amarillento correspondiente al plasma. Dentro de una cabina de flujo laminar vertical (Revco *hábitat*, Asheville, NC, USA), el plasma de cada muestra se recogió cuidadosamente por aspiración con un pipeta *Pasteur* de vidrio y se pasó a otro microtubo. Se congelaron a -20°C hasta su análisis.

La purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtiene por centrifugación en un gradiente de densidad *ficoll hypaque* (Seromed Biochrom, Berlin, Alemania) según el método de Boyum (Boyum, 1968). Separado el plasma, al precipitado celular se le añadió 1 ml de solución salina fisiológica. Posteriormente se deposita sobre 2 ml de *ficoll* y rápidamente se realiza una centrifugación a 3000 rpm (Beckman 21 R) durante 15 minutos a 4°C , sin freno. Tras la centrifugación, el sistema de dos fases establecidas por el *ficoll* y el preparado sanguíneo sufre una reorganización de forma que los PBMC pasan a formar una monocapa entre el plasma y el *ficoll*. Los PBMC se recogen cuidadosamente por aspiración con una pipeta *Pasteur* y se lavan dos veces con solución salina, la primera a 1500 rpm durante 10 minutos y la segunda a 1000 rpm por 10 minutos, este último lavado se hace para eliminar el mayor número de plaquetas. Se realiza un tercer lavado con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) a 1500 rpm por 10 minutos y finalmente las células son resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo completo constituido por RPMI 1640 con 25 nM de HEPES, suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2 nM), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 ug/mL) (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido.).

La cuantificación de células se realiza en cámara *Fuchs-Rosenthal* y la viabilidad celular se determina por exclusión con tripan azul (Sigma-Aldrich), siendo siempre mayor al 95%.

La extracción de médula ósea se hace a partir de los dos huesos fémur de cada ratón. Para esto se abre el bajo abdomen con unas tijeras y se expone una de las patas sin piel. Se va cortando con cuidado los músculos y ligamentos que cubren la pata, hasta que se observen las articulaciones y se hace un corte superior para separar el fémur de la cadera y otro inferior para separarlo de la tibia y el peroné. Con una jeringa se introduce en el fémur solución salina fría para obtener la médula ósea sobre una placa de petri pequeña. Con una pipeta *Pasteur* se aspira la médula ósea y se coloca en un tubo y se lava con solución

salina dos veces. Se realiza una cuantificación celular y por último el botón de células se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2.2.- Obtención de tejidos

Para la extracción de la glándula pineal de cada animal, se levanta la tapa del cráneo con ayuda de unas pinzas y la glándula se visualiza en la intersección existente entre los dos hemisferios cerebrales y el cerebelo.

Para la obtención del timo se abre el torax mediante una incisión, desde el xifoides hasta el cuello. Con la ayuda de unas pinzas se abren las costillas, se visualiza el timo delante del corazón y se extrae con cuidado.

Para obtener el bazo de cada animal se procede a abrir el peritoneo con una incisión de 2-3 cm mediante unas tijeras. Se localiza el bazo en el borde inferior izquierdo del abdomen, se extrae con unas pinzas y se corta el tejido conectivo.

1.3.- **Cultivos de células**

Las PBMC se cultivaron en placas de cultivo de 12 pocillos, con medio completo a una concentración de 2×10^6 células/ml y $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA), a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 5%. De cada muestra se cultivaron células sin estimular en las mismas condiciones como controles. A las 48 horas, los cultivos fueron recogidos con pipeta *Pasteur* en microtubos y centrifugados a 1800 rpm (Eppendorf *Centrifuge 5417 R*, Vaudaux, Suecia), durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los sobrenadantes fueron recogidos en otros microtubos y guardados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior análisis. Los precipitados celulares fueron congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.4.- Extracción de ARN

1.4.1.- Extracción a partir de células

El aislamiento de ARN es un pre-requisito para el análisis de expresión génica, utilizando frecuentemente la técnica de transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR). La extracción de ARN de las células de la médula ósea y PBMC de las tres cepas de ratón se realiza con un kit comercial: *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche, Mannheim, Alemania), el cuál es específico para la purificación de ARN total a partir de cultivos celulares.

Fundamento: En primer lugar se lleva a cabo la lisis celular, incubando las muestras en un buffer lisis/unión, al mismo tiempo las RNasas son inactivadas. Tras este paso, el lisado se pasa por una columna de unión a ácidos nucleicos, optimizadas para la unión a ARN. El DNA contaminante es digerido con Dnasa I y tras varios lavados el ARN es eluido con agua.

Método: Se extrajo ARN a partir de 2×10^6 células/ml de cada cepa de ratón tanto de células estimuladas como sin estimular. El ARN se eluye de la columna con 50 μ l de buffer de elución. El ARN se cuantifica midiendo su absorción de luz ultravioleta a 260 nm en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro RNA/DNA, Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), para ello se realizó una dilución 1:10 con 5 μ l de ARN en 45 μ l de agua. Para comprobar la posible contaminación con proteínas, se lee la absorbancia a 280 nm y se mide la relación de A_{260}/A_{280} , que debe ser de 1,8-2,0. Los 45 μ l restantes de ARN se evaporan completamente en un secador de muestras (Gyrovap, Howe, Londres, Reino Unido), para concentrar la muestra y poder retrotranscribir todo el ARN.

1.4.2.- Extracción a partir de tejidos

La extracción de ARN de la glándula pineal, el timo y el bazo de las tres cepas de ratón, se lleva a cabo por medio de *Tripure Isolation Reagent* (Roche), este reactivo permite el aislamiento de ARN, ADN y proteínas de la misma muestra. El procedimiento es mejorado a partir del método de extracción de ARN desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987).

Fundamento: Durante la homogenización o lisis de la muestra, este agente rompe las células y desnaturaliza las nucleasas endógenas, así preserva la integridad del ARN y ADN. Después se adiciona cloroformo al extracto y al centrifugarse la mezcla se forman tres fases: una fase superior (acuosa), una interfase blanca y una fase inferior orgánica. El ARN es recuperado de la fase acuosa por precipitación con isopropanol.

Método: Para obtener el homogenado de la glándula pineal, el timo y el bazo de las tres cepas de ratón, a dichos órganos se les añade 1 ml *Tripure Isolation Reagent* y se someten a 3 pulsos de 10 seg cada uno en un politrón. En el caso de la glándula pineal el homogenado se obtiene agitando varias veces con micropipeta. Se añade 200µl de cloroformo al homogenado y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifuga a 14, 000 g durante 15 min a 4°C y se recoge la fase superior (acuosa), se pasa a otro microtubo. Se añade isopropanol frío en una relación 1:1 y se agita vigorosamente. Se incuba a -20 °C durante 1 hora y se centrifuga a 14, 000 g durante 15 min a 4°C. El precipitado se lava con etanol al 75%, tras una centrifugación se retira el etanol. Finalmente se deja secar el precipitado y se resuspende en 50µl de agua RNAsa free. Las muestras se cuantifican por espectrofotometría.

Cada muestra, (excepto glándula pineal) fue sometida a tratamiento con DNasa I (Roche), para eliminar el ADN contaminante. La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 60 µl: 6 µl de buffer (10X), 45 µl de ARN, DNasa I (2U por cada 10 µg de ARN), H₂O (hasta completar 60 µl). Esta mezcla de reacción se incuba 30 min a 37 °C, a continuación se inactiva la enzima incubando 10 min a 65 °C. A la muestra (digerida) se le vuelve a añadir 1 ml *Tripure Isolation Reagent* y se repite el protocolo de extracción de ARN y finalmente se vuelve a cuantificar por espectrofotometría.

1.5.- Retrotranscripción

Fundamento: La retrotranscripción es una técnica que permite obtener ADN complementario (ADNc) a partir de ARN. Esta reacción la lleva a cabo la enzima transcriptasa inversa. Los diferentes ARNs presentes en la muestra son desnaturalizados, destruyendo de esta manera las estructuras secundarias, tanto intracatenarias como intercatenarias y favoreciendo que todo el ARN pueda ser retrotranscrito a ADNc. El

ADNc que obtenemos lo usamos como molde para múltiples replications mediante la PCR.

Método: Se retrotranscriben a ADNc 1 µg de ARN de PBMC y 3 µg de ARN en el caso de la médula ósea y tejidos (pineales, timos y bazos). En primer lugar se lleva a cabo un paso de desnaturalización del ARN durante 15 minutos a 85 °C en un termociclador y se para la reacción en hielo. A continuación se procede a la retrotranscripción mediante el kit *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, WI, USA). La retrotranscripción se hace en un volumen final de 40 µl. Tras la desnaturalización se le añade la mezcla de reacción que contiene: RT-buffer 1X, 20 mM DTT, 0.5 mM de dNTPs (desoxynucleótidos fosfatos), 0.5 µg de oligosdT, 40U de Rnasin (*Rnase inhibitor*) y 200U de RTasa (M-MLV RT). El ARN desnaturalizado más la mezcla de reacción se retrotranscribe durante 1 hora a 42 °C. Con el fin de comprobar la eficacia de la retrotranscripción se utilizan cebadores específicos para un gen que se expresa de manera constitutiva. β-actina para timo, bazo y médula ósea, con un producto de amplificación de 746 pares de bases y HPRT en el caso de los PBMC, con un producto de amplificación de 174 pb.

1.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Fundamento: La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* desarrollada a mediados de la década de los ochenta por el grupo de Erlich (Mullis y col., 1986; Saiki y col., 1992). Esta técnica se basa en la amplificación enzimática de una secuencia de ADN cuyos extremos son complementarios a dos oligonucleótidos, que actúan como cebadores para la ADN polimerasa que cataliza el proceso. La repetición ciclica de este proceso, permite la amplificación exponencial del ADN molde, ya que los productos de amplificación de un ciclo sirven a su vez de ADN molde para el siguiente ciclo.

Método: Las reacciones para PCR se hicieron en un volumen final de 25µl conteniendo 5µl de ADNc, 400 µM de dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1 µM de cebadores y 2.5 U de Taq-ADN-polimerasa. En las PCRs internas se utilizó 1 µl del producto de la 1ª PCR. En cada PCR se puso un control negativo en el que se sustituyó el ADNc por agua.

1.6.1.- Diseño de la PCR

En el diseño de los cebadores para la amplificación de la AANAT se considera que se ha descrito para la cepa de ratón C57BL/6 una mutación puntual en el gen AANAT y que altera el *splicing* del ARN en pineal (Figura 23). Esto da como consecuencia la inclusión de un pseudoexon de 102 pb entre los exones 3 y 4 en el ARNm maduro de la AANAT, lo cuál codifica una proteína truncada porque contiene un codón de terminación (Roseboom y col., 1998). Se diseñaron dos parejas de cebadores para amplificar una *nested* PCR para los exones 3 y 4 asegurando flanquear la posible inserción, cebadores N2L, N2R y N22L, N22R (tabla 1). El producto de amplificación esperado para la 2ª PCR, es de 137 pb y con la inserción es de 239 pb.

El grupo de Slominski (Slominski y col., 2003), describió en diversos tejidos como piel, glándula pituitaria y cerebro una inserción de 89 pb entre los exones 1 y 2 (fig. 1), la cuál da como consecuencia isoformas alternativas debidas a un defecto en el *splicing* entre estos dos exones. Se diseñaron dos parejas de cebadores para amplificar una *nested* PCR para los exones 1 y 2 asegurando flanquear la posible inserción, cebadores N1L, N1R y N11L, N11R (Tabla 1). El producto de amplificación esperado para la 2ª PCR, utilizando los cebadores N11L y N11R es de 105 pb y con la inserción es de 194 pb.

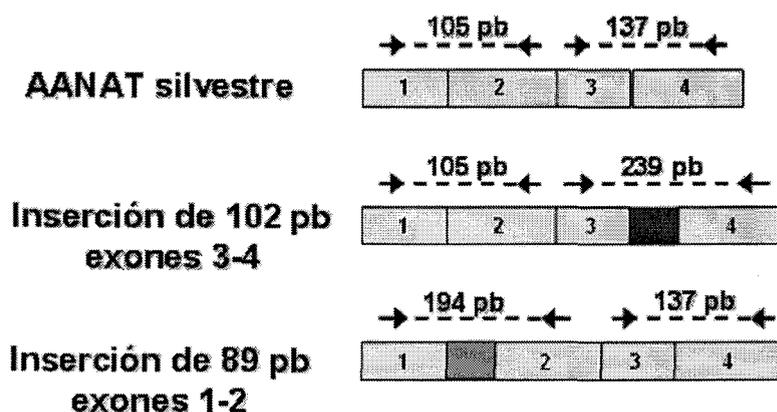


Figura 23. Estructura del gen de la AANAT murino. Las cajas representan los exones, las zonas rojas representan los sitios donde se han detectado inserciones. Los cebadores están representados por las flechas.

Los ciclos de temperaturas para la 1ª y 2ª PCR exones 3 y 4 para AANAT fueron los siguientes: 35 ciclos (94⁰C 3min, 94⁰C 30 seg., 59⁰C 45 seg., 72⁰C 1 min) seguido de una extensión final de 6 min a 72⁰C.

Los ciclos de temperaturas para la 1ª y 2ª PCR exones 1 y 2 para AANAT fueron los siguientes: 35 ciclos: 35 ciclos (94⁰C 3min, 94⁰C 30 seg., 58⁰C 45 seg., 72⁰C 1 min) seguido de una extensión final de 6 min a 72⁰C.

Nested PCR	cebadores	Secuencia
1ª PCR E3 y E4	N2L	5'-CCTAACCCTGTGTCCAGAGC-3'
	N2R	5'-GCATCCTCACACATGAGCAC-3'
2ª PCR E3 y E4	N22L	5'-CGCTGTGGGACAAGGAGA-3'
	N22R	5'-TCTCCACAGGAGGACAGAGC-3'
1ª PCR E1 y E2	N1L	5'-TTGCAGTCAGGAGTCTCAGC-3'
	N1R	5'-CCTCAGGTTTCAGGGAGTTG-3'
2ª PCR E1 y E2	N11L	5'-GCTTCTCCTAGTCCCAGCAC-3'
	N11R	5'-AGGGGTTCCTCCAGCTTCA-3'

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de la AANAT de ratón.

Los productos de las PCRs fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Con el fin de identificar los fragmentos amplificados se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp ladder (Biotools B & M, España).

1.7.- Medida de la actividad N-acetiltransferasa

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

Fundamento: El análisis se basa en la N-acetilación de la triptamina por la NAT utilizando como donador el grupo acetilo el acetyl Coenzima A (AcCoA) marcado con ¹⁴C,

obteniéndose como producto N-acetiltriptamina marcada. El producto de la reacción será directamente proporcional a la actividad enzimática.

Método: Se realiza el ensayo partiendo de 4×10^6 PBMC estimuladas con PHA y sin estimular, incluídas las tres cepas de ratón. Las células son homogenadas en 100 μ l de PBS y 10 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma). La mezcla de reacción se prepara antes de comenzar el ensayo con los sustratos de la reacción en un volumen final de 10 μ l. Está compuesta para cada muestra de los siguientes reactivos: 5 μ l de Triptamina (5.6mM en PBS), 2 μ l de AcCoA (0.8mM en PBS), 2 μ l de ^{14}C -AcCoA (40 nCi), 1 μ l de tampón de fosfato sódico (0.05M pH 6.8).

Se toman 20 μ l de homogenado de PBMC y se transfieren al fondo de un tubo de microfuga en frío. Se añaden 10 μ l de la mezcla de ensayo sobre la pared del tubo de forma que las dos fases, homogenado y solución no se mezclen, enseguida se lanza la reacción con una rápida centrifugación de varios segundos, consiguiendo así la unión de las dos fases. Se incuban durante 20 minutos a 37°C en un baño con agitación suave, al final se detiene la reacción añadiendo 100 μ l de tampón borato sódico frío (0.2M pH 10) y 1 ml de cloroformo también frío. Después se agita durante 5 minutos para extraer la N-acetiltriptamina marcada radioactivamente.

En la fase acuosa se encuentra el ^{14}C -AcCoA que no ha transferido el grupo acetilo a la triptamina, por lo que se centrifuga en una microfuga 30 segundos a 10.000 rpm. y se aspira el sobrenadante quedándonos sólo con el cloroformo. Se vuelve a añadir tampón borato y se repite el proceso. Se toman 700 μ l de cloroformo y se transfieren a un vial de centelleo dónde se deja evaporar. Finalmente se añade 1 ml de líquido de centelleo y se cuantifica la radiactividad durante 1 minuto en un contador beta (Microbeta 1450, Perkin Elmer, La Jolla, CA, USA).

En cada ensayo se puso un control negativo en el que se sustituyó la muestra por PBS. Las actividades totales (AT) se obtuvieron con 10 μ l de mezcla de reacción evaporada y al igual que las muestras añadiéndole líquido de centelleo.

CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD NAT: El cálculo de la actividad se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{(\text{cpmM} - \text{cpmB}) \cdot 1.42 \cdot 3 \cdot 2.3}{\text{AT}}$$

cpmM = cuentas por minuto de cada muestra

cpmB = cuentas por minuto del blanco

1.42 = factor de corrección al tomar 700 μL de cloroformo

3 = se incubó 20 minutos y la actividad se expresa por hora

2.3 = nmoles totales de acetil CoA en cada muestra

nmoles de ^{14}C -AcCoA : como la actividad específica es de 57 nCi/nmol y en el ensayo se añaden 40 nCi, son 0.70 nmoles.

nmoles de acetil CoA : se añaden por muestra 2 μl de una solución 0.8 mM, por lo que se tienen 1.6 nmoles.

AT = cuentas totales que se añaden a cada tubo.

La actividad NAT se expresa como nmol de N-acetilriptamina/mg de proteína·hora.

1.8.- Medida de la actividad hidroxindol-O-metiltransferasa

La actividad de la hidroxindol-O-metiltransferasa se midió según el método descrito por Champney y col. (1984).

Fundamento: El análisis se basa en la metilación de la N-acetilriptamina por la HIOMT, utilizando como donador del grupo metilo la S-adenosil metionina (SadM) marcada con ^{14}C obteniéndose como producto la 5-metoxi-N-acetilriptamina marcada. El producto de la reacción será por consiguiente directamente proporcional a la actividad enzimática.

Método: Se realiza el ensayo partiendo de 4×10^6 PBMC estimulados con PHA y sin estimular, incluidas las tres cepas de ratón y 10×10^6 células Jurkat Tet transfectadas e inducidas a expresar el antisentido frente a la HIOMT (sección II, apartado 15 y 16). La mezcla de reacción se prepara antes de comenzar el ensayo con los sustratos de la reacción en

un volumen final de 20 μ l. Está compuesta para cada muestra de los siguientes reactivos: 6 μ l de N-acetilserotonina (3mM en PBS 7.9), 6 μ l de SadM (400 μ M en PBS 7.9), 1.6 μ l de 14 C-SadM (40nCi por muestra), 4.4 μ l de tampón fosfato sódico (0.05M, pH 7.9), 2 μ l de H₂O.

Se toman 40 μ l de homogenado tanto de PBMC como de células Jurkat transfectadas y se transfieren al fondo de un tubo de microfuga en frío. Se añaden 20 μ l de la mezcla, enseguida se lanza la reacción con una rápida centrifugación de varios segundos, Se incuban durante 30 minutos a 37°C en un baño con agitación, al final se detiene la reacción añadiendo 100 μ l de tampón borato sódico frío (0.2 M pH 10 y 1 ml de cloroformo también frío, después se agita durante 5 minutos para extraer la 5-metoxi-N-acetiltriptamina marcada radioactivamente.

En la fase acuosa se encuentra el 14 C-SadM que no se ha unido a la N-acetilserotonina, por lo que se centrifuga en una microfuga 30 segundos a 10.000 rpm. y se aspira el sobrenadante quedándonos sólo con el cloroformo. Se vuelve a añadir tampón borato y se repite el proceso. Se toman 800 μ l de cloroformo y se transfieren a un microtubo, dónde se deja evaporar, finalmente se añade 1 ml de líquido de centelleo y se cuantifica la radiactividad durante 1 minuto en un contador de radioactividad beta.

En cada ensayo se puso un control negativo en el que se sustituyó la muestra por PBS, las actividades totales (AT) se obtuvieron con 20 μ l de mezcla de reacción evaporada y al igual que las muestras añadiendole líquido de centelleo.

CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD HIOMT: El cálculo de la actividad se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{(\text{cpmM} - \text{cpmB}) \cdot 1.42 \cdot 2 \cdot 3.23}{\text{AT}}$$

cpmM = cuentas por minuto de cada muestra

cpmB = cuentas por minuto del blanco

1.42 = factor de corrección al tomar 700µl de cloroformo

2 = se incuba 30 minutos y la actividad se expresa por hora

3.23 = nmoles totales de SadM en cada muestra

nmoles de ¹⁴C-SadM : como la actividad específica es de 60 nCi/nmol y en el ensayo se añaden 40 nCi, son 0.66 nmoles.

nmoles de SadM : se añaden por muestra 6 µl de una solución 0.4 mM, por lo que se tienen 2.4 nmoles.

AT = cuentas totales que se añaden a cada tubo.

La actividad HIOMT se expresa como nmol de melatonina/mg de proteína·hora.

1.9.- Cuantificación de proteínas

Se lleva a cabo mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith y col., 1985) utilizando el *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL, USA).

Fundamento: Este método permite la determinación colorimétrica de la proteína total de una muestra. Combina la reducción del Cu⁺² a Cu⁺ por las proteínas en un medio alcalino (reacción del biuret) y la determinación de los iones cuprosos formados por el establecimiento de un complejo con el BCA.

Método: Se utiliza como patrón BSA, las muestras fueron analizadas por duplicado, midiéndose la absorbancia a 550 nm y las concentraciones calculadas a través de la recta de regresión obtenida del patrón.

1.10.- ELISA

La cuantificación de melatonina en glándula pineal, plasma y sobrenadante de los cultivos de las PBMC de las tres cepas de ratón y de células Jurkat transfectadas (sección II, apartado 15 y 16), se realiza mediante un kit para ELISA (*Melatonin ELISA IBL*, Hamburg, Alemania).

Fundamento: El ensayo consiste en un ELISA competitivo, donde la melatonina biotinilada y no biotinilada compiten por sitios de unión a anticuerpos anti-melatonina. La cantidad de melatonina biotinilada unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de la muestra. Este complejo es determinado por el uso de anticuerpos anti-biotina marcados con fosfatasa alcalina y p-nitrofenol como sustrato de la enzima. La cuantificación se lleva a cabo comparando la actividad enzimática de las muestras con respecto a una curva preparada con estándares de concentración conocida.

Preparación de las muestras: La glándula pineal de cada cepa de ratón se sonica en 500 μ l de PBS y el homogenado se centrifuga 3 min a 16 000 g, el sobrenadante se pasa a otro microtubo. En el caso del plasma el volumen obtenido se completa hasta 500 μ l con PBS. Los sobrenadantes de las PBMC estimulados y no estimulados, así como de las células Jurkat transfectadas (sección II, apartado 2.15 y 2.16), se procesan 500 μ l como tal.

Previo al ensayo de ELISA, se realiza la extracción de melatonina de las diferentes muestras, estándares y controles a través de columnas de afinidad. A continuación se eluye con 1 ml de metanol puro, el cuál se deja evaporar. Para la realización del ELISA, se resuspenden bien las muestras en 300 μ l de agua destilada agitando con un vortex durante 1 min aproximadamente y se procede según el protocolo del kit.

2.- DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR KNOCKOUT CONDICIONAL PARA MELATONINA.

2.1.- Diseño experimental

Para obtener el modelo celular Knockout condicional para melatonina se utiliza un ARN antisentido frente a la HIOMT que es transfectado en la línea celular elegida. La expresión celular de este antisentido se realiza mediante el sistema de expresión T-REx (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), este sistema es muy eficaz ya que en células animales induce niveles de expresión del gen deseado (antisentido de la HIOMT) superiores a cualquier otro sistema de expresión.

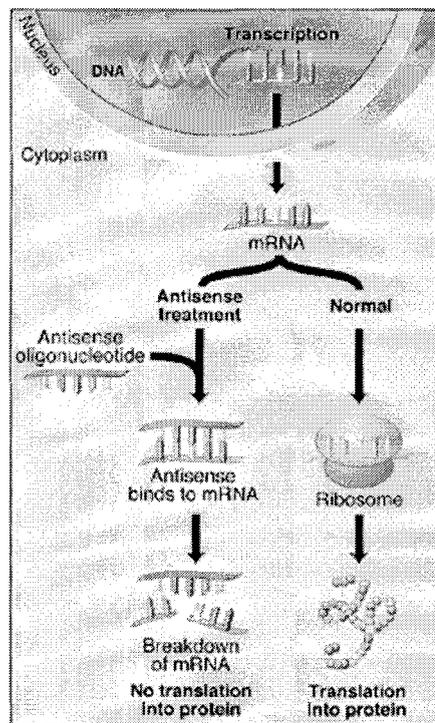


Figura 24. Mecanismo de acción de los ARN antisentido. Estas moléculas hibridan con los transcritos nucleares e impiden la traducción de la proteína de interés.

Este sistema T-REx utiliza dos tipos de vectores, que han de ser transfectados en la línea celular elegida:

2.1.1.- Vector de expresión: pcDNA4/TO/myc-His A, está compuesto por 5.1 kb y permite la expresión del gen de interés: la secuencia antisentido del cDNA de la HIOMT, ya que contiene secuencias de corte para diversas enzimas de restricción que nos permitirán el

clonaje de la secuencia antisentido. Este vector contiene 2 sitios operadores de tetraciclina (TetO₂) dentro del promotor del citomegalovirus humano (CMV). Las secuencias de TetO₂ sirven como sitios de unión a 4 proteínas represoras que unen tetraciclina (TetR). Contiene así mismo genes que le confieren resistencia a diversos antibióticos, entre ellos a la zeocina®, para la selección de líneas celulares estables (Figura 25).

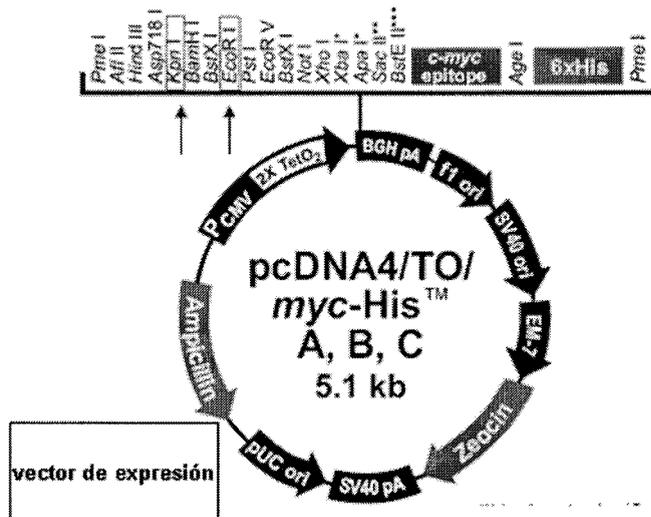


Figura 25. Mapa circular del vector de expresión pcDNA4/TO/myc-His A. Muestra los múltiples sitios de clonación, dependiendo de las enzimas de restricción a utilizar, las enzimas elegidas están señaladas con flechas rojas. Este vector contiene 2 sitios operadores de tetraciclina (TetO₂) dentro del promotor del CMV humano.

2.1.2.- Vector represor: pcDNA6/TR. Este vector expresa de manera constitutiva la proteína represora que une tetraciclina (TetR), bajo el control del promotor de CMV humano. Contiene genes que le confieren resistencia a diversos antibióticos, entre ellos a la blastidina®, para la selección de líneas celulares estables (Figura 26).

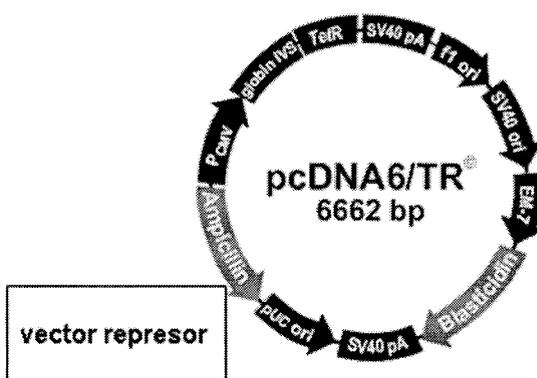


Figura 26. Mapa circular del vector pcDNA6/TR que expresa la proteína represora que une tetraciclina (tetR).

2.1.3.- Mecanismo de Represión

En ausencia de tetraciclina la expresión de gen clonado (secuencia antisentido de la HIOMT) es reprimida por la unión de las proteínas represoras (tetR), a las secuencias de los operadores (TetO₂) en el promotor del vector de expresión. Al añadir tetraciclina a las células, esta se une a los represores (TetR) y se desreprime el promotor híbrido CMV/ TetO₂ en el vector pcDNA4/TO/myc-His y por lo tanto se permite la expresión del gen clonado (Hillen y col., 1994) (Figura 27).

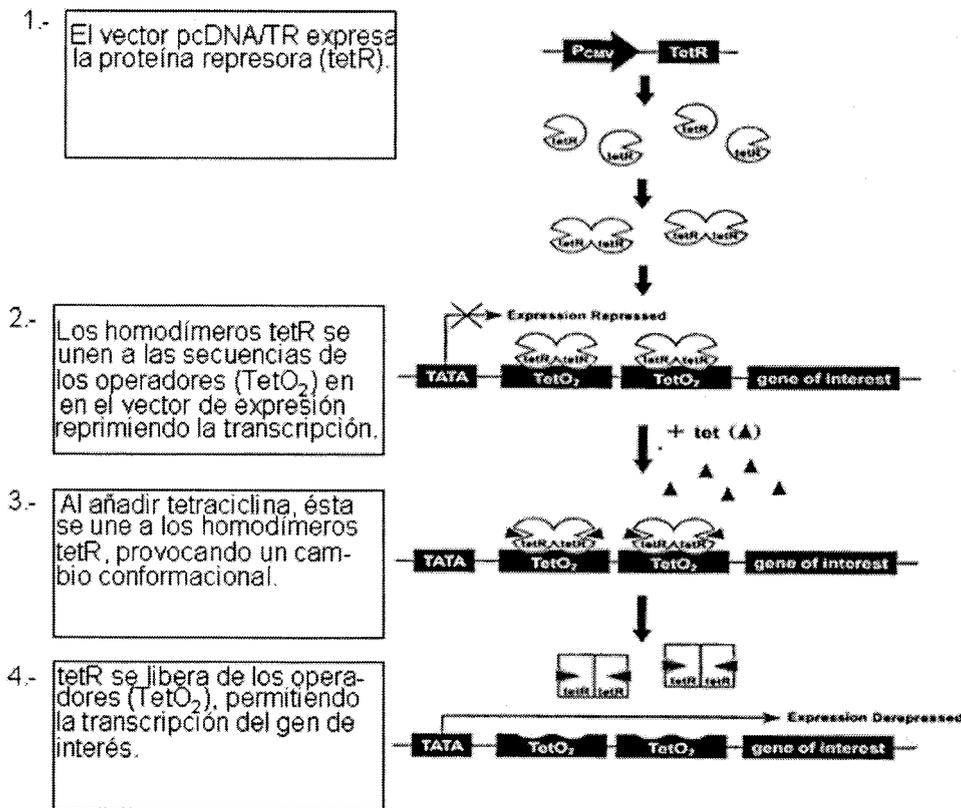


Figura 27. Esta figura describe los componentes y el mecanismo de acción del sistema T-REx.

Para llevar a cabo este diseño experimental, se realizaron los siguientes procedimientos:

2.1.4.- Modelo celular

Se utiliza la línea celular T-REx-*Jurkat cell lines* (Invitrogen). Esta línea celular Jurkat proviene de una leucemia humana de células T y ha sido transfectada permanentemente con el plásmido pcDNA6/TR. Este vector expresa constitutivamente la proteína represora (tetR), que une tetraciclina, así como genes que le confieren resistencia a antibióticos para su selección. Esta línea celular fue cultivada en medio de cultivo completo constituido por RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2 mM), penicilina y estreptomycin (1%), así como blasticidina® (10µg/ml) (Invitrogen), como antibiótico de selección ya que inhibe la síntesis de proteínas tanto en células procariotas como eucariotas (Takeuchi y col., 1958; Yamaguchi y col., 1965).

2.2.- Secuencia génica de la HIOMT y diseño de los cebadores

2.1.-El gen de la HIOMT humana tiene aproximadamente 35 kb y contiene dos promotores distintos (Rodríguez. y col., 1994) bajo los cuales se expresan 9 ó 10 exones. Se han identificado 3 diferentes transcritos para la HIOMT. Dependiendo de cuál promotor sea activo y debido a un splicing alternativo entre los exones 6 y 7 en pineal (Donahue y col., 1993) y en retina (Rodríguez y col., 1994), las isoformas encontradas son: (+6+7), (-6+7) y (-6-7). Fue clonado por Donahue en 1993 (Donahue y col., 1993). La secuencia del ADNc de la HIOMT humana (NM 004043) se obtuvo del Gen Bank y consta de 1370 pb y corresponde a la isoforma (+6+7).

2.2.-Se diseñaron dos parejas de cebadores específicos para la amplificación de la HIOMT con una *nested* PCR (tabla 4). Se investigaron las enzimas a utilizar para poder clonar la secuencia de la HIOMT en el vector de elección, estas enzimas debían cortar el vector pero no la secuencia de la HIOMT, seleccionándose EcoR I y Kpn I.

A los cebadores elegidos se les añadieron las secuencias de restricción de EcoR I y Kpn I a los extremos (Figura 28).

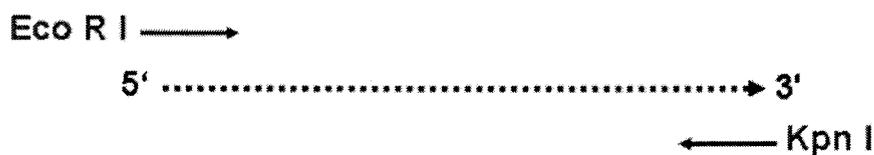


Figura 28. Esta figura muestra el diseño de cebadores específicos para la amplificación de la HIOMT. Las secuencias de restricción añadidas a los cebadores se indican con las siglas de las enzimas de restricción en rojo. Las flechas continuas (→) indican la secuencia de los cebadores específicos.

2.3.- Amplificación de la HIOMT mediante PCR

El ADNc utilizado para la amplificación de la HIOMT fue obtenido a partir del ADN genómico de *the Human Leukemia lymphoblastic Marathon-Ready cDNA* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Para llevar a cabo la amplificación por PCR utilizamos el kit *Advantage® 2 PCR Enzyme System* (Clontech, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores descritos en el apartado 2.

Fundamento: Este kit trabaja con dos polimerasas simultáneamente, la *TITANIUM® Taq DNA polymerase* y una pequeña cantidad de polimerasa reparadora, además contiene un anticuerpo monoclonal (*TaqStart Antibody*) en la mezcla de las polimerasas. *TaqStart* es un anticuerpo monoclonal neutralizante que reconoce a *TITANIUM Taq*. El anticuerpo inhibe la actividad enzimática de la polimerasa a temperatura ambiente, la actividad de polimerasa es restaurada cuando comienzan los ciclos de temperaturas durante las reacciones de PCR ya que el anticuerpo es desnaturizado a altas temperaturas.

Método: Las reacciones para la nested PCR se hacen en un volumen final de 50µl y contienen: 10X BD Advantage buffer, 50X de dNTPs, 50X BD Advantage Poly Mix, 10 µM de cebadores y 5µl de ADNc. En las PCRs internas se utiliza 1 µl del producto de la 1ª PCR. Como control positivo utilizamos a la enzima GDPH la cuál tiene un fragmento de amplificación de 1.09 kb y como control negativo se sustituye el ADNc por agua.

Nested PCR	cebadores	Secuencia
1ª PCR	H1L	5-CGACGGTACCGTTCCAGGTCACAAGAAACAGTTAT-3'
	H1R	5-CGTCGAATTCTCCCTGAAGCTGCTGAAAGT-3'
2ª PCR	H11L	5'-CGACGGTACCGGCATCATAAATGGCTCCTG-3'
	N11R	5'-CGTCGAATTCAAAGCTTTCTATCGAAACACAGAG-3'

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de la HIOMT humana. Las letras en rojo indican las secuencias de bases específicas para las enzimas de restricción Kpn1 y EcoR1.

El producto de amplificación de la HIOMT que se obtiene para la 2ª PCR, utilizando los cebadores H11L y H11R (tabla 2) es de aproximadamente 900 pb.

2.3.1.- *Touchdown* PCR

Para mejorar la especificidad de las reacciones de PCR se usa una temperatura de annealing/extención 3 °C más alta que la T_m de los primers utilizados, durante los primeros ciclos de la PCR (5 ciclos), después se va reduciendo progresivamente la temperatura en los demás ciclos.

Los ciclos de temperaturas para la 1ª y 2ª PCR para la HIOMT son los siguientes: 5 ciclos (94°C 30 s, 94°C 10 s, 74°C 30 s, 68°C 2 min); 10 ciclos (94°C 10 s, 72°C 30 s, 68°C 2 min); 15 ciclos (94°C 10 s, 70°C 30 s, 68°C 2 min) seguido de una extensión final de 10 min a 68°C.

El producto de la 2ª PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Con el fin de identificar el fragmento amplificado se utiliza el marcador de peso molecular de ADN XVII (Roche)

2.4.- Extracción del DNA a partir del gel

La extracción de la banda obtenida del gel de agarosa correspondiente a la HIOMT se realiza con un kit comercial: *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Chatsworth, CA), el cuál esta diseñado para la extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Fundamento: La banda inmersa en el gel se pone en contacto con un buffer que solubiliza la agarosa y proporciona el ambiente químico favorable para que el ADN se adsorba a una membrana de silica, las impurezas son lavadas y eliminadas. El ADN puro es eluído con Tris buffer (10 mM, pH 8,5).

Método: Todo el producto de la amplificación de la HIOMT se extrae y se purifica. La banda correspondiente de aproximadamente 900 pb, se corta del gel y se pesa en un microtubo. Se le añade 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel (100 mg =100 μ l). Se incuba a 50°C durante 10 min hasta que el gel quede completamente disuelto. Se añade 1 volumen de isopropanol, se mezcla y se vacía a una columna. Después de varias centrifugaciones y lavados, el ADN es eluído de la columna con 50 μ l de Tris buffer (10 mM, pH8,5). Una alícuota del eluído (10 μ l), se corre en gel de agarosa (1,2%) para confirmar que la extracción ha sido efectiva. A continuación se calcula la cantidad de ADN obtenida comparando la intensidad de las bandas correspondientes a la HIOMT con la del marcador de peso molecular.

2.5.- Clonación de la HIOMT en el vector pGEM-T

La clonación de la secuencia amplificada de la HIOMT, se realiza utilizando el vector pGEM-T (Promega), sistema adecuado para clonar productos de PCR.

Fundamento: Este vector está compuesto por 3 kb, se le han adicionado timinas en los extremos 3' en el sitio de clonación y esto es compatible con los productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables, las cuales adicionan deoxiadenosinas en los extremos 3'. El vector contiene en la zona de clonación el gen que codifica al péptido α de la β -galactosidasa, por lo que la inactivación insercional del péptido α permite la identificación de los clones recombinados. También contiene múltiples sitios de restricción, lo que permite la liberación del inserto tras la digestión con enzimas de restricción (Figura 29).

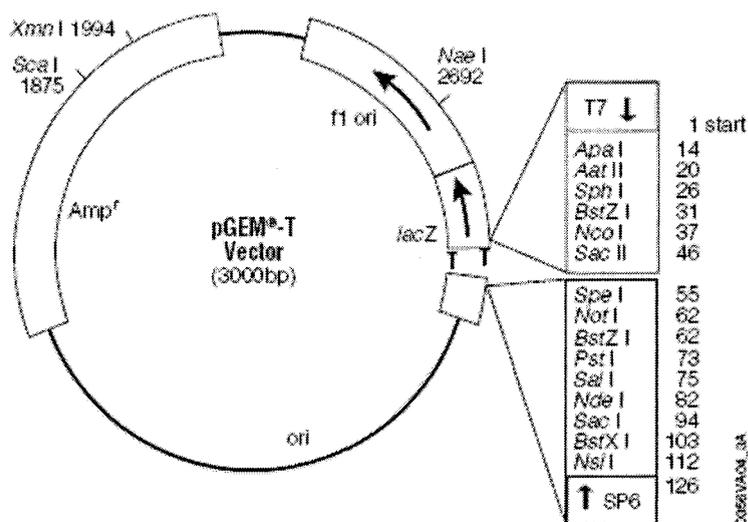


Figura 29. Mapa circular del vector pGEM-T, muestra los múltiples sitios de restricción.

Método: Para la ligación de la secuencia amplificada (inserto) y el vector, llevamos a cabo el protocolo del vector pGEM-T. La cantidad del inserto a utilizar se calcula mediante la fórmula:

$$\frac{\text{ng. vector} \cdot \text{kb tamaño del inserto}}{\text{kb tamaño del vector}}$$

La relación inserto: vector recomendada por el kit de clonaje es de 5:1.

En un tubo de 200 μl se añade lo siguiente: 1 μl de 10X Rapid Ligation Buffer, 1 μl de Vector MBL-T (50 ng), 7 μl (75 ng) del producto PCR, 1 μl de DNA Ligasa. Se mezcla y se incuba entre 20° y 22° durante una hora. Para una mayor eficiencia de clonación se incuba a 4°C toda la noche. El vector clonado se almacena a -20°C.

2.6.- Transformación de células competentes con pGEMT-HIOMT

Las células JM109 *competent cells, high efficiency* (Promega) fueron utilizadas para llevar a cabo la transformación con pGEMT-HIOMT. Seguimos el protocolo de transformación de células competentes E. coli JM 109.

Fundamento: La transformación es una etapa esencial en muchos experimentos de clonación. Las células *E. coli* y plásmidos de DNA interactúan productivamente en un ambiente de iones de calcio y bajas temperaturas (0-5°C). Al someterse a un choque térmico (37-45°C), se estimula la internalización del DNA, después las células son transferidas a un medio nutritivo e incubadas a 37°C en agitación. Estas células expresarán las características fenotípicas conferidas por el plásmido (resistencia a antibióticos, etc.).

Método: Se colocaron 2 tubos pequeños de propileno estériles en hielo, uno para la transformación con pGEMT-HIOMT y otro para el plásmido control. Se descongela en hielo un vial de 200µl de células competentes y se añade de 1-50 ng de DNA (2 ul del clonaje anterior y 1 ul del control) por cada 100 ul de células competentes. Se someten a un choque térmico de 45-50 segundos a 42°C y 2 min en hielo. Se pasa el contenido a un tubo Falcon y se añaden 900 ul de medio SOC (Promega) frío. Se incuba 1h y media a 37°C en agitación y se siembran las placas de cultivo.

Se preparan placas de cultivo con medio LB con ampicilina (100µg/ml.). Dichas placas se dejan incubar 30 min. a 37°C con IPTG (0,1 M) y X-Gal (50 mg/ml) antes de cada uso. Se siembran 50, 150 y 250 µl de células transformadas en cada placa, se extienden con una asa de vidrio y se incuban toda la noche a 37°C. Se hace el recuento de colonias al día siguiente.

Se inoculan las colonias blancas (que han incorporado el plásmido) en 8 ml de medio TB (Sigma-Aldrich) con ampicilina (100µg/ml.) y se dejan incubar toda la noche a 37°C en agitación. Se guarda un stock de 2 ml de cada colonia de células transformadas y se almacenan a 4°C. El resto se somete a una purificación.

2.7.- Purificación del plásmido pGEMT-HIOMT

Para obtener el ADN plasmídico de los clones seleccionados, utilizamos el kit comercial: QIAprep® Miniprep (Qiagen), el cuál esta diseñado para la purificación de ADN plasmídico a partir de células transformadas.

Fundamento: Para llevar a cabo la purificación de los plásmidos, las bacterias se sometieron a una lisis alcalina, seguida de la adsorción de ADN a membranas de sílica-gel en presencia de altas concentraciones de sal y después de varios lavados el ADN plasmídico se eluye.

Método: Se parte de 6 ml del cultivo de bacterias transformadas que son centrifugadas 10 min a 4000 rpm. El precipitado se resuspende en 250µl de buffer con ARNasas y se pasa a un tubo de microcentrifuga. Se le añade 250µl de buffer de lisis, se agita y después se adiciona 350µl de buffer de precipitación y se agita. Se centrifuga 10 min a 12000 rpm y el sobrenadante se pasa por una columna de unión a ácidos nucleicos y después de varios lavados, el ADN es eluido de la columna con 50 µl de buffer EB. Una alícuota del eluido (10 µl), se corre en gel de agarosa (1,2%) para confirmar que la purificación ha sido efectiva. A continuación se calcula la cantidad de ADN obtenido, midiendo su absorción de luz ultravioleta a 260 nm en un espectrofotómetro.

2.8.- Secuenciación

Los plásmidos purificados a partir de las colonias positivas (pGEMT-HIOMT), fueron secuenciados para confirmar que no tienen mutaciones (Neocodex, Sevilla, España). Se elige el clon más adecuado con el que se realizará la clonación definitiva en el vector de expresión.

2.9.- Liberación de la secuencia insertada (HIOMT) tras la digestión con enzimas de restricción.

Se procede a la liberación de la secuencia insertada (HIOMT) del vector pGEMT. La reacción de digestión se realiza primero con la enzima KpnI. En un microtubo de 200 µl, se añaden los siguientes reactivos: 12.3 µl de H₂O, 2 µl de buffer KpnI (10X), 3µl de ADN, 2 µl de BSA (100X), 0.7 µl de KpnI (10U/µl). Se incuba a 37°C durante 1.5 horas. Tras la incubación el microtubo se pone en hielo para detener la reacción y enseguida se procede a realizar la digestión con la enzima EcoRI añadiendo los siguientes reactivos: 2.2 µl de buffer EcoRI (10X) y 0.7 µl de EcoRI (20U/µl). Se incuba a 37°C durante 1.5 horas.

Se corre la muestra digerida en un gel de agarosa al 1.2 % junto con muestras no digeridas como control y visualizadas por tinción con bromuro de etidio. Con el fin de identificar los fragmentos se utiliza el marcador de peso molecular de ADN XVII (Roche). En la muestra digerida obtuvimos la banda esperada de 900 pb correspondiente a la HIOMT y la banda de 3000 pb correspondientes al vector. La banda de 900 pb se extrae del gel, posteriormente se purifica y cuantifica.

2.10.- Clonación de la HIOMT en el vector de expresión del sistema TREx

Para realizar la clonación de la HIOMT de manera invertida en el sistema TREx, se linealiza el nuevo vector de expresión DNA4/TO/myc-His A, con las mismas enzimas utilizadas para liberar el inserto, KpnI y EcoRI. Se corre la muestra digerida en un gel de agarosa al 1.2 % y visualizadas por tinción con bromuro de etidio. Con el fin de identificar el fragmento se utiliza el marcador de peso molecular de ADN XVII (Roche). Se obtiene una banda de 5000 pb que se extrae del gel, posteriormente se purifica y cuantifica.

2.10.1.- Ligación:

La relación inserto: vector para el clonaje es de 4:1.

En un microtubo de 200 µl se añade lo siguiente: 4 µl de 5X Buffer, 5 µl de vector de expresión (513 ng), 5 µl del inserto (390 ng), 0.5 µl de T4 DNA Ligasa, 0.4 µl de ATP (100 Mm), 0.4 µl de BSA (50 mg/ml), 0.8 µl de DTT (100 mM), 3.9 µl de agua. Se incuba a 16°C durante 24 horas. El vector clonado se almacena a -20°C.

Se realiza la clonación de la secuencia de la HIOMT de manera invertida en el vector de expresión DNA4/TO/myc-His A. Esto es posible por la presencia de las secuencias de restricción en los extremos de la HIOMT que permiten ligar el inserto con el vector de forma invertida (fig. 30).

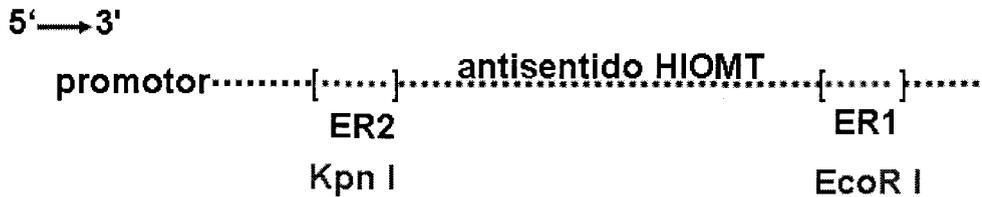
vector de expresión (pcDNA/TO/myc-His A):

Figura 30. Clonación de la HIOMT en el vector de expresión de manera antisentido. Los puntos rojos indican las secuencias de corte de las enzimas de restricción, señaladas en rojo también.

2.11.- Transformación:

Las células competentes *E. coli* JM109 son utilizadas para llevar a cabo la transformación con TREx-HIOMT (el protocolo es similar al utilizado en el apartado 6). Para la selección de los clones de bacterias portadoras del plásmido recombinante, se preparan placas de cultivo con medio LB con zeocina (25 µg/ml.). Se siembran 50, 150 y 250 µl de células transformadas en cada placa, se extienden con una asa de vidrio y se incuban toda la noche a 37°C. Se hace el recuento de colonias el día siguiente.

Se inoculan las colonias que crecieron en las placas con zeocina (que han incorporado el plásmido) en 8 ml de medio TB zeocina (25 µg/ml.) y se dejan incubar a 37°C en agitación durante toda la noche. Se guarda un stock de 2 ml de cada colonia de células transformadas y se almacenan a 4°C. El resto se somete a una purificación por miniprep.

2.12.- Comprobación de la presencia del inserto en el vector tras la digestión con enzimas de restricción.

Se someten a digestión todos los clones de TREx-HIOMT, siguiendo el protocolo del apartado 9. Se corren 3 µl de las muestras digeridas en un gel de agarosa al 1.2 % junto con algunas muestras no digeridas como control y visualizadas por tinción con bromuro de etidio. Con el fin de identificar los fragmentos se utiliza el marcador de peso molecular de ADN XVII. En las muestras digeridas obtuvimos las bandas esperadas una de 900 pb

correspondiente a la HIOMT y otra de 5000 pb correspondientes al vector. En las muestras no digeridas solo se obtuvo una banda de muy alto peso molecular por encima de 5000 pb.

2.13.- Secuenciación del vector TREx-HIOMT de la secuencia antisentido clonada.

Los plásmidos purificados a partir de colonias positivas (TREx-HIOMT), se secuenciaron para confirmar que no tienen mutaciones (Neocodex, Sevilla, España). Se escoge el clon adecuado para llevar a cabo la transfección en células Jurkat-Tet.

2.14.- Maxiprep de TREx-HIOMT

Para obtener suficiente cantidad del plásmido recombinante TREx-HIOMT para la transfección se realizó una maxiprep del clon seleccionado. Se utiliza el kit comercial: *Plasmid Purification kit* (Qiagen), el cuál está diseñado para el aislamiento de ADN superhelicoidal, para ser utilizado en diferentes aplicaciones como son la transfección.

Fundamento: Para llevar a cabo la purificación de los plásmidos, las bacterias se someten a una lisis alcalina, seguida de la adsorción de ADN a resinas de intercambio aniónico en presencia de bajas concentraciones de sal. ARN, proteínas, colorantes e impurezas de bajo peso molecular son removidas por medio de lavados. El DNA plasmídico es eluido con un buffer con alta concentración de sales y enseguida precipitado con isopropanol, después lavado con etanol al 70 % y por último resuspendido en buffer TE.

Método: El primer paso fue crecer un vial del clon seleccionado en 8 ml de medio TB con zeocina (25 µg/ml.) a 37 °C en agitación durante toda la noche. Al siguiente día 2 ml del cultivo se inoculan en un matraz de 1 L con 500 ml de medio LB con zeocina (25 µg/ml.) se incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche. Después se recolectan las bacterias y al precipitado celular se le añade 10 ml de buffer con ARNasas. Se le adiciona 10 ml de buffer de lisis (máximo 5 min) y 10 ml de buffer de precipitación. Se centrifuga a 13 000 rpm (Sorvall SS-34) durante 30 min a 4 °C, se repite la centrifugación durante 15 min. El sobrenadante se pasa sobre la resina, se realiza un lavado y el ADN es eluido de la columna con 15 ml de buffer QF. Al eluido se le añade 10.5 ml de isopropanol y se

centrifuga a 11 000 rpm durante 30 min a 4 °C. Al pellet se le añade 5 ml de etanol al 70 % y se centrifuga a 11000 rpm durante 10 min, se deja evaporar el etanol durante 10 minutos y el ADN se resuspende en 100 µl de buffer TE. Una alícuota del eluido (10 µl), se corre en gel de agarosa (1,2%) para confirmar que la miniprep ha sido efectiva. A continuación se calcula la cantidad de ADN obtenida, midiendo su absorción de luz ultravioleta a 260 nm en un espectrofotómetro.

2.15.- Transfección de las células JurkatTet

Para realizar la transfección se utilizó *DMRIE-C Reagent* (Invitrogen), el cual es específico para células eucariotas y es particularmente efectivo para la transfección de células en suspensión (Jurkat). Este reactivo está compuesto por liposomas formados con lípidos catiónicos (DMRIE) y colesterol.

Fundamento: Las mezclas de lípidos catiónicos/neutros forman espontáneamente complejos estables con ADN que interactúan eficientemente con la membrana celular, resultando en la internalización del ADN por endocitosis (Felgner y col., 1987; 1994). Este método conocido como lipofección tiene la ventaja de ser poco tóxico para las células y se puede aplicar para muchos tipos celulares que son difíciles de transfectar por otros medios, incluidas las células que crecen en suspensión. (Ruyschaert y col., 1994).

Método: La transfección se lleva a cabo en una placa de 6 pocillos, las muestras se trabajan por duplicado, se incluye un control positivo y un blanco. En cada pocillo se añaden 500 µl del medio libre de suero Opti-MEM® (Invitrogen) y 10 µl del reactivo DMRIE-C. En un microtubo se diluyen 4 µg de ADN (TREx-HIOMT o el ADN control) y 500 µl del medio Opti-MEM. El ADN diluido se adiciona a todos los pocillos que contiene el DMRIE-C, excepto a los blancos y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. En un microtubo se resuspenden 2 -3 X10⁶ células JurkatTet en 200 µl de Opti-MEM®, esta suspensión se añade a todos los pocillos y se incuba la placa a 37 °C durante 4 horas en un incubador con CO₂. Finalmente en un microtubo se mezclan 2 ml de medio RPMI con 15% de FBS y 4.8 µl de PMA (1 µg/ml) y 1.6 µl de PHA (50 ng/ml) y esta mezcla se añade a todos los pocillos. Se incuba la placa a 37 °C durante 48 horas en un incubador con CO₂.

Los cultivos en placa se pasan a *flasks* T-25 conteniendo medio RPMI con 10 % de FBS y el antibiótico de selección zeocina a la concentración determinada de 100 µg/ml. Se esperan aproximadamente 10 días para tener la selección de células transfectadas. Estas células son mantenidas siempre en cultivo con los antibióticos zeocina y blasticidina.

Para determinar la mínima concentración de zeocina requerida para matar a las células no transfectadas se realiza una curva de sensibilidad a la zeocina. Se utiliza el siguiente rango de concentraciones (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/ml). En 8 *flasks* T-25 se siembran 1.5×10^6 células Jurkat Tet por ml en 10 ml de medio RPMI con 10 % de FBS con blasticidina. Se incuban a 37 °C durante 24 horas, a cada *flask* se le añade las diferentes concentraciones de zeocina. Durante 10 días se lleva a cabo la cuantificación de células vivas, utilizando tripan azul para distinguirlas.

2.16.- Inducción de la expresión del ARN antisentido.

Para llevar a cabo la inducción del ARN antisentido frente a la HIOMT, las células Jurkat Tet transfectadas son incubadas con tetraciclina, que es el agente inductor de la transcripción del gen de interés (antisentido HIOMT) en el vector de expresión (Fig. 4).

Método: La inducción se realiza en frascos de cultivo T-25, 10×10^6 de células Jurkat Tet transfectadas con el antisentido HIOMT son suspendidas en 10 ml de medio RPMI con 10 % de FBS con zeocina (100 µg/ml) y más el agente inductor tetraciclina (1 µg/ml). Como control se utilizan las mismas células pero sin añadirles tetraciclina. Las células se incuban durante 24 horas en un incubador con CO₂. Se centrifugan las células a 1800 rpm durante 5 min. Se hacen alícuotas del sobrenadante y se guardan a -20 °C para su posterior análisis. El precipitado de células es resuspendido en 1 ml de PBS y la suspensión se pasa a un microtubo para centrifugarse a 1800 rpm durante 10 min, se desecha el sobrenadante y el botón de células se congela para su posterior análisis.

3.- Análisis estadístico

Los resultados han sido expresados como la media aritmética \pm el error estándar de la media (S.E.M.) y la significación estadística de las diferencias entre los grupos de individuos de una misma población ha sido evaluada utilizando el análisis de varianza (ANOVA), seguido del *t test*. La existencia de diferencias significativas se consideró para $p < 0.001$ y $p < 0.05$, es decir, cuando existe menos de un 1% y un 5% respectivamente de probabilidad de que dichas diferencias se deban al azar. El análisis estadístico ha sido realizado utilizando el programa informático *Graph Pad Prim*® 2.01. Todos los experimentos realizados se repitieron un número “n” de veces igual o superior a tres.

RESULTADOS

1.- EXPRESIÓN DEL GEN AANAT EN DIFERENTES TEJIDOS DEL SISTEMA INMUNE EN TRES CEPAS DE RATÓN.

Para estudiar la expresión génica de la enzima Arilalkil-N-acetiltransferasa AANAT en diversos tejidos y células del sistema inmune (timo, bazo y médula ósea), de los ratones C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd, se realizó una nested PCR. Se realizó una PCR incluyendo los exones 3 y 4 y otra incluyendo los exones 1 y 2, ya que se han descrito isoformas alternativas de la AANAT debido a un splicing alternativo entre estos pares de exones. La glándula pineal fue utilizada como control.

1.1.- Expresión de la enzima AANAT en glándula pineal

1.1.1.- Estudio de los exones 3 y 4 y de los exones 1 y 2

La amplificación de los exones 3 y 4 demostró la presencia de dos bandas, una de 137 pb correspondiente a la banda silvestre y otra banda de 239 pb (Figura 1). Esta última banda corresponde a una isoforma mutante con una inserción de 102 pb, ya descrita en glándula pineal de ratones C57BL/6 por Roseboom. (Roseboom y col., 1998). En la cepa C3H/HeNHsd la intensidad de las dos bandas correspondientes a las dos isoformas es similar. Respecto a los ratones Swiss la presencia de ambas bandas fueron de muy baja intensidad. Estos resultados corroboran la presencia de esta isoforma mutante en la cepa C57BL/6, con una expresión más intensa que la silvestre, tal como lo describió Roseboom y col. (1998).

La amplificación de los exones 1 y 2 demostró la presencia de una banda de 105 pb, correspondiente a una forma silvestre en las tres cepas de ratón y de manera más sobresaliente en los ratones Swiss (Figura 31). Se utilizó como control de la expresión, la amplificación del gen de la β -actina.

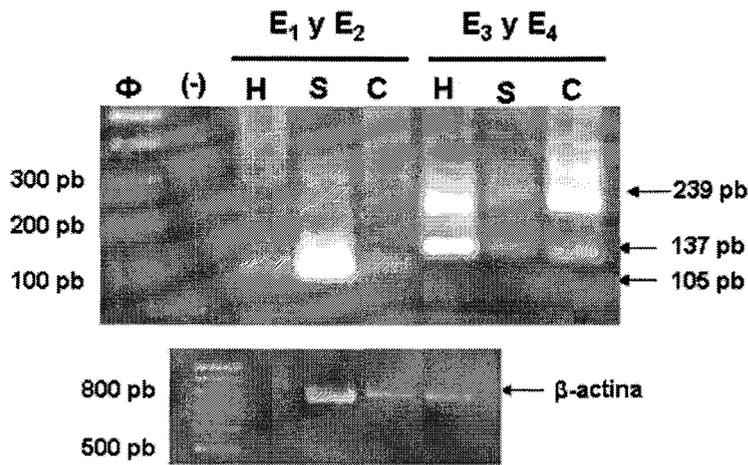


Figura 31. Análisis por nested PCR de los exones 1 y 2, y de los exones 3 y 4 del gen AANAT en glándula pineal de ratones C57BL/6 (C), Swiss (S) y C3H/HeNHsd (H). En el análisis se incluyó un control negativo que no contenía ADNc (-) y un marcador de peso molecular (Φ). El gen de la β-actina fue amplificado como gen de referencia.

1.2.- Expresión del enzima AANAT en timo, bazo y médula ósea.

1.2.1.- Estudio de los exones 3 y 4

En la cepa de ratón C57BL/6, el patrón de amplificación obtenido para los exones 3 y 4 reveló la presencia de la banda silvestre de 137 pb además de otra de 239 pb (con la inserción) en bazo y médula ósea. No se detectó ninguna isoforma en timo. En la cepa de ratón Swiss se observó la presencia de la banda silvestre de 137 pb además otra banda de 239 pb (con la inserción) en timo y médula ósea. No se detectó ninguna isoforma en bazo. En la cepa de ratón C3H/HeNHsd se observó la presencia de la banda silvestre de 137 pb además otra banda de 239 pb (con la inserción) en timo y médula ósea. No se detectó ninguna isoforma en bazo (Figura 32).

Estos resultados concuerdan con el patrón de expresión obtenido en pineal, donde encontramos en las tres cepas de ratón tanto la expresión de la isoforma silvestre como la resultante del *splicing* alternativo que incluye la inserción de 102 pb.

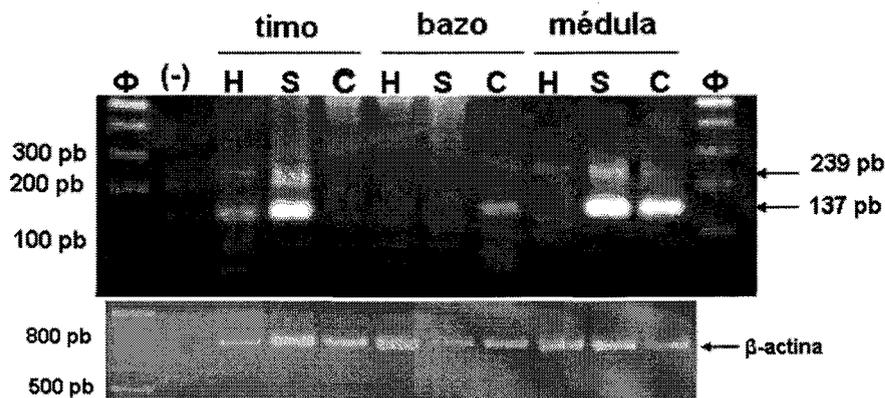


Figura 32. Análisis por nested-PCR de los exones 3 y 4 del gen AANAT en timo, bazo y médula ósea de ratones C57BL/6 (C), Swiss (S) y C3H/HeNHsd (H). En el análisis se incluyó un control negativo que no contenía ADNc (-) y un marcador de peso molecular (Φ). El gen de la β -actina fue amplificado como gen de referencia.

1.2.2.- Estudio de los exones 1 y 2

En las tres cepas de ratón, el patrón de amplificación obtenido para los exones 1-2, reveló tan solo la presencia de la banda silvestre de 105 pb en timo bazo y médula ósea (Figura 33). Se muestra la pineal (P) de ratones Swiss como control positivo. Al igual que como ocurre en pineal, los resultados muestran que en los tejidos del sistema inmune analizados no encontramos *splicing* alternativo que incluya la inserción descrita entre estos dos exones.

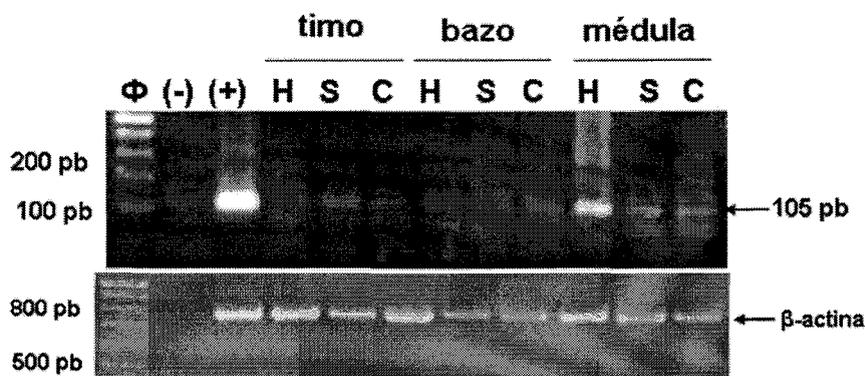


Figura 33. Análisis por nested-PCR de los exones 1 y 2 del gen AANAT en timo, bazo y médula ósea de ratones C57BL/6(C), Swiss (S) y C3H/HeNHsd (H). En el análisis se incluyó a la glándula pineal como control positivo (+), así como un control negativo que no contenía ADNc (-). Se utilizó un marcador de peso molecular (Φ) y el gen de la β -actina fue amplificado como gen de referencia.

2.- SÍNTESIS DE MELATONINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) EN TRES CEPAS DE RATÓN ESTIMULADAS CON PHA.

Para demostrar la síntesis de melatonina en PBMC de los ratones C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd, se analizó la expresión génica de una de las enzimas implicadas en su ruta biosintética, la AANAT enzima reguladora de la ruta biosintética. También se midió la actividad de las dos enzimas claves en la síntesis de melatonina, la AANAT y la Hidroxi-O-metiltransferasa (HIOMT). Finalmente se midió el contenido de melatonina en el sobrenadante de los cultivos de PBMC, glándulas pineales y plasmas, mediante ELISA. Estos parámetros se estudiaron tanto en PBMC en reposo como estimuladas con PHA durante 48 horas en las tres cepas de ratón.

2.1.- Expresión del gen del enzima AANAT

Para estudiar la expresión de la enzima AANAT en PBMC de las tres cepas diferentes de ratón, se realizó una nested PCR. Se realizó una PCR incluyendo los exones 3 y 4 y los exones 1 y 2.

2.1.1.- Estudio de los exones 3 y 4

El patrón de amplificación obtenido para los exones 3 y 4 reveló la presencia de la banda silvestre de 137 pb además de otra banda de intensidad más débil de 239 pb (con la inserción) en las células sin estimular de las tres cepas de ratón (Figura 34). Al estimular las células de las cepas Swiss y C57BL/6 con PHA se incrementó la expresión de la AANAT en estas dos cepas de ratón. La banda obtenida en la cepa C3H/HeNHsd fue más intensa que en las deficientes en melatonina C57BL/6 y Swiss.

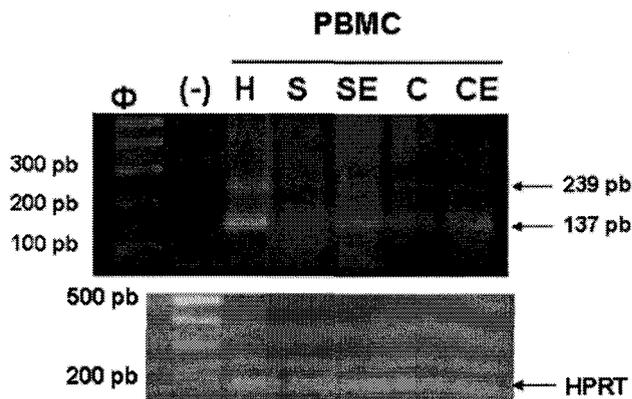


Figura 34. Análisis por nested-PCR de los exones 3 y 4 del gen AANAT en PBMC en reposo y estimuladas (E) de ratones C57BL/6 (C), Swiss (S) y C3H/HeNHsd (H). En el análisis se incluyó un control negativo que no contenía ADNc (-) y un marcador de peso molecular (Φ). El gen de la HPRT fue amplificado como gen de referencia.

2.1.2.- Estudio de los exones 1 y 2

El patrón de amplificación obtenido para los exones 1-2 reveló la presencia de la banda silvestre de 105 pb en células en reposo de la cepa Swiss pero no en C57BL/6. Al estimular las células de las cepas deficientes en melatonina se obtuvo una banda más intensa en los ratones Swiss y se visualizó una banda de 105 pb en la cepa C57BL/6. La banda obtenida en la cepa C3H/HeNHsd fue más intensa que en C57BL/6 y Swiss (Figura 35). Estos resultados apoyan lo previamente observado en la amplificación de los exones 3-4, donde observamos como tras la estimulación con PHA los niveles de expresión del enzima aumenta respecto al control sin estimular.

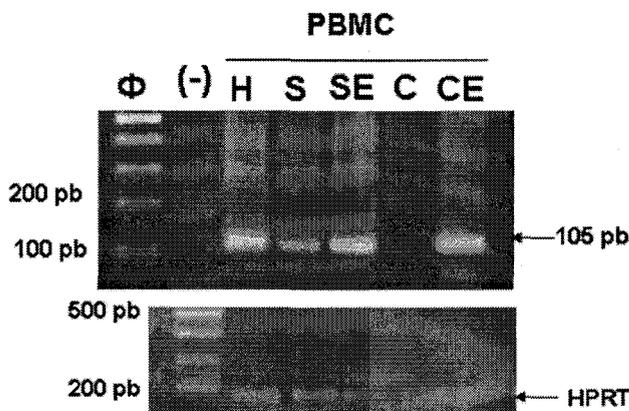


Figura 35. Análisis por nested-PCR de los exones 1 y 2 del gen AANAT en PBMC en reposo y estimuladas (E) de ratones C57BL/6 (C), Swiss (S) y C3H/HeNHsd (H). En el análisis se incluyó un control negativo que no contenía ADNc (-) y un marcador de peso molecular (Φ). El gen de la HPRT fue amplificado como gen de referencia.

2.2.- Actividad Enzimática

2.2.1.- Medida de la actividad N-Acetiltransferasa (NAT)

Se utilizaron PBMC en reposo y estimuladas con PHA durante 48 horas de las tres cepas de ratón: C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd. Las células de las tres cepas de ratón en condiciones basales mostraron actividad enzimática AANAT (Figura 36). Las cepas C57BL/6 y Swiss mostraron una actividad muy alta con respecto a la cepa C3H/HeNHsd ($p < 0.001$, Test one-way ANOVA). Las PBMC estimuladas con PHA, presentaron un aumento de la actividad AANAT con respecto a las células no estimuladas, en las tres cepas de ratón. En las cepas C57BL/6 y Swiss se encontraron diferencias significativas ($p = 0.0203$ y $p = 0.0374$, respectivamente, Unpaired *T* test). En la cepa C3H/HeNHsd esta diferencia fue aún mayor $p = 0.0002$.

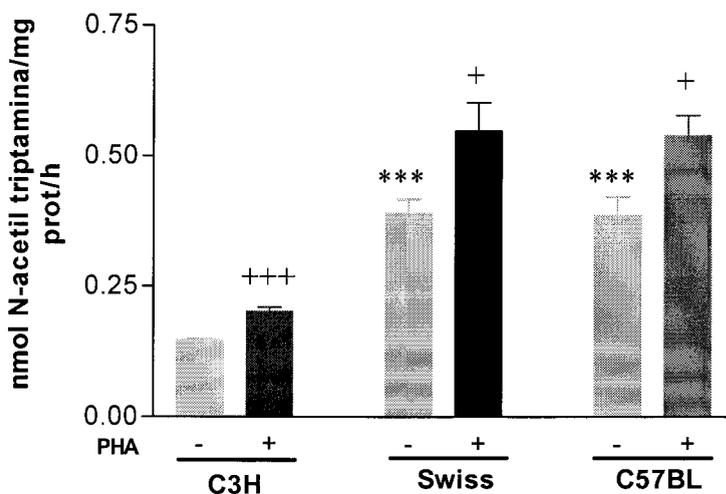


Figura 36. Niveles de actividad AANAT en PBMC en reposo y estimulados con PHA de ratones C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd. Se utilizó el test one way ANOVA para analizar las diferencias entre las diferentes cepas de ratón. Para analizar las diferencias entre las células control y estimuladas en una misma cepa se utilizó unpaired T test. Los valores están expresados como la media de seis experimentos.

2.2.2.- Medida de la actividad Hidroxi-O-metiltransferasa (HIOMT)

Al igual que en el ensayo de actividad NAT, se utilizaron PBMC en reposo y estimuladas con PHA durante 48 horas de las tres cepas de ratón: C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd. Las células de las tres cepas de ratón en condiciones basales mostraron actividad enzimática HIOMT (Figura 37). Solo encontramos diferencias significativa entre la cepa

C57BL/6 con respecto a la cepa C3H/HeNHsd ($p < 0.05$. Test one-way ANOVA.). Las PBMC estimuladas con PHA de la cepa C3H/HeNHsd presentan un aumento de la actividad HIOMT con respecto a las células no estimuladas ($p = 0.0098$. Unpaired T test). En las otras dos cepas no encontramos diferencias significativas.

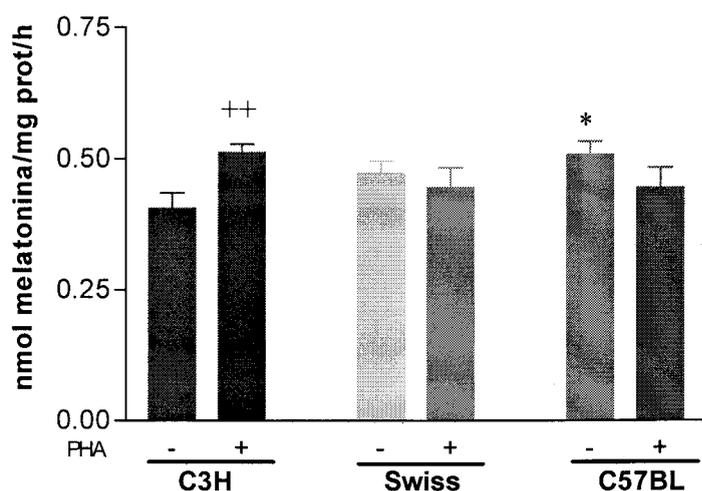


Figura 37. Niveles de actividad HIOMT en PBMC en reposo y estimulados (E) de ratones C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd. Se utilizó el test one way ANOVA para analizar las diferencias entre las diferentes cepas de ratón. Para analizar las diferencias entre las células control y estimuladas en una misma cepa se utilizó unpaired T test. Los valores están expresados como la media de tres experimentos.

2.3.- Producción de melatonina

Se utilizaron sobrenadantes de PBMC en reposo y estimuladas con PHA durante 48 horas de las tres cepas de ratón: C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd. También se midió el contenido de melatonina de glándulas pineales y plasmas de las tres cepas de ratón.

2.3.1.- Producción de melatonina en glándula pineal

Se midió el contenido de melatonina de la glándula pineal de cada cepa de ratón por ELISA (Figura 38). La glándula pineal de las cepas deficientes C57BL/6 y Swiss presentaron concentraciones de melatonina muy bajas, en cambio el contenido de melatonina de la glándula pineal de la cepa control C3H/HeNHsd fue muy alto, en promedio del orden de 96 pg/ml ($p < 0.001$. Test one-way ANOVA)

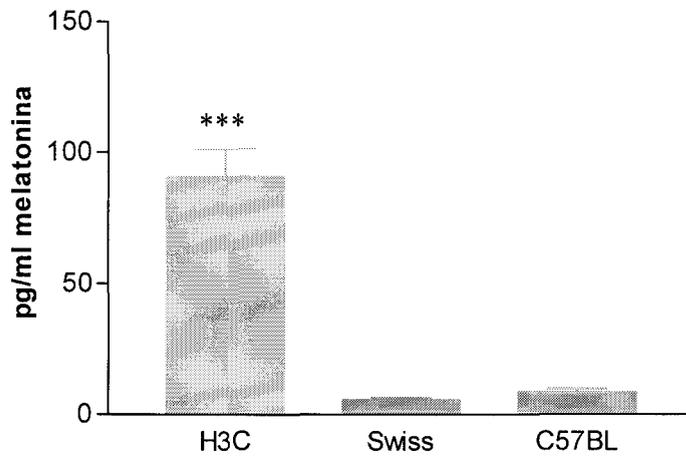


Figura 38. Niveles de melatonina en glándula pineal de ratones C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd. Se utilizó el test one way ANOVA para analizar las diferencias entre las diferentes cepas de ratón. Los valores están expresados como la media de tres experimentos.

2.3.2.- Producción de melatonina en plasma

Se midió el contenido de melatonina del plasma de cada cepa de ratón por ELISA. (Figura 39). El contenido de melatonina de la cepa C3H/HeNHsd fue ligeramente más alto con respecto a las cepas C57BL/6 y Swiss ($p < 0.05$. Test one-way ANOVA).

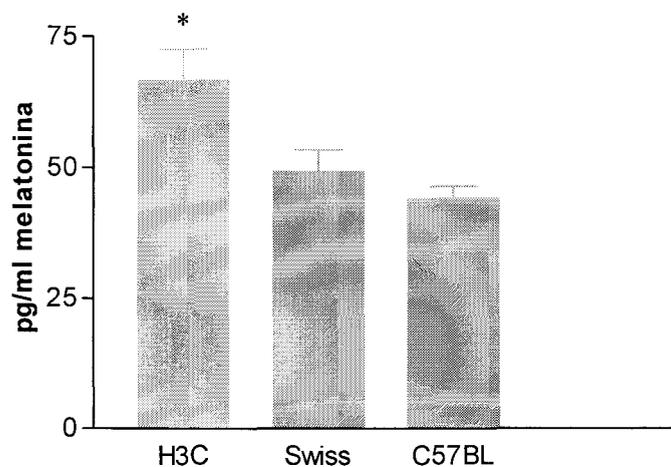


Figura 39. Niveles de melatonina en plasma de ratones C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd. Se utilizó el test one way ANOVA para analizar las diferencias entre las diferentes cepas de ratón. Los valores están expresados como la media de tres experimentos.

2.3.3.- Producción de melatonina en sobrenadantes de PBMC

Se midió el contenido de melatonina del sobrenadante de PBMC en reposo y estimuladas con PHA durante 48 horas de cada cepa de ratón por ELISA (Figura 40). Los sobrenadantes de las PBMC de las tres cepas de ratón presentaron contenido de melatonina tanto en sobrenadantes de células en reposo como estimuladas, sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas entre ellas.

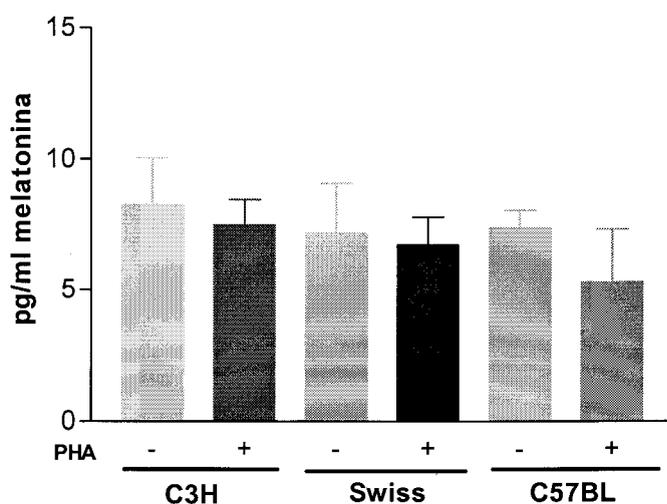


Figura 40. Niveles de melatonina en PBMC en reposo y estimulados (E) de ratones C57BL/6, Swiss y C3H/HeNHsd. Se utilizó el test one way ANOVA para analizar las diferencias entre las diferentes cepas de ratón. Para analizar las diferencias entre las células control y estimuladas en una misma cepa se utilizó unpaired T test. Los valores están expresados como la media de seis experimentos.

3.- DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR KNOCKOUT CONDICIONAL PARA MELATONINA.

Para obtener el modelo celular Knockout condicional para melatonina, primero se diseñó la secuencia antisentido. Se amplificó el gen de la HIOMT con cebadores a los que se les habían añadido secuencias de restricción en los extremos 5' para las enzimas KpnI y EcoRI mediante una nested PCR. Después se llevó a cabo la clonación de esta secuencia en el vector pGEMT. Se realizó una transformación en células competentes y tras una purificación del plásmido pGEMT-HIOMT se liberó la secuencia de la HIOMT. Ésta fue clonada de manera invertida en el vector de expresión del sistema TREx. Finalmente se llevó a cabo la transfección de células JurkatTet con el plásmido TREx-HIOMT.

3.1.- Amplificación de la HIOMT mediante PCR

Se utilizó ADN genómico de the Human Leukemia lymphoblastic (Pag. 80 de material y métodos) para amplificar el gen de la HIOMT mediante una nested PCR. Se obtuvo la secuencia génica de la HIOMT en el Gen Bank para el diseño de los cebadores a los que se les añadió en el extremo 5' secuencias específicas para enzimas de restricción que no cortan la secuencia a amplificar y que están presentes en los vectores a utilizar. Se corrió todo el producto de la PCR en gel de agarosa, dividiéndolo en dos pocillos. Se obtuvo la banda esperada de aproximadamente 900 pb (Figura 41).

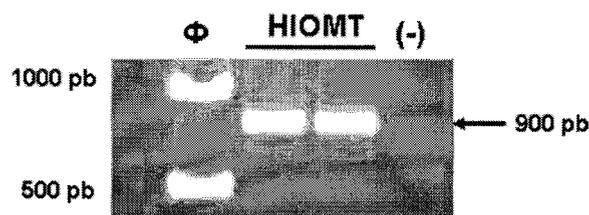


Figura 41. Amplificación de la HIOMT a partir del ADN genómico mediante nested PCR. En el análisis se incluyó un control negativo que no contenía cDNA (-) y un marcador de peso molecular (Φ).

Se purificó del gel las bandas correspondientes a la HIOMT para su posterior clonaje en el vector pGEMT. Tras el proceso de purificación se corrió en gel una alícuota de 10 μ l para confirmar la efectividad de la extracción (Figura 42). Se calculó la cantidad obtenida comparando la intensidad de la banda con la correspondiente al marcador de peso molecular y se estimó que ésta era de 10 ng/ μ l.

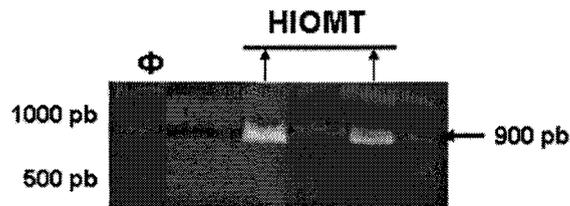


Figura 12. Análisis y cuantificación por electroforesis de las bandas purificadas correspondientes a la HIOMT. En el análisis se incluyó un marcador de peso molecular (Φ).

3.2. Clonación de la HIOMT en el vector pGEMT y transformación.

Se realizó la clonación de la secuencia amplificada de la HIOMT en el vector pGEMT, el cual es un sistema adecuado para clonar productos de PCR. La clonación se llevó a cabo con una relación de inserto: vector 5:1 (75 ng inserto: 50 ng vector).

Se realizó la transformación en bacterias competentes JM109 *competent cells high efficiency* (Pag. 83 de material y métodos) con el producto del clonaje. Las bacterias transformadas se crecieron en placas de cultivo con medio LB con ampicilina como antibiótico de selección, así como los reactivos IPTG y X-Gal para la selección de colonias positivas. Se seleccionaron 5 clones de bacterias portadoras del plásmido recombinado pGEMT-HIOMT. Se crecieron en un medio líquido muy nutritivo (TB) con ampicilina y de los 5 clones, crecieron 4. Se guardó una alícuota de cada clon.

A partir de las 4 colonias de células transformadas que crecieron, se llevó a cabo una purificación del ADN plasmídico. Tras el proceso de purificación se corrió en gel de agarosa una alícuota de 5 μ l de cada clon y 2 μ l del vector pGEMT solo como control, para confirmar la efectividad del proceso (Figura 43). Se observó en cada clon una banda de aproximadamente 3000 pb, excepto en el clon # 2, en el cual la banda está por debajo

de 3000 pb por lo que se decidió descartarlo. Se continuó trabajando con los clones #1, #3 y #4. Se cuantificó la cantidad de ADN obtenido de cada clon y se obtuvo un promedio de 110 ng/μl de cada plásmido recombinado.

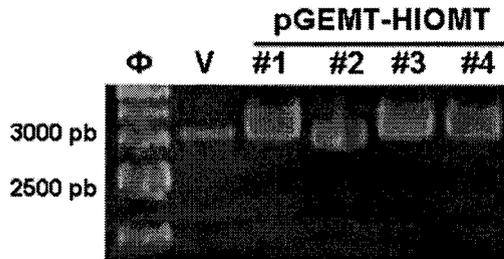


Figura 43. Análisis por electroforesis del ADN plasmídico purificado de 4 colonias de células transformadas con pGEMT-HIOMT. En el análisis se incluyó un control positivo que contenía al vector pGEMT (v) y un marcador de peso molecular (Φ).

3.3. Secuenciación de la HIOMT.

La región correspondiente al inserto en los plásmidos purificados (pGEMT-HIOMT) de los clones #1, #3 y #4, fueron secuenciados. Se analizaron los resultados y se confirmó la ausencia de mutaciones en los 3 clones. Los sitios de restricción para las enzimas KpnI y EcoRI estaban presentes también en todos los clones.

3.4. Liberación de la secuencia insertada (HIOMT) de pGEMT tras la digestión con las enzimas de restricción.

Los clones (#1, #3 y #4) se sometieron a una digestión con las enzimas de restricción KpnI y EcoRI, para la liberación de la secuencia insertada (HIOMT) del vector pGEMT. Se realizó una electroforesis en agarosa de los productos de la digestión, utilizando los clones sin digerir como control (Figura 44). En las muestras digeridas se obtuvo la banda esperada de 900 pb correspondiente a la HIOMT y la banda de 3000 pb correspondientes al vector. En las muestras no digeridas solo se obtuvo una banda de muy alto peso molecular, por encima de 3000 pb.

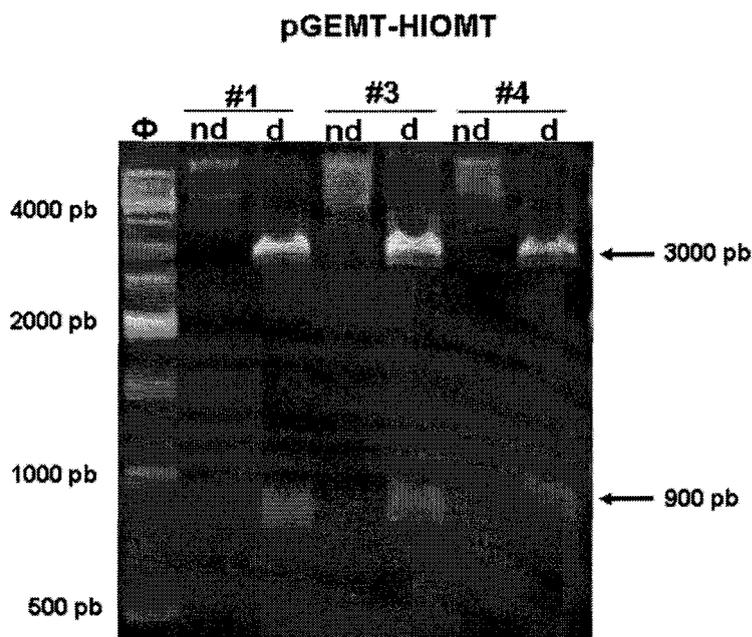


Figura 44. Análisis por electroforesis de la digestión del pGEMT – HIOMT (d) y de los productos no digeridos (nd). Se utilizaron marcadores de tamaño para el ensayo (Φ).

Se purificó del gel la banda correspondiente a la HIOMT de cada clon (Figura 14) para su posterior clonaje en el vector de expresión del sistema TREx. Tras el proceso de purificación se corrió en gel una alícuota de 10 μ l para confirmar la efectividad de la extracción (Figura 45). Se cuantificó por espectrofotometría la cantidad obtenida de cada banda, se obtuvo un promedio de 8 ng/ μ l.

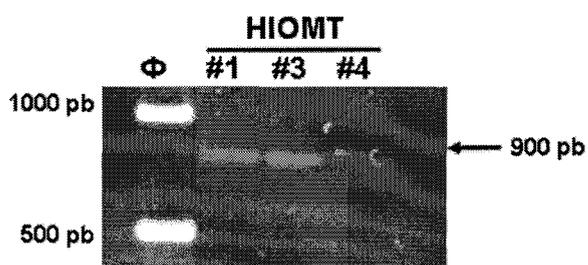


Figura 45. Análisis por electroforesis de las bandas purificadas correspondientes a la HIOMT. En el análisis se incluyó un marcador de peso molecular (Φ).

3.5.- Clonación de la HIOMT en el vector de expresión del sistema TREx

Previo a la clonación se realizó una preparación del vector TREx.

3.5.1 Digestión del vector de expresión

Para realizar la clonación de la HIOMT de manera invertida en el sistema TREx, se linealizó el nuevo vector de expresión DNA4/TO/myc-His A, con las mismas enzimas utilizadas para liberar el inserto Kpn1 y EcoRI. Se realizó una electroforesis en agarosa de todo el producto de la digestión en dos pocillos, utilizando al vector sin digerir como control (Figura 46). Se obtuvo una banda de 5000 pb que se extrajo del gel. Posteriormente se purificó y cuantificó, se obtuvieron 15 ng/μl.



Figura 46. Análisis por electroforesis de la digestión del vector TREx (Vd). Se utilizó como control vector sin digerir (V), así como marcadores de tamaño para el ensayo (Φ).

3.5.2 Ligación

Se realizó la clonación de la secuencia de la HIOMT del clon # 4 de manera invertida en el vector de expresión TREx (DNA4/TO/myc-His A.) linealizado. Esto es posible por la presencia de las secuencias de restricción en los extremos de la HIOMT que permiten ligar el inserto con el vector de forma invertida. La relación inserto: vector para el clonaje fue de 4:1 (390 ng de inserto: 513 ng vector).

3.6.- Transformación

Se realizó la transformación de bacterias competentes JM109 *competent cells high efficiency* (Pag. 83 de material y métodos) con el producto del clonaje. Las bacterias transformadas se crecieron en placas de cultivo con medio LB con zeocina como antibiótico de selección. Se seleccionaron 12 clones de bacterias portadoras del plásmido recombinado TREx-HIOMT. Se crecieron en un medio líquido muy nutritivo (TB) con zeocina durante toda la noche. Se guardó una alícuota de cada clon y el resto se utilizó para la purificación.

A partir de las 12 colonias de células transformadas que crecieron en medio TB. Se llevó a cabo una purificación del ADN plasmídico. Se cuantificó la cantidad de ADN obtenido de cada clon y se obtuvo un promedio de 160 ng/μl.

Los 12 clones recombinantes se sometieron a una digestión con las enzimas de restricción Kpn1 y EcoR1, para comprobar la eficacia del proceso de clonación. Se realizó una electroforesis en agarosa de los productos de la digestión, utilizando un clon sin digerir como control (Figura 47). En los clones digeridos observamos las bandas esperadas, una de 900 pb que corresponde a la HIOMT y otra de 5000 pb correspondiente al vector de expresión TREx (DNA4/TO/myc-His).

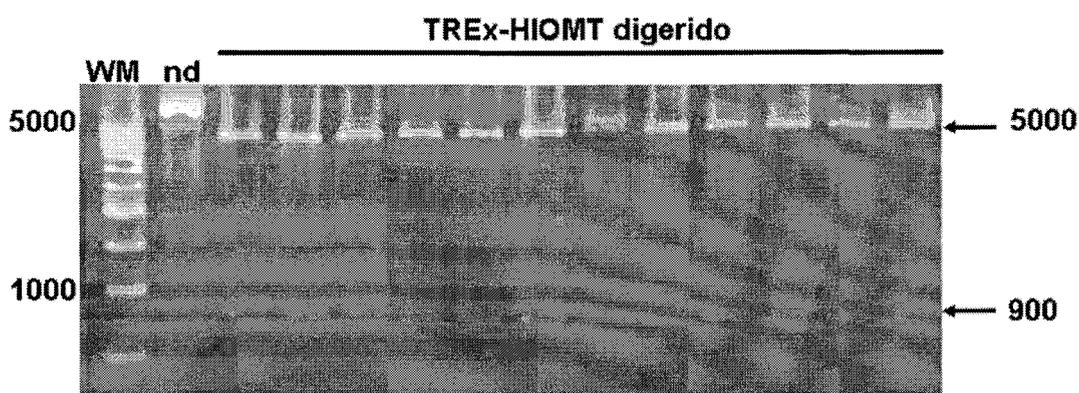


Figura 47. Análisis por electroforesis de la digestión del TREx –HIOMT. Producto no digerido (nd) fue utilizado como control. Se utilizaron marcadores de tamaño para el ensayo (WM).

3.7.- Secuenciación del vector TREx-HIOMT de la secuencia antisentido clonada

De los 12 plásmidos purificados a partir de colonias positivas (TREx-HIOMT) se eligieron 3 para ser secuenciados en base a su mayor concentración. Esto se realizó para confirmar la no existencia de mutaciones. Analizando los resultados se comprobó que todas presentaban la deleción de 84 pb en el exon 6, correspondiente al transcrito de la HIOMT producto 2 (-6+7), consecuencia de un splicing alternativo entre los exones 6 y 7 (Figura 48).

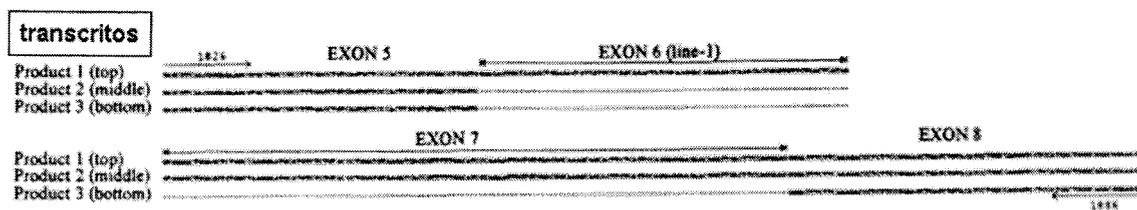


Figura 48. Transcritos alternativos de la HIOMT humana, productos 1, 2 y 3. Los exones son mostrados con líneas gruesas y las porciones perdidas con líneas delgadas. Los límites de los exones 6 y 7 son definidos con flechas.

Se procedió a comprobar que isoforma de la HIOMT expresan las células JurkatTet en las cuales vamos a llevar a cabo la transfección. Realizando una RT-PCR, con primers que flanquearan la posible deleción. Se realizó una electroforesis en agarosa del producto de la PCR (Figura 49). Se obtuvo la banda de 225 pb correspondiente a la isoforma (-6+7), la cuál es la que se expresa mayoritariamente en los tejidos. Se elige trabajar con el clon # 2 para llevar a cabo la transfección en células Jurkat-Tet.

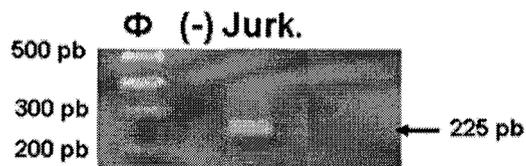


Figura 49. Análisis por RT-PCR de la expresión de la HIOMT en células JurkatTet. En el análisis se incluyó un control negativo que no contenía ADNc (-) y un marcador de peso molecular (Φ).

3.8.- Maxiprep de TREx-HIOMT

Para obtener suficiente cantidad del plásmido recombinante TREx-HIOMT para la transfección en células JurkatTet se realizó una maxiprep del clon # 2. Las células transformadas con TREx-HIOMT se crecieron en medio líquido LB con zeocina en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se llevo a cabo la purificación del plásmido recombinante. Una alícuota del eluido (10 μ l), se corre en gel de agarosa (1,2%) para confirmar que la miniprep ha sido efectiva (Figura 50). Se obtuvo una banda muy gruesa superior a 5000 pb. A continuación se calcula la cantidad de ADN obtenida por espectrofotometría, obteniéndose 1500 ng/ μ l.

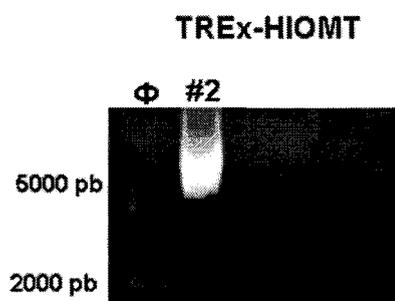


Figura 50. Análisis por electroforesis de la purificación del plásmido recombinante TREx-HIOMT (clon #2). Se utilizó marcadores de tamaño para el ensayo (Φ).

3.9.- Curva de sensibilidad a la zeocina

Antes de realizar la transfección se determinó la mínima concentración de zeocina requerida para matar a las células no transfectadas. Se llevo a cabo una curva de sensibilidad a la zeocina en un rango de 50-1000 μ g/ml en cultivos de células JurkatTet durante 10 días (Figura 51). Cada día se cuantificó el número de células vivas, correspondiente a cada dilución del antibiótico comparándolo con el control sin zeocina. Conforme fueron pasando los días el número de células fue disminuyendo en todas las concentraciones probadas excepto en el control en el cuál iban aumentando. En el día 6 del experimento los cultivos con las concentraciones más altas: 400, 600, 800 y 1000 μ g/ml fueron desechados, pues la gran mayoría estaban muertas. Los cultivos con las concentraciones de zeocina de 200 y 100 μ g/ml se cuantificaron hasta el día 7 y se continuó el experimento hasta el día 10 cuantificando solo el cultivo con la concentración

de 50 $\mu\text{g/ml}$ comparada con el control. Se determinó que 100 $\mu\text{g/ml}$ era la mínima concentración para trabajar los cultivos con células transfectadas.

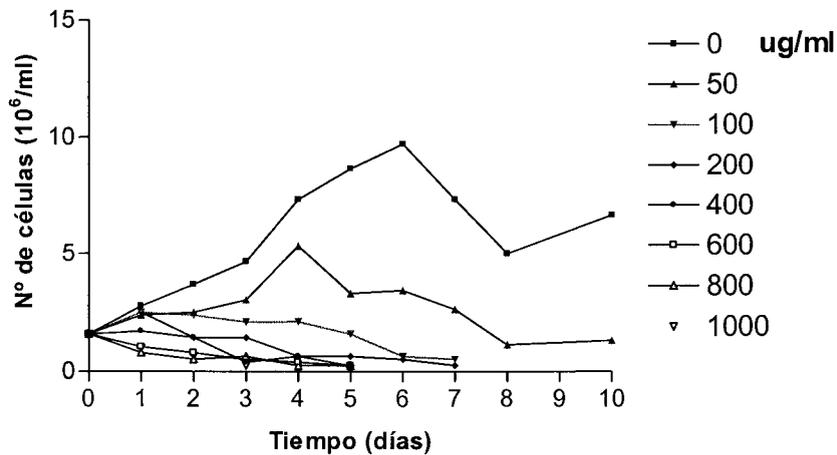


Figura 51. Curva de sensibilidad a la zeocina en células JurkatTet. Las concentraciones de zeocina fueron en un rango de 50 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. La línea roja indica la concentración elegida (100 $\mu\text{g/ml}$). Como control se utilizaron células a las que no se les añadió zeocina (0)

3.10.- Transfección de las células JurkatTet

Las células JurkatTet fueron transfectadas con TREx-HIOMT, utilizando DMRIEC-Reagent por duplicado. Las células transfectadas son mantenidas en medio de cultivo con los antibióticos de selección zeocina y blasticidina. A las 48 horas de haber realizado la transfección se observa que la población celular ha bajado un poco y forman agregados celulares. Conforme van pasando los días sigue bajando el número de células. Algunas se observan más grandes o deformadas, con vacuolas intracelulares, así como prolongaciones del citoplasma. También se observan bastantes detritus celulares. Un pequeño número de células se observan con la morfología normal en uno de los pocillos. Al cuarto día las células del pocillo que contienen células normales se pasa a un flask T-25, el otro se desecha. A partir del décimo día la población de células anormales comienza a bajar con respecto a las normales que siguen multiplicándose. Se continúa con el cultivo durante aproximadamente una semana más hasta obtener una densidad celular de 10^6 cel/ml. Las células se pasan a un flask T-75 para expandir el cultivo. Se congelan viales de células

transfectadas JukatTet-HIOMT a una concentración de 3×10^6 cel/ml. Otra parte de células transfectadas son mantenidas en cultivo para posteriores experimentos.

3.11.- Inducción de la expresión del ARN antisentido.

Para conocer la eficacia del modelo celular knockout condicional para melatonina se llevo a cabo la inducción del ARN antisentido frente a la HIOMT. Las células Jurkat Tet transfectadas son incubadas con diferentes concentraciones de tetraciclina entre 0.1, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 $\mu\text{g/ml}$, durante 24 horas, el cuál es el agente inductor de la transcripción del gen de interés (antisentido HIOMT) en el vector de expresión. Con estas células se procedió a cuantificar la actividad enzimática de la HIOMT y el contenido de melatonina.

3.11.1.- Actividad enzimática

Se midió la actividad enzimática de la HIOMT en las células transfectadas, para comprobar el grado de inhibición (Figura 52). Los datos obtenidos mostraron que a partir de la concentración más baja de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ya se observó una inhibición de la actividad enzimática de 55%. Para 0.25 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ se observó una inhibición de 60%, para 0.75 fue de 62%. Con una concentración de tetraciclina de 1 $\mu\text{g/ml}$ se observó una máxima inhibición (70%) con respecto a las células sin tetraciclina (100%).

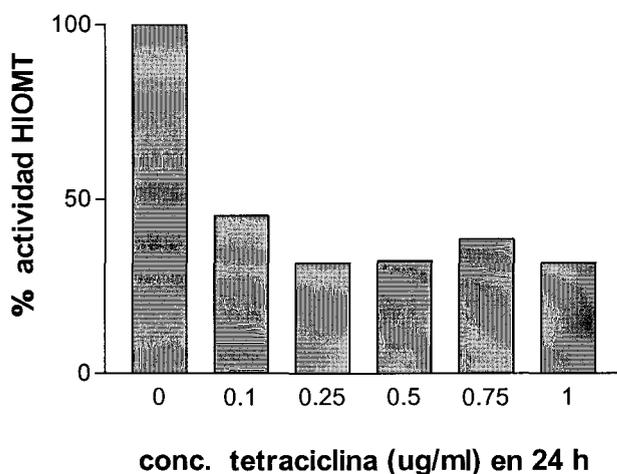


Figura 52. Ensayo de la inhibición de la actividad enzimática de la HIOMT en células transfectadas. Se utilizaron diferentes concentraciones de tetraciclina entre 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$, durante 24 horas. Se utilizó como control células transfectadas sin tetraciclina (0).

3.11.2.- Cuantificación de melatonina

Para comprobar el grado de inhibición en la producción de melatonina en el modelo desarrollado. Se llevó a cabo la cuantificación en los sobrenadantes de los cultivos de las células transfectadas. Previamente fueron inducidas a expresar el ARN antisentido con tetraciclina. Los datos obtenidos mostraron que a partir de la concentración más baja de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ya se observó una inhibición de los niveles de melatonina del 20% (Figura 53). Conforme se aumentó la concentración de tetraciclina los niveles de melatonina siguieron disminuyendo hasta alcanzar una máxima inhibición de casi el 60% para las concentraciones de 0.75 y 1 $\mu\text{g/ml}$ con respecto a las células sin tetraciclina (100%).

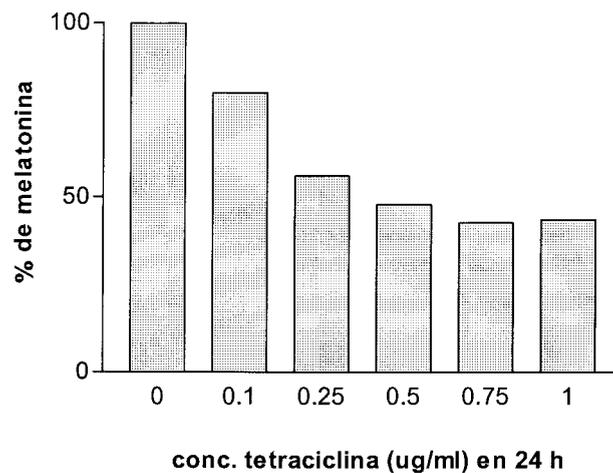


Figura 53. Niveles de melatonina en células transfectadas. Se utilizaron diferentes concentraciones de tetraciclina, entre 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$, durante 24 horas. Se utilizó como control células transfectadas sin tetraciclina (0).

DISCUSIÓN

1.- *In vivo*: estudiar la biosíntesis de melatonina en diferentes órganos y células del sistema inmune de tres cepas ratón: C57BL/6 y Swiss (deficientes en la síntesis de melatonina pineal) y C3H/HeNHsd (control).

Los animales de experimentación, en especial los ratones son una herramienta ampliamente utilizada en diversas áreas de la investigación biomédica. En el estudio de la función de la melatonina la mayoría de los trabajos han sido realizados en ratas, en lugar de en ratones. Esto es en parte debido a que algunas cepas de ratones consanguíneos, utilizadas en el laboratorio pueden presentar alteraciones debidas a los cruces consecutivos. En este sentido muchas cepas de ratones consanguíneas poseen niveles de melatonina en glándula pineal muy bajos con excepción de las cepas C3H y CBA (Goto y col., 1989; Vivien-Roels y col., 1998). Se ha propuesto que esto es debido a que una o ambas enzimas de la ruta biosintética serotonina-melatonina están involucradas (Ebihara y col., 1987), es decir la enzima AANAT que cataliza la acetilación de la serotonina a N-acetilserotonina y la HIOMT que lleva a cabo el último paso al convertir N-acetilserotonina a melatonina. Por otro lado Roseboom y col. (1998), han descrito un knockdown natural para el enzima AANAT, la enzima reguladora de la ruta de síntesis de la melatonina, en la cepa de ratón C57BL/6. Así estos ratones presentan cierta mutación que da como consecuencia transcritos alternativos aberrantes en la glándula pineal, que codifican proteínas con poca o sin actividad enzimática. En base a lo anterior el objetivo inicial de este trabajo de investigación fue estudiar la producción de melatonina en sistema inmune en una cepa de ratón knockdown natural. En la última década se ha demostrado la síntesis de melatonina extrapineal, incluido el sistema inmune (Kvetnoy y col., 1999), esto nos permitiría tener un modelo *in vivo* donde poder estudiar las acciones de la melatonina en sistema inmune murino, sin la interferencia de la producida endógenamente. Debido a que hasta la fecha la enzima HIOMT no ha sido clonada en ratón, se procedió a analizar la expresión de la enzima clave en la síntesis de melatonina la AANAT en sistema inmune en diferentes cepas de ratón y analizar las posibles isoformas de esta enzima.

En nuestro estudio utilizamos tres cepas de ratón: la cepa C57BL/6J, la Swiss y la C3H/HeNHsd. La cepa C57BL/6J ha sido descrita como deficiente en la producción de melatonina (Goto y col., 1989) debido a una mutación puntual en el gen de la AANAT. Esto altera el *splicing* en el ARN, resultando en la inclusión de un pseudoexon de 102

pares de bases en el ARNm maduro de la AANAT entre el exon 3 y 4, lo que conlleva a la traducción de una proteína truncada, debido a la presencia de un codón de terminación (Roseboom y col., 1998). La cepa Swiss, es una cepa no consanguínea y presenta bajos niveles de melatonina, debido tal vez a una deficiente actividad de la AANAT (Vivien-Roels y col., 1998). Por último la cepa C3H/HeNHsd, la cual se utilizó como control ya que presenta niveles de melatonina normales (Goto y col., 1989). Por otro lado en un estudio previo de la expresión de la AANAT realizado por Slominski y col. (2003) en algunos órganos y piel de ratones C57BL/6 se observó la presencia de otras isoformas alternativas de la AANAT, como una inserción de 89 pb entre los exones 1 y 2, por lo que también fueron analizados.

La melatonina es secretada principalmente en la glándula pineal donde las enzimas involucradas en su ruta metabólica, entre ellas la AANAT, son sintetizadas de manera activa. Previo al análisis de la expresión de la AANAT en sistema inmune, se analizó la expresión de la misma en glándula pineal de cada cepa de ratón. En los resultados obtenidos en este estudio incluyendo los exones 3 y 4 de la AANAT en glándula pineal, se obtuvo la banda silvestre de 137 pb y además otra banda de 239 pb correspondiente a la inserción descrita de 102 pb en pineal de ratones C57BL/6 (Roseboom y cols., 1998) en las tres cepas de ratón (**figura 31**). Estos resultados fueron sorprendentes ya que se esperaba encontrar la isoforma con la inserción, solo en los ratones C57BL/6 donde previamente había sido descrita. Es la primera vez que en la cepa Swiss se describen las isoformas de la AANAT en pineal por lo que al ser una cepa no consanguínea es sobresaliente que presente la isoforma mutada. Estos resultados aportarían más información a lo previamente descrito por Goto y col. (1989), con respecto a las alteraciones génicas debidas a los cruces consecutivos en ratones consanguíneos. La presencia de esta isoforma mutada en C3H/HeNHsd parece estar en contradicción con los niveles de melatonina en esta cepa, sin embargo la banda silvestre es suficientemente intensa por lo que los niveles del enzima podrían ser adecuados. El significado de esta isoforma alternativa descrita por Roseboom debería ser estudiada más en profundidad ya que parece expresarse en cepas deficientes y proeficientes en melatonina. Al analizar la expresión de los exones 1 y 2 solo observamos la presencia de la banda silvestre de 105 pb en las tres cepas de ratón (**figura 31**). En el análisis de estos exones, nosotros no encontramos las isoformas descrita por Slominski y col. (2003), en algunos tejidos (cerebro y pituitaria), debidas a un splicing alternativo entre este par de exones.

Al cuantificar el contenido de melatonina en plasma de muestras recogidas en las primeras horas de la mañana en las tres cepas de ratón, encontramos que en las cepas deficientes C57BL/6 y Swiss, fueron altas con respecto a lo ya mostrado en glándula pineal (**figura 39**) lo que indicaría que en nuestro estudio no hay una correlación entre la concentración de melatonina en glándula pineal y plasma en estas cepas. Estos datos apoyan los mostrados por Kennaway y col., (2001) para la cepa C57BL/6. De hecho existen diferencias muy significativas en los niveles de melatonina en pineal entre las cepas deficientes con respecto al control (**figura 38**), mientras que estas diferencias disminuyen cuando estudiamos la melatonina en plasma. Sería importante considerar el papel de la glándula harderiana presente en roedores, ya que esta glándula es una fuente importante de melatonina extrapineal (Djeridane y col., 1998), y por lo tanto pudiera estar contribuyendo a los niveles presentados en plasma en estas cepas de ratón. Es importante mencionar que las muestras fueron obtenidas entre 9 a 10 de la mañana por lo que nuestros datos aportan información acerca de la expresión de la AANAT y de concentraciones de melatonina en estas cepas de ratón en condiciones basales. Esto se hizo tomando en cuenta que se ha descrito que en la glándula pineal de las cepas de ratón C3H y CBA presentan un pico tardío de melatonina con alta amplitud, dos horas antes del amanecer (Goto y col., 1989). Con respecto a las cepas C57BL/6 y Swiss se ha descrito que presentan un pequeño pero significativo pico de melatonina a mitad de la noche y otro pequeño pico fue observado al amanecer (Vivien-Roels y col., 1998).

En los últimos años numerosos trabajos han demostrado que además de la glándula pineal otros sitios extrapineales producen melatonina (Kvetnoy y col., 1999). En la actualidad es conocido que la glándula harderiana, intestino, piel, oído interno, ovarios, algunas estructuras del ojo y sistema inmune pueden sintetizar esta molécula. En nuestro estudio analizamos la expresión del enzima AANAT en tejidos y células del sistema inmune, el timo, el bazo y la médula ósea de las tres cepas de ratón.

Al analizar la expresión de los exones 3 y 4 detectamos amplificación en médula ósea en las tres cepas, en timo en las cepas C3H/HeNHsd y Swiss, en bazo solo observamos señal en la cepa C57BL/6. Siempre que hubo amplificación detectamos las dos isoformas tanto la silvestre como la mutada (**figura 32**) Estos resultados concuerdan con el patrón de

expresión obtenido en glándula pineal, donde encontramos en las tres cepas de ratón tanto la expresión de la isoforma silvestre como la resultante del *splicing* alternativo que incluye la inserción, obtenidas también por Slominski en diferentes tejidos (cerebro, pituitaria y piel) en ratones C57BL/6 (Slomininski y col., 2003). Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha descrito la expresión de la AANAT en timo de rata y de humanos (Jiménez–Jorge y col., 2005; Naranjo y col., 2007). Con este trabajo se aporta más información a la descrita anteriormente, ya que se observa por primera vez la expresión génica de la AANAT en timo de ratón. En este caso además se aporta información acerca de las diferentes isoformas alternativas de la AANAT. Con respecto al estudio de expresión en bazo solo se consiguió detectarla en la cepa C57BL/6, donde observamos tanto la banda silvestre como la mutada. Estos resultados están en contraposición con los descritos por Slominski y col., en la misma cepa de ratón, ya que ellos solo obtuvieron una banda de bajo peso molecular debida a una delección de 69 pb. En estudios previos se demostró la síntesis de melatonina en médula ósea de rata (Tan y col., 1999) y después en médula ósea humana y de ratones C57BL/6 (Conti y col., 2000) Nuestro trabajo muestra, la expresión génica de la AANAT, así como la detección de isoformas expresadas en médula ósea tanto en cepas deficientes (C57BL/6 y Swiss) como pro-eficientes (C3H/HeNHsd) en la producción de melatonina. Interesantemente se observa una señal más intensa de la isoforma silvestre de la AANAT en timo y médula ósea en las cepas deficientes comparada con la cepas pro-eficientes, (**figura 32**). En este sentido se ha observado que en ratas pinealectomizadas existe un aumento en la concentración de melatonina en timo (Jiménez–Jorge y col., 2005), como un posible mecanismo compensatorio. Los mayores niveles de expresión de la AANAT obtenidos en este trabajo pudieran actuar como un mecanismo compensatorio ya que al existir un déficit en pineal, la melatonina producida en sistema inmune pudiera actuar de manera autocrina y paracrina.

Al analizar la expresión de los exones 1 y 2 observamos solo la presencia de la banda silvestre en las tres cepas de ratón (**figura 33**). Al igual que como ocurre en glándula pineal, los resultados muestran que en los tejidos del sistema inmune analizados no encontramos *splicing* alternativo que incluya la inserción descrita entre estos dos exones por Slomininski en diferentes tejidos (cerebro y pituitaria) en ratones C57BL/6 (Slomininski y col., 2003). Estos resultados muestran que el enzima regulador de la síntesis de melatonina está presente en los tejidos del sistema inmune en estas cepas de

ratón. Aunque se detecta la isoforma mutante en todas ellas, la presencia siempre existente de la isoforma silvestre permitiría la síntesis de melatonina en estos tejidos.

La síntesis de melatonina por los componentes del sistema inmune fue estudiada en los trabajos realizados por Finocchiaro y col. (1988; 1991; 1998), los cuales mostraron la capacidad que poseen las PBMC humanos cultivados in vitro para sintetizar melatonina tras la incubación con serotonina o IFN γ . Años después se han seguido publicando trabajos acerca de la producción de melatonina en células y líneas celulares del sistema inmune, (Carrillo-Vico y col., 2004; Martins E Jr y col., 2004; Lardone y col., 2006).

Para continuar nuestro estudio de la expresión de la AANAT en sistema inmune, finalmente analizamos la expresión en células de cultivo de PBMC en reposo de las tres cepas de ratón y estimulando con PHA en las cepas deficientes. En los resultados que obtuvimos para los exones 3 y 4 en PBMC se observó una vez más la isoforma silvestre y la mutada en todos los casos y de una manera más intensa en la cepa control C3H/HeNHsd (**figura 34**). Por otro lado las señales obtenidas de la expresión de la AANAT tras la estimulación con PHA muestran un aumento relativo con respecto a las células no estimuladas. El patrón de amplificación obtenido para los exones 1 y 2 revelo una vez más, únicamente la presencia de la banda silvestre en PBMC en las tres cepas de ratón y con una mayor intensidad en la cepa control. Con respecto a la cepa C57BL/6 solo logramos detectar señal después de la estimulación (**figura 35**). Estos resultados apoyan lo previamente observado en la amplificación de los exones 3 y 4, donde observamos como tras la estimulación con PHA los niveles de expresión del enzima aumenta respecto al control sin estimular. Después de haber llevado a cabo el estudio de expresión en PBMC, se analizó la respuesta funcional de las dos enzimas claves en la síntesis de melatonina, la AANAT e HIOMT. Al medir la actividad enzimática de la AANAT, observamos que las células de las tres cepas de ratón en condiciones basales mostraron actividad enzimática AANAT. Las cepas deficientes mostraron una actividad muy alta con respecto a la cepa control (**figura 36**), estos resultados concuerdan con los mostrados por el grupo de Conti en médula ósea de ratón, donde ellos encuentran una mayor actividad enzimática de la AANAT en médula ósea de la cepa C57BL/6 con respecto a otras cepas, incluida la C3H (Conti y col., 2000). Las PBMC estimulados con PHA, presentaron un aumento de la actividad AANAT con respecto a las células no

estimuladas, en las tres cepas de ratón, esto está en concordancia con los resultados previos en PBMC humanos obtenidos en nuestro laboratorio, donde se demostró que existía actividad enzimática de la AANAT en PBMC humanos y además tras la estimulación con PHA la expresión de la enzima aumenta respecto al control sin estimular (Carrillo-Vico y cols, 2004). La actividad enzimática de la HIOMT en PBMC tanto en condiciones basales como estimuladas mostraron alta actividad enzimática en las tres cepas de ratón (**figura 37**). Se esperaba encontrar baja actividad enzimática en las cepas deficientes ya que estudios previos en glándula pineal han mostrado que en general las cepas de ratón mantenidas en el laboratorio presentan bajas concentraciones de HIOMT o incluso niveles indetectables en la actividad de esta enzima (Ebihara y col., 1987). Con respecto a la naturaleza de los posibles defectos génicos en la enzima HIOMT, en la cepas consanguíneas de ratón poco es conocido (Kennaway y col., 2002). Para completar nuestro estudio llevamos a cabo la cuantificación de la producción de melatonina en sobrenadantes de cultivos de PBMC en reposo y estimulados con PHA de las tres cepas de ratón. La melatonina estuvo presente tanto en sobrenadantes de PBMC en reposo como estimuladas, en las tres cepas de ratón. No se detectaron diferencias significativas entre las tres cepas de ratón, ni tampoco después de la estimulación (**figura 40**). El hecho de no haber encontrado las diferencias esperadas en la concentración de melatonina, lo atribuimos a problemas metodológicos ya que las concentraciones que cuantificamos son bajas y no somos capaces de detectar diferencias. En este sentido el volumen de sangre, del cual obtenemos las células, por cada ratón es muy poca por lo que nos limita en el estudio. Es la primera vez que se demuestra en PBMC de ratón, la presencia de melatonina y de las enzimas implicadas en su síntesis (AANAT e HIOMT), así como la expresión de la enzima clave AANAT, incluyendo sus isoformas. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente en PBMC humanos en nuestro laboratorio (Carrillo-Vico y cols., 2004) y en la médula ósea humana y de ratón (Conti y col., 2000).

Nuestro extensivo análisis molecular de los transcritos de la AANAT en sistema inmune, incluyendo glándula pineal como control, en tres cepas de ratón tanto deficientes en melatonina pineal (C57BL/6 y Swiss) como eficientes (C3H/HeNHsd) demuestra que en todos los tejidos y células del sistema inmune estudiados detectamos tanto la isoforma silvestre como la mutada, en las tres cepas de ratón, por lo que pensamos que quizás no es tan importante esta isoforma mutada y solo es producto de un splicing alternativo. Por

otro lado creemos que la siempre existencia de la isoforma silvestre podría compensar la producción de melatonina en estas cepas de ratón. Por los resultados anteriores podemos afirmar que la cepa de ratón C57BL/6 no se puede utilizar como modelo knockdown para melatonina en sistema inmune. Esto estaría en desacuerdo con lo mostrado por Roseboom y col. (1998), donde se describe a la cepa C57BL/6 como knockdown natural en la síntesis de melatonina, pero de acuerdo con lo descrito por Conti en médula ósea (Conti y col., 2000). El grupo de Slominski demostró la capacidad que tienen extractos de piel de estos mismos ratones para acetilar la serotonina a N-acetilserotonina (NAS), pero él lo atribuye a que esta reacción es llevada a cabo por una N-acetiltransferasa (NAT-1) diferente a la AANAT. (Slominski y col., 2003).

La melatonina participa de manera fundamental en la sincronización de los ritmos circadianos con la actividad fisiológica de los vertebrados, pero además esta molécula exhibe propiedades anti-oxidantes, oncostáticas e inmunomoduladoras. Entre los efectos moduladores que la melatonina ejerce sobre el sistema inmune, la regulación de la producción de mediadores inmunes, fundamentalmente citoquinas, puede considerarse como su principal acción inmunomoduladora sobre el sistema inmune. En este sentido diversos estudios *in vitro* han revelado que la melatonina es capaz de activar a linfocitos y monocitos mediante el aumento de los niveles IL-2, IF γ , TNF α , IL-1, IL-6 y NO. Además, la melatonina también aumenta la producción de IL-12 en monocitos, dirigiendo a las células T hacia un fenotipo Th1 (García-Maurino y col., 1997; Garcia-Maurino y col., 1999; Fjaerli y col., 1999; Kuhlwein y Irwin., 2001). La melatonina sintetizada endógenamente en las PBMC murinos podría participar en la regulación del sistema inmune de manera autocrina, paracrina e intracrina. El estudiar más profundamente este fenómeno nos ayudaría a comprender mejor las funciones de la melatonina como un posible inmunomodulador.

***In vitro*: desarrollo de un modelo celular knockdown condicional para la síntesis de melatonina en una línea linfocítica humana (células Jurkat), utilizando un RNA antisentido frente al enzima hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT) último enzima y específico de la ruta biosintética de melatonina**

En los últimos años la síntesis extrapineal de melatonina es un hecho claramente establecido y por tanto se ha demostrado la presencia de melatonina, así como de la maquinaria enzimática implicada en su síntesis, en otras estructuras extrapineales como retina, hipotálamo, cerebelo, tracto gastrointestinal y células del sistema inmune (Kvetnoy y col., 1999). En relación al sistema inmune, ha sido localizada en timo, mastocitos, células NK, eosinófilos, plaquetas y células endoteliales (Kvetnoy y col., 1999). Además, se han descrito altas concentraciones de melatonina y presencia de su maquinaria biosintética en la médula ósea (Tan y col., 1999; Conti y col., 2000). Mas recientemente en nuestro grupo de investigación se describió por primera vez que cultivos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica humanas en reposo y estimuladas con PHA, sintetizan y liberan al medio melatonina (Carrillo-Vico y col., 2004), también se demostró que la melatonina sintetizada por las células Jurkat esta implicada en la producción de IL-2 (Lardone y col., 2006). La existencia de un efecto directo de la melatonina sobre el sistema inmune se ve reforzada por la presencia de sitios de unión específicos para la melatonina en tejidos y células linfoides (Garcia-Maurino y col., 2000; Carrillo-Vico y col., 2003; Pozo y col., 2004). Son muchos los estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, que demuestran una clara relación entre la melatonina y el sistema inmune. La melatonina contrarresta los estados de inmunodeficiencia que siguen a estados de estrés adrenérgico, tratamientos farmacológicos como los producidos por corticoesteroides o por drogas quimioterapéuticas, o aquellos que siguen a la pinealectomización, recuperando la respuesta inmune humoral y citotóxica. Por otra parte, la melatonina ejerce parte de su efecto sobre el sistema inmune mediante la regulación de la producción de péptidos opioides o de determinadas citocinas como IL-1, IL-6, TNF α , IL-2, INF γ y IL-12 por diferentes células inmunocompetentes (Guerrero y Reiter 2002).

Sin embargo, esta función de la melatonina como inmunomoduladora no está exenta de cierta polémica. Aunque numerosos autores observan una acción directa de la melatonina en experimentos *in vitro* con linfocitos T y B, otros no encuentran ningún efecto sobre células de origen linfoide. Una de las posibles razones para explicar estos resultados contradictorios podría ser que la presencia de la melatonina sintetizada y liberada al medio por las propias células en cultivo enmascarara el efecto de la melatonina exógena. Adicionalmente se ha observado que las situaciones en las cuales los efectos estimuladores de la melatonina se han evidenciado con mayor claridad son aquellas en las cuales existe un estado de inmunodepresión inducida por la edad, el estrés físico, enfermedades infecciosas o por tratamientos con corticoides, compuestos adrenérgicos o drogas antitumorales, ya que muchas de estas situaciones están asociadas con bajos niveles endógenos de melatonina. Este hecho apoyaría la hipótesis de que la melatonina endógena podría estar obstaculizando los efectos de la exógena. Debido a esto, sería interesante conocer el papel fisiológico que tiene la propia melatonina sintetizada por las células del sistema inmune.

En este sentido estudios recientes en PBMC humanos han llevado a cabo el bloqueo transitorio de la síntesis celular de melatonina por medio de cebadores antisentido hacia la enzima HIOMT, específico de la ruta, o mediante la adición al cultivo de un inhibidor de la triptofano hidroxilasa, el paraclorofenilalanina (PCPA), que da lugar a una síntesis deficiente de serotonina y por consiguiente a una disminución de melatonina. Esto indujo una disminución de la liberación de melatonina lo que se tradujo en una reducción de la producción de IL-2 por parte de los mismo linfocitos (Carrillo-Vico y col., 2004). Sin embargo, ambos métodos no son modelos experimentalmente estables y permanentes, ya que necesitan de la adición del inhibidor cada vez que se realice un ensayo. Es importante resaltar que con los cebadores antisentido se consiguió una inhibición del 40% y con las drogas inhibidoras tan solo del 15-20%. Otro abordaje transitorio para poder conocer los posibles mecanismos de acción mediante los cuales la melatonina actúa es por medio de agonistas y antagonistas farmacológicos de los receptores de membrana y nucleares para melatonina (García-Maurino y col., 1998; Drazen y col., 2001); Carrillo-Vico y col., 2003a), pero en este caso estamos utilizando drogas que pueden tener otros efectos no

deseables. Éste enfoque iría encaminado a conocer por cuál mecanismo de acción actuaría la melatonina para obtener un efecto determinado, más que hacia el efecto en sí.

En nuestro objetivo nos propusimos desarrollar un nuevo abordaje experimental para estudiar el mecanismo de acción de la melatonina y sus acciones sobre células inmunes, aplicando la tecnología del RNA antisentido, la cual ha demostrado ser una herramienta muy eficaz para controlar la expresión de genes en células en cultivo. Utilizamos la línea celular Jurkat (una línea linfocítica humana), en la que se había descrito previamente síntesis endógena de melatonina, así como la presencia de dos tipos de receptores para melatonina: de membrana y nuclear (Lardone y col., 2006; García Mauriño y col., 2000; Guerrero y col., 2000). Se desarrolló un modelo celular knock-out para la propia melatonina al inducir la expresión en las células de un RNA antisentido frente al último enzima de su ruta biosintética: la hidroiindol-O-metiltransferasa. Se realizó la transfección celular utilizando el sistema de expresión TERx (Invitrogen). Este sistema induce niveles de expresión del gen deseado superiores a cualquier otro sistema de expresión en células animales. Utiliza como promotor los componentes del operón tet de *E Coli* junto con el enhancer/promotor del citomegalovirus humano, uno de los más potentes promotores conocidos. Además tiene un único sistema de desrepresión (la adición de tetraciclina). Este sistema utiliza dos tipos de vectores: el vector de expresión en donde se llevó a cabo la clonación de la secuencia antisentido del cDNA de la HIOMT y el vector represor el cuál expresa constitutivamente la proteína represora (TetR), ya incluido en la línea celular Jurkat utilizada. La inducción del gen clonado (secuencia antisentido) se produce al añadir tetraciclina en el medio de cultivo.

Los clones transfectados fueron seleccionados y se indujo la expresión del antisentido con tetraciclina. Tras la selección de la concentración óptima de tetraciclina para inducir el antisentido (Figura 51). Para confirmar la eficacia del modelo se utilizó la medición de la actividad enzimática HIOMT, ante la dificultad de utilizar un anticuerpo frente a la proteína, al no existir un anticuerpo específico frente a la HIOMT humana. Con estas células se realizaron ensayos de actividad enzimática HIOMT y se observó una disminución del 70% con respecto a un control de células transfectadas sin tetraciclina (agente inductor) (**figura 52**). Como un segundo abordaje para demostrar la eficacia del modelo, se llevó a cabo la cuantificación de melatonina por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos de las mismas células. Se observó una disminución del 60% en los niveles

de melatonina con respecto a un control de células transfectadas sin tetraciclina (**figura 53**). En trabajos previos utilizando también ARN antisentido insertados en vectores se han obtenido inhibiciones de alrededor del 60% (Matthew y col., 2007), por lo que consideramos que un 60% de inhibición en un modelo estable estaría muy bien. Por otra parte estos resultados superan el nivel de inhibición con respecto a los métodos utilizados en nuestro laboratorio con anterioridad (análogos de receptores, inhibidores de la melatonina endógena, etc), además de tener la ventaja de ser un modelo estable y condicional en una línea celular (Jurkat) utilizada como modelo estándar en investigaciones inmunológicas. Al ser células T transformadas comparten muchas características de las células T normales. Su activación conduce a la síntesis de interleucina 2 (IL-2) y a la expresión de receptores para IL-2 (Wiskocil y col., 1985), lo cuál es un paso clave en la generación y regulación de la respuesta inmune.

Aunque el papel de la melatonina como un regulador de la función inmune resulta evidente de las investigaciones realizadas, los estudios llevados a cabo hasta ahora, son de tipo farmacológico y quedan muchas cuestiones por resolver en relación a su mecanismo de acción y a las citocinas involucradas en el mismo. Con el desarrollado de este modelo celular knockdown condicional para la síntesis de melatonina, se pretende evitar el uso de drogas farmacológicas y así obtener respuesta a estos interrogantes. Los beneficios esperables pueden ser espectaculares teniendo en cuenta que la melatonina puede estar interfiriendo en la acción de un potente mediador inflamatorio como es la prostaglandina E2 además de tener características por si sola estimuladoras del sistema inmune lo que nos abre expectativas para su uso terapéutico en un futuro próximo.

CONCLUSIONES

El análisis y discusión de los resultados presentados en este trabajo nos han permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1.- El gen del enzima AANAT se expresa en timo, bazo y médula ósea tanto en las cepas de ratón C57BL/6 y Swiss (deficientes en melatonina pineal) como en la cepa C3H/HeNHsd utilizada como control.

2.- En timo, bazo, médula ósea y glándula pineal podemos encontrar tanto la isoforma silvestre como la que presenta inserción entre los exones 3 y 4 en las cepas de ratón C57BL/6 y Swiss (deficientes en melatonina pineal) como en la cepa C3H/HeNHsd utilizada como control.

3.- Las diferencias entre el contenido de melatonina de las cepas de ratón C57BL/6 y Swiss (deficientes en melatonina pineal) respecto a la cepa C3H/HeNHsd utilizada como control están más acentuadas en la glándula pineal que en el plasma.

4.- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en reposo y estimuladas con PHA de las tres cepas de ratón, expresan el gen del enzima AANAT. Encontramos tanto la isoforma silvestre como la que presenta la inserción entre los exones 3 y 4 en las cepas de ratón C57BL/6 y Swiss (deficientes en melatonina pineal) como en la cepa C3H/HeNHsd utilizada como control.

5.- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) presentan actividad enzimática NAT. Esta actividad es mayor en las cepas C57BL/6 y Swiss (deficientes en melatonina pineal) con respecto a la cepa C3H/HeNHsd utilizada como control. En todas las cepas estudiadas se incrementa la actividad tras la estimulación con PHA.

6.- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de las tres cepas de ratón presentan actividad enzimática HIOMT.

7.- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de las tres cepas de ratón sintetizan melatonina.

8.- Hemos desarrollado por primera vez un modelo celular knockdown condicional para la síntesis de melatonina, utilizando un RNA antisentido frente al enzima hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT).

9.- La eficacia de este modelo ha sido demostrado por una disminución de la actividad enzimática de la HIOMT del 70% y por una disminución de la síntesis de melatonina del 60% con respecto a las células control.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arendt, J., Bojkowski, C., Folkard, S., Franey, C., Marks, V., Minors, D., Waterhouse, J., Wever, R. A., Wildgruber, C., and Wright, J. Some effects of melatonin and the control of its secretion in humans. *Ciba Found.Symp.* 117, 266-283. 1985.
2. Ader, R., Cohen, N., and Felten, D. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* 345[8942], 99-103. 14-1-1995.
3. Arendt, J. and Skene, D. J. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med.Rev.* 9[1], 25-39. 2005.
4. Arendt, J. Melatonin and human rhythms. *Chronobiol.Int.* 23[1-2], 21-37. 2006.
5. Attanasio, A., Borrelli, P., and Gupta, D. Circadian rhythms in serum melatonin from infancy to adolescence. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 61[2], 388-390. 1985.
6. Baldessarini, R. J. and Kopin, I. J. S-adenosylmethionine in brain and other tissues. *J.Neurochem.* 13[8], 769-777. 1966.
7. Baler, R. and Klein, D. C. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. *J.Biol.Chem.* 270[45], 27319-27325. 10-11-1995.
8. Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93[6], 929-937. 12-6-1998.
9. Bernard, M., Donohue, S. J., and Klein, D. C. Human hydroxyindole-O-methyltransferase in pineal gland, retina and Y79 retinoblastoma cells. *Brain Res.* 696[1-2], 37-48. 23-10-1995.
10. Bernard, M., Dinet, V., and Voisin, P. Transcriptional regulation of the chicken hydroxyindole-O-methyltransferase gene by the cone-rod homeobox-containing protein. *J.Neurochem.* 79[2], 248-257. 2001.
11. Beskonakli, E., Palaoglu, S., Renda, N., Kulacoglu, S., Turhan, T., and Taskin, Y. The effect of pinealectomy on immune parameters in different age groups in rats: results of the weekly alteration of the zinc level and the effect of melatonin administration on wound healing. *J.Clin.Neurosci.* 7[4], 320-324. 2000.
12. Blalock, J. E. The immune system as the sixth sense. *J.Intern.Med.* 257[2], 126-138. 2005.
13. Blanchard, B., Pompon, D., and Ducrocq, C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J.Pineal Res.* 29[3], 184-192. 2000.

14. Blask, D. E., Dauchy, R. T., Sauer, L. A., Krause, J. A., and Brainard, G. C. Light during darkness, melatonin suppression and cancer progression. *Neuro.Endocrinol.Lett.* 23 Suppl 2, 52-56. 2002.
15. Blask, D. E., Dauchy, R. T., Sauer, L. A., Krause, J. A., and Brainard, G. C. Growth and fatty acid metabolism of human breast cancer (MCF-7) xenografts in nude rats: impact of constant light-induced nocturnal melatonin suppression. *Breast Cancer Res.Treat.* 79[3], 313-320. 2003.
16. Blask, D. E., Dauchy, R. T., Sauer, L. A., and Krause, J. A. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytomelatonin. *Carcinogenesis* 25[6], 951-960. 2004.
17. Borjigin, J., Wang, M. M., and Snyder, S. H. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378[6559], 783-785. 21-12-1995.
18. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* 97, 77-89. 1968.
19. Burke, Z., Wells, T., Carter, D., Klein, D., and Baler, R. Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J.Neurochem.* 73[4], 1343-1349. 1999.
20. Caroleo, M. C., Frasca, D., Mancini, C., Nistico, G., and Doria, G. Effect of melatonin on T helper cell activity. *Pharmacol.Res.* 22 Suppl 3, 53. 1990.
21. Caroleo, M. C., Frasca, D., Nistico, G., and Doria, G. Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology* 23[2], 81-89. 1992.
22. Carrillo-Vico, A., Garcia-Perganeda, A., Naji, L., Calvo, J. R., Romero, M. P., and Guerrero, J. M. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol.Life Sci.* 60[10], 2272-2278. 2003.
23. Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., Abreu, P., Lardone, P. J., Garcia-Maurino, S., Reiter, R. J., and Guerrero, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18[3], 537-539. 2004.
24. Carrillo-Vico, A., Reiter, R. J., Lardone, P. J., Herrera, J. L., Fernandez-Montesinos, R., Guerrero, J. M., and Pozo, D. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr.Opin.Investig.Drugs* 7[5], 423-431. 2006.

25. Champney, T. H., Holtorf, A. P., Steger, R. W., and Reiter, R. J. Concurrent determination of enzymatic activities and substrate concentrations in the melatonin synthetic pathway within the same rat pineal gland. *J.Neurosci.Res.* 11[1], 59-66. 1984.
26. Champney, T. H., Allen, G. C., Zannelli, M., and Beausang, L. A. Time-dependent effects of melatonin on immune measurements in male Syrian hamsters. *J.Pineal Res.* 25[3], 142-146. 1998.
27. Chan, A. S., Lai, F. P., Lo, R. K., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Stanbridge, E. J., and Wong, Y. H. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal.* 14[3], 249-257. 2002.
28. Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162[1], 156-159. 1987.
29. Claustrat, B., Brun, J., and Chazot, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med.Rev.* 9[1], 11-24. 2005.
30. Collin, J. P. and Meiniel, A. [The pineal body. Combined ultrastructural, cytochemical (monoamines) and experimental studies in *Testudo mauritanica*. Dense granules of cells of the "sensory" line in the vertebrates]. *Arch.Anat.Microsc.Morphol.Exp.* 60[3], 269-303. 1971.
31. Colombo, L. L., Chen, G. J., Lopez, M. C., and Watson, R. R. Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. *Immunol.Lett.* 33[2], 123-126. 1992.
32. Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M., and Maestroni, J. M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J.Pineal Res.* 28[4], 193-202. 2000.
33. Coon, S. L., Mazuruk, K., Bernard, M., Roseboom, P. H., Klein, D. C., and Rodriguez, I. R. The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34[1], 76-84. 15-5-1996.
34. Cos, S., Martinez-Campa, C., Mediavilla, M. D., and Sanchez-Barcelo, E. J. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J.Pineal Res.* 38[2], 136-142. 2005.
35. Croxen, M. A., Ernst, P. B., and Hoffman, P. S. Antisense RNA modulation of alkyl hydroperoxide reductase levels in *Helicobacter pylori* correlates with organic peroxide toxicity but not infectivity. *J.Bacteriol.* 189[9], 3359-3368. 2007.
36. Csaba, G. and Barath, P. Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol.Exp.* 9[1], 59-67. 1975.

37. Currier, N. L., Sun, L. Z., and Miller, S. C. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J.Neuroimmunol.* 104[2], 101-108. 1-5-2000.
38. de Almeida, E. A., Martinez, G. R., Klitzke, C. F., de Medeiros, M. H., and Di Mascio, P. Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2(1\Delta g)$) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *J.Pineal Res.* 35[2], 131-137. 2003.
39. del Rio, B., Garcia Pedrero, J. M., Martinez-Campa, C., Zuazua, P., Lazo, P. S., and Ramos, S. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J.Biol.Chem.* 279[37], 38294-38302. 10-9-2004.
40. Dellegar, S. M., Murphy, S. A., Bourne, A. E., DiCesare, J. C., and Purser, G. H. Identification of the factors affecting the rate of deactivation of hypochlorous acid by melatonin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 257[2], 431-439. 13-4-1999.
41. Ding, J. M., Faiman, L. E., Hurst, W. J., Kuriashkina, L. R., and Gillette, M. U. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J.Neurosci.* 17[2], 667-675. 15-1-1997.
42. Donohue, S. J., Roseboom, P. H., Illnerova, H., Weller, J. L., and Klein, D. C. Human hydroxyindole-O-methyltransferase: presence of LINE-1 fragment in a cDNA clone and pineal mRNA. *DNA Cell Biol.* 12[8], 715-727. 1993.
43. Drazen, D. L. and Nelson, R. J. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 74[3], 178-184. 2001.
44. Drew, J. E., Barrett, P., Mercer, J. G., Moar, K. M., Canet, E., Delagrangé, P., and Morgan, P. J. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J.Neuroendocrinol.* 13[5], 453-458. 2001.
45. Drijfhout, W. J., van der Linde, A. G., Kooi, S. E., Grol, C. J., and Westerink, B. H. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J.Neurochem.* 66[2], 748-755. 1996.
46. Dubocovich, M. L. and Takahashi, J. S. Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84[11], 3916-3920. 1987.
47. Dubocovich, M. L., Rivera-Bermudez, M. A., Gerdin, M. J., and Masana, M. I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci.* 8, d1093-d1108. 1-9-2003.

48. Duncan, M. J., Takahashi, J. S., and Dubocovich, M. L. Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology* 125[2], 1011-1018. 1989.
49. Ebihara, S., Hudson, D. J., Marks, T., and Menaker, M. Pineal indole metabolism in the mouse. *Brain Res.* 416[1], 136-140. 21-7-1987.
50. Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M. R., and Reppert, S. M. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91[13], 6133-6137. 21-6-1994.
51. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84[21], 7413-7417. 1987.
52. Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., and Felgner, P. L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J.Biol.Chem.* 269[4], 2550-2561. 28-1-1994.
53. Finocchiaro, L. M., Arzt, E. S., Fernandez-Castelo, S., Criscuolo, M., Finkielman, S., and Nahmod, V. E. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J.Interferon Res.* 8[6], 705-716. 1988.
54. Finocchiaro, L. M., Nahmod, V. E., and Launay, J. M. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem.J.* 280 (Pt 3), 727-731. 15-12-1991.
55. Finocchiaro, L. M. and Glikin, G. C. Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J.Pineal Res.* 24[1], 22-34. 1998.
56. Fjaerli, O., Lund, T., and Osterud, B. The effect of melatonin on cellular activation processes in human blood. *J.Pineal Res.* 26[1], 50-55. 1999.
57. Fraschini, F., Ferioli, M. E., Nebuloni, R., and Scalabrino, G. Pineal gland and polyamines. *J.Neural Transm.* 48[3], 209-221. 1980.
58. Fraschini, F., Scaglione, F., Franco, P., Demartini, G., Lucini, V., and Stankov, B. Melatonin and immunity. *Acta Oncol.* 29[6], 775-776. 1990.
59. Frungieri, M. B., Mayerhofer, A., Zitta, K., Pignataro, O. P., Calandra, R. S., and Gonzalez-Calvar, S. I. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 146[3], 1541-1552. 2005.
60. Ganguly, S., Gastel, J. A., Weller, J. L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M. A., Coon, S. L., Hickman, A. B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J. A., and Klein, D. C. Role of a pineal cAMP-operated

arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98[14], 8083-8088. 3-7-2001.

61. Ganguly, S., Coon, S. L., and Klein, D. C. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* 309[1], 127-137. 2002.
62. Garcia-Mauriño, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Ráfii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., and Guerrero, J. M. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J.Immunol.* 159[2], 574-581. 15-7-1997.
63. Garcia-Mauriño, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Goberna, R., and Guerrero, J. M. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J.Neuroimmunol.* 92[1-2], 76-84. 1-12-1998.
64. Garcia-Mauriño, S., Pozo, D., Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., and Guerrero, J. M. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 65[20], 2143-2150. 1999.
65. Garcia-Mauriño, S., Pozo, D., Calvo, J. R., and Guerrero, J. M. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J.Pineal Res.* 29[3], 129-137. 2000.
66. Garcia-Pergañeda, A., Guerrero, J. M., Ráfii-El-Idrissi, M., Paz, Romero M., Pozo, D., and Calvo, J. R. Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *J.Neuroimmunol.* 95[1-2], 85-94. 1-3-1999.
67. Gauer, F., Masson-Pevet, M., and Pevet, P. Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res.* 602[1], 153-156. 29-1-1993.
68. Gibbs, F. P. and Vriend, J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 109[5], 1796-1798. 1981.
69. Giguere, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr.Rev.* 20[5], 689-725. 1999.
70. Gilad, E., Wong, H. R., Zingarelli, B., Virag, L., O'Connor, M., Salzman, A. L., and Szabo, C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J.* 12[9], 685-693. 1998.

71. Giordano, M., Vermeulen, M., and Palermo, M. S. Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. *FASEB J.* 7[11], 1052-1054. 1993.
72. Goto, M., Oshima, I., Tomita, T., and Ebihara, S. Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J.Pineal Res.* 7[2], 195-204. 1989.
73. Grotta, L. J. and Brown, G. M. Antibodies to indolealkylamines: serotonin and melatonin. *Can.J.Biochem.* 52[3], 196-202. 1974.
74. Guerrero, J. M. and Reiter, R. J. Melatonin-immune system relationships. *Curr.Top.Med.Chem.* 2[2], 167-179. 2002.
75. Haldar, C., Rai, S., and Singh, R. Melatonin blocks dexamethasone-induced immunosuppression in a seasonally breeding rodent Indian palm squirrel, *Funambulus pennanti*. *Steroids* 69[6], 367-377. 2004.
76. Hannibal, J., Ding, J. M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P. J., Gillette, M. U., and Mikkelsen, J. D. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J.Neurosci.* 17[7], 2637-2644. 1-4-1997.
77. Haus, E., Lakatua, D. J., Swoyer, J., and Sackett-Lundeen, L. Chronobiology in hematology and immunology. *Am.J.Anat.* 168[4], 467-517. 1983.
78. Hill, S. M., Spriggs, L. L., Simon, M. A., Muraoka, H., and Blask, D. E. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett.* 64[3], 249-256. 10-7-1992.
79. Hillen, W. and Berens, C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu.Rev.Microbiol.* 48, 345-369. 1994.
80. Ishida, I., Obinata, M., and Deguchi, T. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding hydroxyindole O-methyltransferase of bovine pineal glands. *J.Biol.Chem.* 262[6], 2895-2899. 25-2-1987.
81. Jankovic, B. D., Isakovic, K., and Petrovic, S. Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. *Immunology* 18[1], 1-6. 1970.
82. Jimenez-Jorge, S., Jimenez-Caliani, A. J., Guerrero, J. M., Naranjo, M. C., Lardone, P. J., Carrillo-Vico, A., Osuna, C., and Molinero, P. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *J.Pineal Res.* 39[1], 77-83. 2005.
83. Kane, C. D. and Means, A. R. Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *EMBO J.* 19[4], 691-701. 15-2-2000.
84. Kappers, J. A. [The topography and innervation of the epiphysis cerebri of the albino rat, with some histochemical findings.]. *Ned.Tijdschr.Geneeskd.* 104, 2580-2582. 17-12-1960.

85. Karasek, M., Pawlikowski, M., Nowakowska-Jankiewicz, B., Kolodziej-Maciejewska, H., Zieleniewski, J., Cieslak, D., and Leidenberger, F. Circadian variations in plasma melatonin, FSH, LH, and prolactin and testosterone levels in infertile men. *J.Pineal Res.* 9[2], 149-157. 1990.
86. Kennaway, D. J., Dunstan, E. A., and Staples, L. D. Photoperiodic control of the onset of breeding activity and fecundity in ewes. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 34, 187-199. 1987.
87. Kennaway, D. J., Voultsios, A., Varcoe, T. J., and Moyer, R. W. Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 282[2], R358-R365. 2002.
88. Kiefer, T. L., Lai, L., Yuan, L., Dong, C., Burow, M. E., and Hill, S. M. Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. *J.Pineal Res.* 38[4], 231-239. 2005.
89. Klein, D. C., Buda, M. J., Kapoor, C. L., and Krishna, G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turnoff". *Science* 199[4326], 309-311. 20-1-1978.
90. Klein, D. C., Smoot, R., Weller, J. L., Higa, S., Markey, S. P., Creed, G. J., and Jacobowitz, D. M. Lesions of the paraventricular nucleus area of the hypothalamus disrupt the suprachiasmatic leads to spinal cord circuit in the melatonin rhythm generating system. *Brain Res.Bull.* 10[5], 647-652. 1983.
91. Klein, D. C., Coon, S. L., Roseboom, P. H., Weller, J. L., Bernard, M., Gastel, J. A., Zatz, M., Iuvone, P. M., Rodriguez, I. R., Begay, V., Falcon, J., Cahill, G. M., Cassone, V. M., and Baler, R. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog.Horm.Res.* 52, 307-357. 1997.
92. Klein, D. C., Ganguly, S., Coon, S., Weller, J. L., Obsil, T., Hickman, A., and Dyda, F. 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem.Soc.Trans.* 30[4], 365-373. 2002.
93. Korf, H. W., Schomerus, C., and Stehle, J. H. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv.Anat.Embryol.Cell Biol.* 146, 1-100. 1998.
94. Korf, H. W. and von Gall, C. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol.Cell Endocrinol.* 252[1-2], 57-68. 27-6-2006.
95. Kuhlwein, E. and Irwin, M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. *J.Neuroimmunol.* 117[1-2], 51-57. 2-7-2001.
96. Kveder, S. and McISAAC, W. M. The metabolism of melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) and 5-methoxytryptamine. *J.Biol.Chem.* 236, 3214-3220. 1961.

97. Kvetnoy, I., Sandvik, A. K., and Waldum, H. L. The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. *J.Mol.Endocrinol.* 18[1], 1-3. 1997.
98. Kvetnoy, I. M. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem.J.* 31[1], 1-12. 1999.
99. Lardone, P. J., Carrillo-Vico, A., Naranjo, M. C., De Felipe, B., Vallejo, A., Karasek, M., and Guerrero, J. M. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. *J.Cell Physiol* 206[1], 273-279. 2006.
100. Leon-Blanco, M. M., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Calvo, J. R., and Pozo, D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J.Pineal Res.* 35[3], 204-211. 2003.
101. Lerner, A. B. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J.Am.Chem.Soc.* 80, 2587. 1958.
102. Lewy, A. J., Ahmed, S., Jackson, J. M., and Sack, R. L. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol.Int.* 9[5], 380-392. 1992.
103. Li, X., Chen, S., Wang, Q., Zack, D. J., Snyder, S. H., and Borjigin, J. A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95[4], 1876-1881. 17-2-1998.
104. Lima, F. B., Machado, U. F., Bartol, I., Seraphim, P. M., Sumida, D. H., Moraes, S. M., Hell, N. S., Okamoto, M. M., Saad, M. J., Carvalho, C. R., and Cipollaneto, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am.J.Physiol* 275[6 Pt 1], E934-E941. 1998.
105. Lissoni, P., Viviani, S., Bajetta, E., Buzzoni, R., Barreca, A., Mauri, R., Resentini, M., Morabito, F., Esposti, D., Esposti, G., and . A clinical study of the pineal gland activity in oncologic patients. *Cancer* 57[4], 837-842. 15-2-1986.
106. Liu, C., Weaver, D. R., Jin, X., Shearman, L. P., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., and Reppert, S. M. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19[1], 91-102. 1997.
107. Liu, Z. M. and Pang, S. F. [125I]iodomelatonin-binding sites in the bursa of Fabricius of birds: binding characteristics, subcellular distribution, diurnal variations and age studies. *J.Endocrinol.* 138[1], 51-57. 1993.
108. Lopez-Gonzalez, M. A., Martin-Cacao, A., Calvo, J. R., Reiter, R. J., Osuna, C., and Guerrero, J. M. Specific binding of 2-[125I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J.Neuroimmunol.* 45[1-2], 121-126. 1993.

109. Lopez-Gonzalez, M. A., Guerrero, J. M., Sanchez, B., and Delgado, F. Melatonin restores and enhances the human type B tonsillar lymphocyte subset in recurrent acute tonsillitis. *Neurosci.Lett.* 247[2-3], 131-134. 15-5-1998.
110. Macchi, M. M. and Bruce, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 25[3-4], 177-195. 2004.
111. Maestroni, G. J., Conti, A., and Pierpaoli, W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J.Neuroimmunol.* 13[1], 19-30. 1986.
112. Maestroni, G. J., Conti, A., and Pierpaoli, W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin.Exp.Immunol.* 68[2], 384-391. 1987.
113. Maestroni, G. J. and Conti, A. Beta-endorphin and dynorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int.J.Immunopharmacol.* 11[4], 333-340. 1989.
114. Maestroni, G. J., Conti, A., and Lissoni, P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res.* 54[17], 4740-4743. 1-9-1994.
115. Maestroni, G. J., Zammaretti, F., and Pedrinis, E. Hematopoietic effect of melatonin involvement of type 1 kappa-opioid receptor on bone marrow macrophages and interleukin-1. *J.Pineal Res.* 27[3], 145-153. 1999.
116. Mahle, C. D. and Watson, A. J. Melatonin receptors: potential targets for central nervous system disorders. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 6[4], 399-406. 1997.
117. Marin, A., Urena, J., and Tabares, L. Intracellular calcium release mediated by noradrenaline and acetylcholine in mammalian pineal cells. *J.Pineal Res.* 21[1], 15-28. 1996.
118. Martin-Cacao, A., Lopez-Gonzalez, M. A., Reiter, R. J., Calvo, J. R., and Guerrero, J. M. Binding of 2-[125I]melatonin by rat thymus membranes during postnatal development. *Immunol.Lett.* 36[1], 59-63. 1993.
119. Martins E Jr, Ferreira, A. C., Skorupa, A. L., Afeche, S. C., Cipolla-Neto, J., and Costa Rosa, L. F. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J.Leukoc.Biol.* 75[6], 1116-1121. 2004.
120. Masana, M. I. and Dubocovich, M. L. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci.STKE.* 2001[107], E39. 6-11-2001.
121. Masson-Pevet, M., Gauer, F., Schuster, C., and Guerrero, H. Y. Photic regulation of mt(1) melatonin receptors and 2-iodomelatonin binding in the rat and Siberian hamster. *Biol.Signals Recept.* 9[3-4], 188-196. 2000.

122. Matsushima, S., Sakai, Y., Hira, Y., Oomori, Y., and Daikoku, S. Immunohistochemical studies on sympathetic and non-sympathetic nerve fibers and neuronal cell bodies in the pineal gland of cotton rats, *Sigmodon hispidus*. *Arch.Histol.Cytol.* 57[1], 47-58. 1994.
123. McKinney, T. D., Vaughan, M. K., and Reiter, R. J. Pineal influence on intermale aggression in adult house mice. *Physiol Behav.* 15[2], 213-216. 1975.
124. Miguez, J. M., Simonneaux, V., and Pevet, P. The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. *J.Pineal Res.* 23[2], 63-71. 1997.
125. Missbach, M., Jagher, B., Sigg, I., Nayeri, S., Carlberg, C., and Wiesenbergl, I. Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha with potent antiarthritic activity. *J.Biol.Chem.* 271[23], 13515-13522. 7-6-1996.
126. Molinero, P., Soutto, M., Benot, S., Hmadcha, A., and Guerrero, J. M. Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin alpha1 and thymulin concentrations: observations in rats and humans. *J.Neuroimmunol.* 103[2], 180-188. 1-3-2000.
127. Moller, M. and Baeres, F. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* 309[1], 139-150. 2002.
128. Moore, R. Y. and Klein, D. C. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* 71[1], 17-33. 10-5-1974.
129. Mori, W., Aoyama, H., and Mori, N. Melatonin protects rats from injurious effects of a glucocorticoid, dexamethasone. *Jpn.J.Exp.Med.* 54[6], 255-261. 1984.
130. Morrey, K. M., McLachlan, J. A., Serkin, C. D., and Bakouche, O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J.Immunol.* 153[6], 2671-2680. 15-9-1994.
131. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1, 263-273. 1986.
132. Naranjo, M. C., Guerrero, J. M., Rubio, A., Lardone, P. J., Carrillo-Vico, A., Carrascosa-Salmoral, M. P., Jimenez-Jorge, S., Arellano, M. V., Leal-Noval, S. R., Leal, M., Lissen, E., and Molinero, P. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol.Life Sci.* 2-3-2007.
133. Navajas, C., Kokkola, T., Poso, A., Honka, N., Gynther, J., and Laitinen, J. T. A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor. *Eur.J.Pharmacol.* 304[1-3], 173-183. 23-5-1996.
134. Nelson, R. J. Seasonal immune function and sickness responses. *Trends Immunol.* 25[4], 187-192. 2004.

135. Okatani, Y. and Sagara, Y. Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional secondary amenorrhoea: relation to endogenous oestrogen concentration. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 41[6], 763-770. 1994.
136. Paglieroni, T. G. and Holland, P. V. Circannual variation in lymphocyte subsets, revisited. *Transfusion* 34[6], 512-516. 1994.
137. Pahlavani, M. A. and Harris, M. D. In vitro effects of melatonin on mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine expression in young and old rats. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 19[3], 327-337. 1997.
138. Pardridge, W. M. and Mietus, L. J. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J.Neurochem.* 34[6], 1761-1763. 1980.
139. Paul, P., Lahaye, C., Delagrangé, P., Nicolas, J. P., Canet, E., and Boutin, J. A. Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 290[1], 334-340. 1999.
140. Petrovsky, N. and Harrison, L. C. Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance? *J.Immunol.* 158[11], 5163-5168. 1-6-1997.
141. Pevet, P. Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J.Neuroendocrinol.* 15[4], 422-426. 2003.
142. Pevet, P., Agez, L., Bothorel, B., Saboureau, M., Gauer, F., Laurent, V., and Masson-Pevet, M. Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol.Int.* 23[1-2], 39-51. 2006.
143. Pieri, C., Recchioni, R., Moroni, F., Marcheselli, F., Marra, M., Marinoni, S., and Di Primio, R. Melatonin regulates the respiratory burst of human neutrophils and their depolarization. *J.Pineal Res.* 24[1], 43-49. 1998.
144. Pioli, C., Caroleo, M. C., Nistico, G., and Doria, G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int.J.Immunopharmacol.* 15[4], 463-468. 1993.
145. Poon, A. M. and Pang, S. F. 2-[125I]iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sci.* 50[22], 1719-1726. 1992.
146. Poon, A. M., Wang, X. L., and Pang, S. F. Characteristics of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the pigeon spleen and modulation of binding by guanine nucleotides. *J.Pineal Res.* 14[4], 169-177. 1993.
147. Pozo, D., Delgado, M., Fernandez-Santos, J. M., Calvo, J. R., Gomariz, R. P., Martín-Lacave, I., Ortiz, G. G., and Guerrero, J. M. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J.* 11[6], 466-473. 1997.
148. Pozo, D., Garcia-Maurino, S., Guerrero, J. M., and Calvo, J. R. mRNA expression of nuclear receptor RZR/ROR α , melatonin membrane receptor MT, and

- hydroxyindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J.Pineal Res.* 37[1], 48-54. 2004.
149. Rafii-El-Idrissi, M., Calvo, J. R., Giordano, M., and Guerrero, J. M. Specific binding of 2-[125I]iodomelatonin by rat spleen crude membranes: day-night variations and effect of pinealectomy and continuous light exposure. *J.Pineal Res.* 20[1], 33-38. 1996.
 150. Rafii-El-Idrissi, M., Calvo, J. R., Harmouch, A., Garcia-Maurino, S., and Guerrero, J. M. Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. *J.Neuroimmunol.* 86[2], 190-197. 15-6-1998.
 151. Rajaratnam, S. M. and Arendt, J. Health in a 24-h society. *Lancet* 358[9286], 999-1005. 22-9-2001.
 152. Redman, J., Armstrong, S., and Ng, K. T. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219[4588], 1089-1091. 4-3-1983.
 153. Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Lopez-Burillo, S., Sainz, R. M., and Mayo, J. C. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv.Exp.Med.Biol.* 527, 539-548. 2003.
 154. Reiter, R. J., Tan, D. X., and Pappolla, M. A. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1035, 179-196. 2004.
 155. Reiter, R. J., Tan, D. X., Leon, J., Kilic, U., and Kilic, E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 230[2], 104-117. 2005.
 156. Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A., and Gusella, J. F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92[19], 8734-8738. 12-9-1995.
 157. Reppert, S. M., Weaver, D. R., and Godson, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol.Sci.* 17[3], 100-102. 1996.
 158. Ribelayga, C., Gauer, F., Calgari, C., Pevet, P., and Simonneaux, V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 140[3], 1375-1384. 1999.
 159. Rodriguez, I. R., Mazuruk, K., Schoen, T. J., and Chader, G. J. Structural analysis of the human hydroxyindole-O-methyltransferase gene. Presence of two distinct promoters. *J.Biol.Chem.* 269[50], 31969-31977. 16-12-1994.
 160. Rodriguez, A. B., Nogales, G., Marchena, J. M., Ortega, E., and Barriga, C. Suppression of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. *Biochem.Pharmacol.* 58[8], 1301-1306. 15-10-1999.

161. Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., and Reiter, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J.Pineal Res.* 36[1], 1-9. 2004.
162. Rojansky, N., Brzezinski, A., and Schenker, J. G. Seasonality in human reproduction: an update. *Hum.Reprod.* 7[6], 735-745. 1992.
163. Roseboom, P. H., Namboodiri, M. A., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Rodriguez, I. R., Gastel, J. A., and Klein, D. C. Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 63[1], 189-197. 10-12-1998.
164. Ruyschaert, J. M., el Ouahabi, A., Willeaume, V., Huez, G., Fuks, R., Vandenbranden, M., and Di Stefano, P. A novel cationic amphiphile for transfection of mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 203[3], 1622-1628. 30-9-1994.
165. Sack, R. L. and Lewy, A. J. Circadian rhythm sleep disorders: lessons from the blind. *Sleep Med.Rev.* 5[3], 189-206. 2001.
166. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 24, 476-480. 1992.
167. Sainz, R. M., Mayo, J. C., Uria, H., Kotler, M., Antolin, I., Rodriguez, C., and Menendez-Pelaez, A. The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis in thymocytes. *J.Pineal Res.* 19[4], 178-188. 1995.
168. Sainz, R. M., Mayo, J. C., Reiter, R. J., Tan, D. X., and Rodriguez, C. Apoptosis in primary lymphoid organs with aging. *Microsc.Res.Tech.* 62[6], 524-539. 15-12-2003.
169. Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O., and Leppaluoto, J. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci.* 76[10], 1123-1134. 21-1-2005.
170. Sanchez-Barcelo, E. J., Cos, S., Fernandez, R., and Mediavilla, M. D. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr.Relat Cancer* 10[2], 153-159. 2003.
171. Sanchez-Barcelo, E. J., Cos, S., Mediavilla, D., Martinez-Campa, C., Gonzalez, A., and Alonso-Gonzalez, C. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J.Pineal Res.* 38[4], 217-222. 2005.
172. Sato, T., Kaneko, M., Hama, A., Kusakari, T., and Fujieda, H. Expression of class II MHC molecules in the rat pineal gland during development and effects of treatment with carbon tetrachloride. *Cell Tissue Res.* 284[1], 65-76. 1996.
173. Scalabrino, G., Ferioli, M. E., Nebuloni, R., and Fraschini, F. Effects of pinealectomy on the circadian rhythms of the activities of polyamine

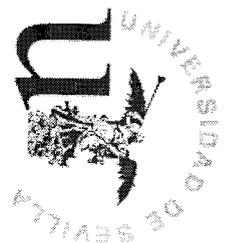
- biosynthetic decarboxylases and tyrosine aminotransferase in different organs of the rat. *Endocrinology* 104[2], 377-384. 1979.
174. Silva, S. O., Rodrigues, M. R., Ximenes, V. F., Bueno-da-Silva, A. E., Amarante-Mendes, G. P., and Campa, A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *J.Neuroimmunol.* 156[1-2], 146-152. 2004.
175. Simonneaux, V. and Ribelayga, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol.Rev.* 55[2], 325-395. 2003.
176. Slominski, A., Pisarchik, A., Johansson, O., Jing, C., Semak, I., Slugocki, G., and Wortsman, J. Tryptophan hydroxylase expression in human skin cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1639[2], 80-86. 15-10-2003.
177. Smirnov, A. N. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc.)* 66[1], 19-26. 2001.
178. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 150[1], 76-85. 1985.
179. Song, Y., Tam, P. C., Poon, A. M., Brown, G. M., and Pang, S. F. 2-[125I]iodomelatonin-binding sites in the human kidney and the effect of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate). *J.Clin.Endocrinol.Metab* 80[5], 1560-1565. 1995.
180. Spessert, R., Hill, G., and Vollrath, L. In rat pinealocytes the cyclic GMP response to NO is regulated by Ca²⁺ and protein kinase C. *Brain Res.* 694[1-2], 207-212. 2-10-1995.
181. Stehle, J. H., von Gall, C., and Korf, H. W. Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res.* 309[1], 173-182. 2002.
182. Steinhilber, D., Brungs, M., Werz, O., Wiesenberg, I., Danielsson, C., Kahlen, J. P., Nayeri, S., Schrader, M., and Carlberg, C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 270[13], 7037-7040. 31-3-1995.
183. Sugden, D., Vanecek, J., Klein, D. C., Thomas, T. P., and Anderson, W. B. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 314[6009], 359-361. 28-3-1985.
184. Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sakai, H., and Yonehara, H. Blastidicin S, a new antibiotic. *J.Antibiot.(Tokyo)* 11[1], 1-5. 1958.
185. Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Plummer, B. F., Hardies, L. J., Weintraub, S. T., Vijayalaxmi, and Shepherd, A. M. A novel melatonin

- metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 253[3], 614-620. 30-12-1998.
186. Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W. B., Zhang, M., Weintraub, S. T., Cabrera, J., Sainz, R. M., and Mayo, J. C. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim.Biophys.Acta* 1472[1-2], 206-214. 18-10-1999.
 187. Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W. B., Karbownik, M., and Calvo, J. R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol.Signals Recept.* 9[3-4], 137-159. 2000.
 188. Tan, D. X., Manchester, L. C., Burkhardt, S., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Kohen, R., Shohami, E., Huo, Y. S., Hardeland, R., and Reiter, R. J. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15[12], 2294-2296. 2001.
 189. Tan, D. X., Manchester, L. C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J. C., Sainz, R. M., and Reiter, R. J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J.Pineal Res.* 34[1], 75-78. 2003.
 190. Tian, Y. M., Zhang, G. Y., and Dai, Y. R. Melatonin rejuvenates degenerated thymus and redresses peripheral immune functions in aged mice. *Immunol.Lett.* 88[2], 101-104. 5-8-2003.
 191. Travis, R. C., Allen, D. S., Fentiman, I. S., and Key, T. J. Melatonin and breast cancer: a prospective study. *J.Natl.Cancer Inst.* 96[6], 475-482. 17-3-2004.
 192. Vanecek, J., Sugden, D., Weller, J., and Klein, D. C. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 116[6], 2167-2173. 1985.
 193. Vanecek, J., Pavlik, A., and Illnerova, H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 435[1-2], 359-362. 1-12-1987.
 194. Vanecek, J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 78[3], 687-721. 1998.
 195. Vaughan, J. H. Clinical immunology. Introduction. *Postgrad.Med.* 54[5], 56-59. 1973.
 196. Vaughan, M. K. and Reiter, R. J. Transient hypertrophy of the ventral prostate and coagulating glands and accelerated thymic involution following pinealectomy in the mouse. *Tex.Rep.Biol.Med.* 29[4], 579-586. 1971.
 197. Vivien-Roels, B., Malan, A., Rettori, M. C., Delagrangé, P., Jeannot, J. P., and Pevet, P. Daily variations in pineal melatonin concentrations in inbred and outbred mice. *J.Biol.Rhythms* 13[5], 403-409. 1998.

198. Voisin, P., Namboodiri, M. A., and Klein, D. C. Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J.Biol.Chem.* 259[17], 10913-10918. 10-9-1984.
199. Voisin, P., Guerlotte, J., and Collin, J. P. An antiserum against chicken hydroxyindole-O-methyltransferase reacts with the enzyme from pineal gland and retina and labels pineal modified photoreceptors. *Brain Res.* 464[1], 53-61. 1988.
200. von Gall, C., Weaver, D. R., Kock, M., Korf, H. W., and Stehle, J. H. Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor. *Neuroreport* 11[9], 1803-1807. 26-6-2000.
201. Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., and Reppert, S. M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14[4], 697-706. 1995.
202. Wiesenberg, I., Missbach, M., Kahlen, J. P., Schrader, M., and Carlberg, C. 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[3], 327-333. 11-2-1995.
203. Wiskocil, R., Weiss, A., Imboden, J., Kamin-Lewis, R., and Stobo, J. Activation of a human T cell line: a two-stimulus requirement in the pretranslational events involved in the coordinate expression of interleukin 2 and gamma-interferon genes. *J.Immunol.* 134[3], 1599-1603. 1985.
204. Withyachumnarnkul, B., Reiter, R. J., Lerchl, A., Nonaka, K. O., and Stokkan, K. A. Evidence that interferon-gamma alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. *Int.J.Biochem.* 23[12], 1397-1401. 1991.
205. Witt-Enderby, P. A., Bennett, J., Jarzynka, M. J., Firestine, S., and Melan, M. A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72[20], 2183-2198. 4-4-2003.
206. Wolfler, A., Schauenstein, K., and Liebmann, P. M. Lack of calmodulin antagonism of melatonin in T-lymphocyte activation. *Life Sci.* 63[10], 835-842. 1998.
207. Yamaguchi, H., Yamamoto, C., and Tanaka, N. Inhibition of protein synthesis by blasticidin S. I. Studies with cell-free systems from bacterial and mammalian cells. *J.Biochem.(Tokyo)* 57[5], 667-677. 1965.
208. Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., and Tei, H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288[5466], 682-685. 28-4-2000.
209. Yoshimura, T., Nagabukuro, A., Matsuda, Y., Suzuki, T., Kuroiwa, A., Iigo, M., Namikawa, T., and Ebihara, S. Chromosomal mapping of the gene encoding

serotonin N-acetyltransferase to rat chromosome 10q32.3 and mouse chromosome 11E2. Cytogenet.Cell Genet. 79[3-4], 172-175. 1997.

- 210. Yu, Q., Miller, S. C., and Osmond, D. G. Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. J.Pineal Res. 29[2], 86-93. 2000.
- 211. Zhang, S., Li, W., Gao, Q., and Wei, T. Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. Eur.J.Pharmacol. 501[1-3], 25-30. 6-10-2004.
- 212. Zylinska, K., Komorowski, J., Robak, T., Mucha, S., and Stepien, H. Effect of gran stim J.Ne



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el tribunal en el día de la fecha, integrado por los abajo firmantes, para evaluar la tesis doctoral de D^a ARACELI GÓMEZ CORVERA titulada SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL SISTEMA NERVIOSO EN DIFERENTES MODELOS MURINOS Y DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR KNOCKOUT CONDICIONAL PARA MELATONINA, y acuerdo otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE "CUM LAUDE" POR UNANIMIDAD

Sevilla, a 9 de Julio de 2007

Vocal, M^{rs} MARTINA ROBLES

Vocal, ISABEL CERNILO

Vocal, CARMEN OSUNA

Presidente,

Secretario,
D^a C. ÚNDE AROCA

Doctorando,
ARACELI GÓMEZ CORVERA