

R. 24362

Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en
de la
de esta Universidad desde el día
hasta el día

Sevilla de
EL DIRECTOR DE

Alejandro J. Martín
El Jefe del Negociado de Tesis.

Sevilla, correspondiente al número 19 del libro
Queda registrada esta Tesis Doctoral

SECRETARÍA GENERAL
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

10 ENE 1996

RECEPTORES DE MELATONINA EN TIMO DE RATA

TESIS PRESENTADA POR D. ALEJANDRO J. MARTÍN
CACAO PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
MEDICINA. 1995

I.D.
M/213

v

D. Juan Miguel Guerrero Montávez y D. Miguel Angel López González,
Profesor Titular e Investigador Colaborador, respectivamente, del
Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad
de Medicina de la Universidad de Sevilla como codirectores,

CERTIFICAN: que el trabajo titulado **"RECEPTORES DE
MELATONINA EN TIMO DE RATA"** realizado por D.
ALEJANDRO J. MARTÍN CACAO, cumple a su juicio
con todos los requisitos necesarios para su
presentación como tesis de doctorado en Medicina.

Sevilla, Diciembre de 1995

✓
Miguel López

Fdo: J.M. Guerrero Montávez

Fdo: M.A. López González

A D. Mariano Martín
Por enseñarme a buscar el por qué.

Agradezco a los Dres. Juan Miguel Guerrero Montávez y Miguel Angel López González directores de este trabajo y al Profesor Juan Ramón Calvo y a Carmen Osuna directora del Departamento, su colaboración y orientaciones, sin las cuales no me hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A los que por acciones u omisiones soportasteis en alguna forma este trabajo: Carmen, Marta, Lola, Mariascen, Pilar, Javi, Mari Carmen, Ale, Leonor, Eu y Mohamed, muchas gracias.

ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácidos
a.C.	Antes de Cristo
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato
BC	Capacidad de unión
BSA	Seroalbúmina bovina
CD 4 ⁺	Timocito maduro cooperador
d.C.	Después de Cristo
FSH	Hormona foliculoestimulante
FTS	Factor tímico sérico
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GMPc	Guanosina 3', 5' monofosfato
Gn RH	Hormona liberadora de gonadotropina
¹²⁵ MEL	Melatonina marcada con iodo ciento venticinco o iodomelatonina
IC ₅₀	Capacidad de inhibición del cincuenta por ciento
IL	Interleucina
K _d	Constante de disociación
LD	Ciclo luz-oscuridad
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NB	Recién nacido
Px	Pinealectomizado

S	Siglo
SE	Error estandar
SGCC	Cromatografía de columna en gel de sílice
TCR	Receptores linfocitarios para antígenos
THF	Factor humoral tímico
TSH	Hormona tireotropa
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

INDICE

	Pag.
ARTÍCULOS PRESENTADOS EN LA TESIS	1
INTRODUCCIÓN	3
A) Glándula Pineal	4
1. Breve reseña histórica	4
2. Anatomía	9
3. Histología	13
4. Bioquímica	18
5. Función	22
6. Regulación	30
7. Mecanismo de acción:	
Receptores	33
B) Glándula Tímica	40
1. Anatomía	40
2. Histología	45
3. Función	53
OBJETIVOS	58
CAPÍTULO 1	61
Unión específica de la 2-[I ¹²⁵] melatonina a membranas de timo de ratas parcialmente purificadas	
1. Artículo 1	63
2. Comentario y discusión	69

	Pag.
CAPÍTULO 2	72
Unión de la 2-[I ¹²⁶] melatonina a membranas de timo de ratas durante el desarrollo postnatal	
1. Artículo 2	74
2. Comentario y discusión	79
CAPÍTULO 3	81
Variaciones diarias en la unión de la 2-[I ¹²⁵] melatonina a membranas de timo de ratas: Efectos de la exposición a la luz continua y pinealectomía.	
1. Artículo 3	83
2. Comentario y discusión	90
CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	95

ARTÍCULOS PRESENTADOS

LISTA DE ARTÍCULOS PRESENTADOS EN LA TESIS

1. M.A. López-González, A. Martín-Cacao, J.R. Calvo, R.J. Reiter, C. Osuna and J.M. Guerrero. (1993). Specific binding of 2-[¹²⁵I] melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *Journal of Neuroimmunology*, 45. Pg. 121-126.
2. A. Martín-Cacao, M.A. López-González, R.J. Reiter, J.R. Calvo and J.M. Guerrero. (1993). Binding of 2-[¹²⁵I] melatonin by rat thymus membranes during postnatal development. (1993). *Immunology Letters*, Pg. 36:59-64.
3. A. Martín-Cacao, M.A. López-González, J.R. Calvo, M. Giordano, J.M. Guerrero. (1995). Diurnal variations in 2-[¹²⁵I] melatonin binding by rat thymus membranes: Effects of continuous light exposure and pinealectomy. *Chronobiology International*. (Aceptado para publicación)

INTRODUCCIÓN

A. GLÁNDULA PINEAL

1. BREVE RESEÑA HISTÓRICA

El devenir histórico sobre las distintas concepciones acerca de la glándula pineal (Tabla I) refleja en gran parte el predominio filosófico o científico de una etapa de la medicina. (Bardasano, 1979).

TABLA I . Breve referencia histórica

Edad Antigua	(Ant. - 500 d. C.)	Los orígenes clásicos.
Edad Media .	(500 d. C. - 1453)	Período oscuro.
Edad Moderna .	Renacimiento (S.XV-XVI)	Trece siglos separan la primera descripción de la primera ilustración.
	Ilustración(S.XVII-XVIII)	Surge la intención de ubicar anatómicamente las facultades intelectuales.
	Romanticismo. (S. XIX)	Se enfatiza el estudio de la vida animal y el desarrollo comparativo .
Edad Contemporánea.	(S. XX)	Un componente del sistema neuroendocrino capaz de sintetizar y secretar varios factores

Muchos fueron los autores que con sus investigaciones avanzaron en el conocimiento de esta glándula. A continuación se referencian algunos de los mas destacados, en orden cronológico:

Herofilus (Griego, residente en Alejandría. Año 335 - 280 a.C.).

Considerado por los historiadores como el primero en examinar sistemáticamente el cerebro. Si bien directamente no nos queda constancia de ello. (Castiglioni, 1931).

Considera la glándula pineal como un esfínter valvular entre el tercer y cuarto ventrículo. (Kitay y Altschule, 1954).

Claudio Galeno (Romano, residente en Pergamo. Año 131-201 d.C.).

Se le atribuye el primer escrito acerca de la localización, forma y función de la glándula pineal. En base a ello concluye que es una glándula. (Kühn, 1964).

Berengario de Carpi (Italiano, 1460 - 1530).

En su obra *Isgage Breves*, describe el órgano pineal y le atribuye una función de filtro en el líquido cefalorraquídeo.

Jean Fernel (Francés, 1497 - 1558).

En "*Universa Medica*" (1567), continua atribuyéndole función valvular a la pineal.

Andrea Vesalius (1514 - 1564).

Suministra la primera representación de una pineal humana:

"*De Humani Corporis Fabrica, libri VII*" (Basilea 1543). Considera la pineal como una glándula.

Rene Descartes (Francés, 1596 - 1650).

En "Les Passions de L'ame", asienta el alma en el cerebro y considera la glándula pineal como la mano derecha del alma. Le atribuye una función valvular sobre el discurrir del "spiritus animalis" en el cerebro. (Adam y Tannery, 1974).

Thomas Willis (Inglés, 1621 - 1675).

Influenciado por los conceptos galénicos, criticó las teorías de Descartes, y restituyó la función glándular de la pineal.

Nicolas Claude Le Cat (Francés, 1700 - 1768).

Considera la pineal como una glándula y como tal le atribuye una función de filtro. (Le Cat, 1700).

Johan Heinrich Zedler.

En su "Diccionario enciclopédico", hace una revisión sobre el órgano pineal en 1753.

K. F. Burdack (Alemania, 1776 - 1847).

En su "On The Structure and Life of the Brain", dibuja el órgano pineal y le atribuye una atenuación de la actividad cerebral general.

Francois Magendie (Francés, 1763 - 1855) .

Revive la hipótesis valvular.

E. Reissner (Alemania, 1824 -1878) .

Hace una precisa descripción anatómica de la glándula. (E.Reissner, 1864).

A. Goette (Alemán, 1840 - 1922).

Establece relación genética entre el "Stirnorgan" de los anuros y el órgano pineal. (Goette , 1875).

Franz Von Leydig (Alemán, 1821 - 1908) .

Relaciona funcionalmente el ojo parietal de los artrópodos con el órgano pineal. (Leydig, 1868).

Albert Von Kolliker (Alemán).

Demuestra la invasión de la pineal en mamíferos. (Kolliker, 1850)

C. Foa (Italiano, 1848 - 1924).

A través de extirpaciones de glándulas pineales de gallos confirma que la secreción glandular tiene efectos gonadotróficos. (Foa, 1912).

Ludwig Edinger (Alemán, 1855-1918).

Hace una revisión y descripción anatómica comparada.
(Edinger, 1900).

Marburg (1907, 1908, 1913 y 1930).

Considera la glándula pineal como un órgano endocrino que inhibe durante la infancia la función reproductora del hipotálamo. (Marburg, 1907).

Engel (1936)

Obtiene extractos pineales que contienen una hormona antigonadotrófica: la glanepina, usada como tratamiento clínico.

Bargmann (1943).

Publica una revisión anatómica, histológica y citológica comparada, desde el pez al hombre. Aporta datos sobre la evolución filogenética de la glándula pineal, desde un órgano foto-receptor hasta una glándula.

Kelly (1968 y 1971), Pearse (1969) y Oksche (1971 y et al., 1971)

Estudian la citología de la pineal.

Lerner (1958, 1959 y 1960).

Realiza estudios bioquímicos y aisla la melatonina a partir de pineales bovinas.

Ebels (1978)

Relaciona la glándula pineal y el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal.

Fiske (1941 y 1960) y Wurtman (1961).

Describen la influencia del ritmo circadiano luz-oscuridad sobre la glándula pineal.

Quay (1963 a y b).

Estudia la fotoperiodicidad en el contenido indólico y enzimático de la glándula pineal.

Reiter y Hester (1965).

Consideran la glándula pineal como un órgano endocrino de origen neural con una función de sincronización multifuncional.

2. ANATOMÍA

Para localizar la glándula pineal (Fig. 1y2) situémonos imaginariamente por detrás y arriba de un cerebro humano. Separemos los hemisferios laterales, cada uno hacia su lado homónimo, y el cerebelo hacia abajo. Ya podemos verla entre los dos tálamos, por encima de los tubérculos cuadrigéminos anteriores, en la línea media y en el centro del cerebro. (Spalteholz 1976).

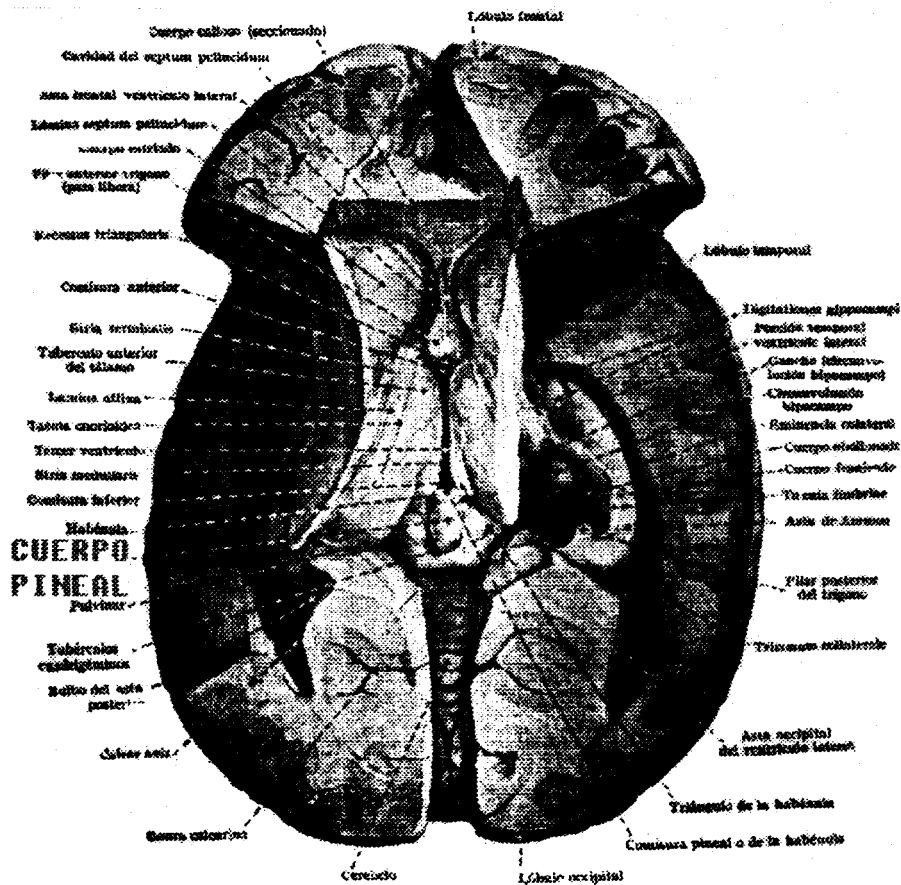


Fig.1 Visualización de la glándula pineal. Corte horizontal resecaando parte de lóbulos, cuerpo calloso y trigono. (Spalteholz, 1976).

Es como un pequeño mamelón de color gris rojizo que protrusiona desde la pared posterior del tercer ventrículo. (Kahle et al., 1977).

Su forma es cónica y algo aplanada. El diámetro transversal, tres a cinco milímetros, es menor que el anteroposterior, de cinco a ocho milímetros. Su peso es de unos cien a doscientos miligramos. (Robbins et al., 1989)

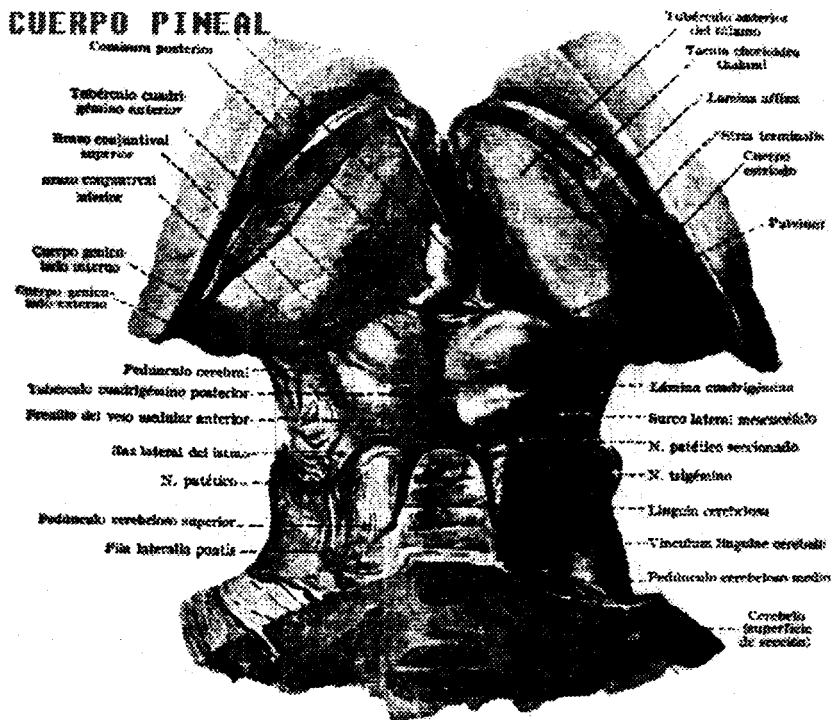


Fig. 2 Lado postero superior. La parte superior del cerebelo se ha cortado y la glándula pineal está levantada con una erina. (Spalteholz, 1976).

La glándula pineal deriva del neuroectodermo, del diencéfalo. (Fig.3).

Aparece en el embrión humano alrededor del día treinta y seis cuando mide entre siete y nueve milímetros, ya están formadas las láminas de las manos y las extremidades inferiores tienen forma de remos. Los orificios nasales son evidentes, así como las vesículas del cristalino. Al final del sexto mes están diferenciadas las células pineales intersticiales y las parenquimatosas (Moore y Persaud, 1995).

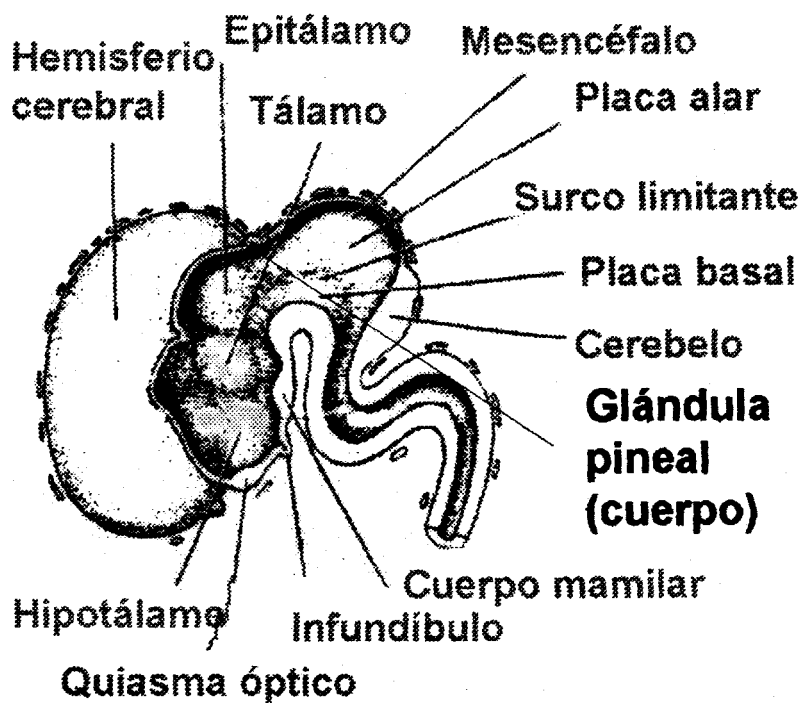


Fig. 3 Esquema de una visión lateral del cerebro, corte sagital medial, en un embrión humano al final de la séptima semana. (Moore y Persaud 1995)

El cuerpo pineal aumenta de tamaño, llegando a su máximo desarrollo a la edad de siete años. Sufre involución al comienzo de la pubertad. (Bloom y Fawcett. 1973).

Se comprueba un incremento de peso de la glándula a lo largo de la vida (Fig. 4 y 5). Este incremento es debido a un aumento en el depósito de calcio, así como a una mayor lobulación, fibrosis y gliosis. (Tapp, 1980).



Fig. 4 Detalle de resonancia magnética nuclear. Corte coronal donde se visualiza la glándula pineal de un anciano de 72 años.



Fig. 5 Detalle de resonancia magnética nuclear. Corte sagital donde se visualiza la glándula pineal de un anciano de 72 años.

3. HISTOLOGÍA

La glándula pineal se encuentra revestida por la piamadre (Bloom y Fawcett, 1973), excepto en el receso pineal (Reiter, 1988) y, por tanto, en contacto con el líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo (Hewig, 1980).

Desde la superficie, el tejido conjuntivo forma repliegues centrípetos constituyendo una malla de tejido laxo. (Fig. 6).

Por los tabiques llegan vasos y fibras nerviosas a la glándula. Los vasos forman una rica red capilar, que en el ser humano, está compuesta de capilares finos y continuos (Geneser, 1990).

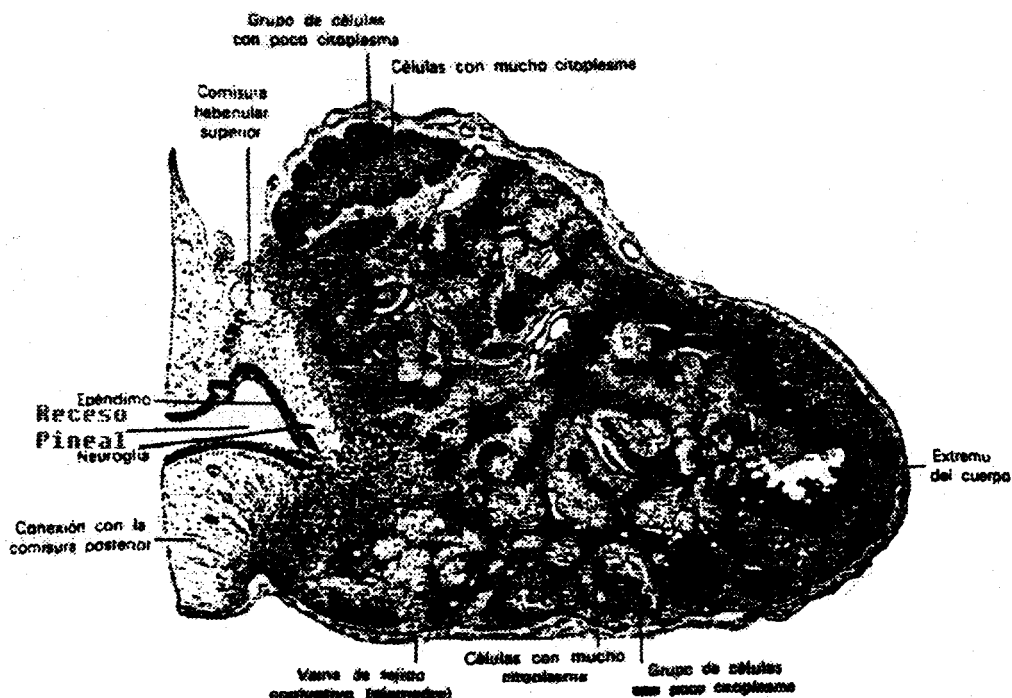


Fig. 6 Corte sagital de una glándula pineal de un niño recién nacido. (Fawcett, 1994).

La inervación de la glándula procede del ganglio cervical superior con fibras simpáticas mielinizadas postganglionares, que forman de manera bilateral los denominados nervios coronarios. Dentro del cráneo se localizan bajo la vena de Galeno y abordan la glándula por su parte posterior ramificándose como axones amielínicos (Kappers, 1960; Wiklund, 1974; y Wheeler et al., 1987). Las fibras parasimpáticas preganglionares provienen del núcleo salivar superior en la médula oblonga. Acompañan al nervio intermediario (par craneal VII) hasta el núcleo petroso mayor y de ahí a la glándula, en asociación con fibras noradrenérgicas del plexo carotídeo interno. Estas fibras preganglionares sinapsan con neuronas ganglionares en la capsula pineal o en el mismo parénquima, inervando la glándula con fibras colinérgicas posganglionares cortas (King y Steinlechner, 1985) (Fig. 7).

Los lobulillos están ocupados por células inmersas en una sustancia fundamental compuesta por glucosaminoglicanos ácidos, que se colorean

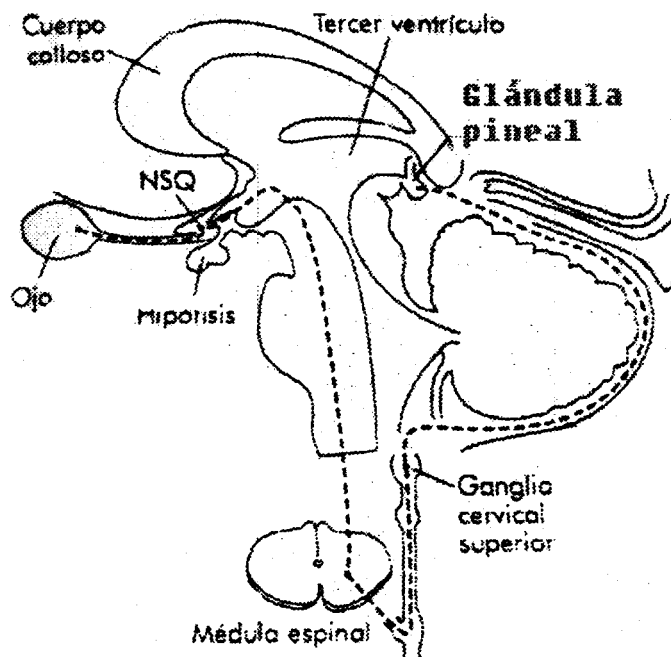


Fig. 7 Esquema de la inervación simpática pineal en un corte sagital del tallo encefálico humano. (Ganong, 1994)

con la reacción de PAS secretados por los propios pinealocitos. (Geneser, 1990).

En los lobulillos, sobrenadando cerca de la cápsula o en los tabiques, es frecuente hallar acérvulos o corpora arenácea (Leeson et al., 1989) que son cuerpos basófilos extracelulares, cuyos tamaños oscilan entre ochenta y ochocientos micrómetros (Allen et al., 1981). Están formados por aglomerados de concreciones, cada uno de los cuales consta de una matriz orgánica revestida por capas concéntricas de fosfatos cálcico y magnésico (Wheater et al., 1987). Se especula sobre un origen orgánico del núcleo. Actualmente se considera una proteína transportadora (Wheater et al., 1993) liberada durante un proceso de exocitosis. El volumen de los acérvulos aumenta con la edad, sin que este incremento se considere signo de inactivación o atrofia. Son visibles mediante tomografía axial computarizada en el ochenta por ciento de los individuos con mas de treinta años (Fawcett, 1994).

La parte central de los lobulillos esta ocupada por los pinealocitos esféricos que son neuronas altamente modificadas (Wheater et al., 1987). (Fig. 8).

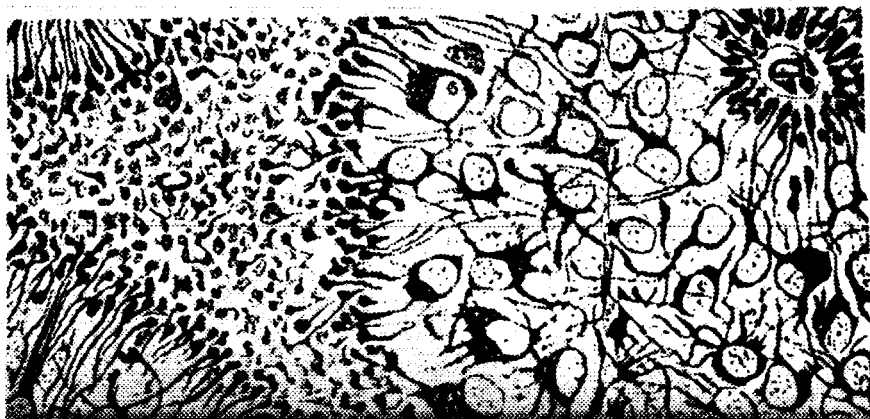


Fig. 8 Corte histológico de la pineal de un varón joven. Se pueden observar el tejido lobulillar (C) y un vaso (D) rodeado por terminaciones en maza procedentes de los pinealocitos. (Fawcett, 1994).

Constituyen el noventa y cinco por cien del total de células glandulares. Conforme su situación es más periférica, adoptan una forma elíptica (Geneser, 1990). Son células grandes y claras, con numerosas prolongaciones que terminan, sobre todo las periféricas, en forma de bulbo en contacto con los endotelios capilares. Las cortas terminan en extremos ciegos, entre las células vecinas. Entre estos pinealocitos se hallan uniones comunicantes, desmosomas y tipos intermedios de unión, (Leeson et al., 1989). El citoplasma es débilmente basófilo (Junqueira y Carneiro, 1987), tiñe poco con hematoxilina-eosina, y contiene muchos gránulos. Tienen numerosos ribosomas libres, moderada cantidad de retículo endoplasmático rugoso y escaso retículo endoplasmático liso. El aparato de Golgi se aprecia poco desarrollado, con muchas vesículas inespecíficas lisas (Geneser, 1990), otras de centro con alta densidad electrónica. (Karasek, 1983) y naturaleza protéica (Juillard, 1979). Las mitocondrias son numerosas y con largas crestas perpendiculares al eje mayor. El núcleo es redondeado, grande y granular. Presenta una superficie irregular que se tiñe de oscuro con un nucleolo prominente y heterocromatina periférica. Además, los pinealocitos contienen unas cintas sinápticas muy peculiares, constituidas por bastoncillos electrodensos de veinticinco a sesenta nanómetros de ancho por dos décimas a dos micrómetros de largo, rodeados de pequeñas vesículas electroluminiscentes de treinta a cincuenta nanómetros de diámetro que semejan las sinapsis de las terminaciones nerviosas. No son específicas, pues orgánulos semejantes se localizan en células fotorreceptoras de la retina, en el órgano de Corti y en otros órganos sensoriales. (Junqueira y Carneiro, 1987; Wheater et al., 1987; Stevens y Stevens, 1992; y Fawcett, 1994).

Los astrocitos se localizan tapizando la cápsula conectiva en su interior, en la periferia de los lobulillos y en asociación con los capilares; si

bien, también se observan algunos intercalados entre los pinealocitos. Se consideran elementos gliales, tienen una forma alargada de tipo bipolar o estrellada con largas prolongaciones que en su interior contienen muchos filamentos de cinco a seis nanómetros de diámetro. Las uniones entre células son desmosómicas. El citoplasma es más basófilo que el de los pinealocitos y a veces con prolongaciones citoplasmáticas típicas. Tienen numerosos ribosomas libres y el retículo endoplásmico rugoso está bien representado. Destaca una abundancia extraordinaria de filamentos, de cinco a seis nanómetros de diámetro y longitud indeterminada, formando grandes haces o aislados sin orientación definida. El núcleo es alargado y se colorea más intensamente que el de los pinealocitos. (Junqueira y Carneiro, 1987; Geneser, 1990; Carrascal, 1991; Stevens y Stevens, 1992; Wheater et al., 1993; Fawcett, 1994.).

Entre otras células aisladas se hallan fibroblastos, mastocitos, células plasmáticas y células musculares estriadas (Vollrath, 1981).

4. BIOQUÍMICA

La composición inorgánica de la glándula pineal, así como los constituyentes que cambian su concentración durante el ciclo luz-oscuridad se reflejan en la Tabla II.

TABLA II. Componentes inorgánicos de la glándula pineal.

Calcio*
Carbonato de apatita
Cobre
Estroncio
Hidroxi-apatita
Hierro
Manganeso
Magnesio*
Potasio*
Selenio
Sodio*
Zinc

(*) Estos elementos sufren cambios ritmicos de 24 horas.

(Adaptada de: Piechowiak y Schnizer, 1976; y Quay, 1981)

La corpora arenácea pineal está, estructural y químicamente, relacionada con los depósitos encontrados en otros tejidos del cuerpo.

Llama la atención que la concentración de selenio en la glándula es de uno a tres veces superior a la del resto del cerebro.

El ritmo de la concentración de potasio está en oposición de fase con relación a su concentración en el lóbulo anterior de la hipófisis.

Existen marcadas diferencias en relación a la cantidad y localización de estos componentes entre las distintas especies y circunstancias. (Piechowiak y Schnizer, 1976).

Entre los componentes orgánicos destacan los relacionados en la Tabla III.

El Glucógeno se encuentra a una concentración similar a la existente en cualquier glándula endocrina del organismo, pero muy diferente a la del resto del cerebro. El ácido neuramínico también se halla en elevadas concentraciones comparado con el resto del tejido cerebral. (Green et al., 1962).

Los lípidos suponen entre el tres y el diez por cien del peso seco de la glándula. Mas del cincuenta por ciento son fosfolípidos, sobre todo, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina y esfingomielina. (Quay, 1974).

La composición de aminoácidos libres es similar entre glándulas pineales de diferentes especies. Ciertos aminoácidos aromáticos disminuyen su concentración durante la noche (Nir et al., 1974). Predominan glutamina, asparagina, glicina y ácido aspartico en inmaduros, frente a ácido glutámico, triptófano, fenilalanina, lisina y leucina que aumentan con la edad. (Guroff, 1972). En los derivados de aminoácidos si se aprecian diferencias marcadas en cuanto a localización y cantidad entre especies. Tanto las concentraciones de serotonina como las de noradrenalina presentan fluctuaciones rítmicas cada veinticuatro horas. (Garbarg et al., 1974).

El nucleósido adenosina posee efectos vasodilatador local así como acción inhibitoria sobre la liberación de noradrenalina. Llama la atención la S-adenosilmetionina que llega a unas concentraciones en la glándula superiores a las de cualquier otra parte del organismo. (Quay, 1981).

La 3'-5' adenosina monofosfato cíclico que intervine como segundo mensajero en la acción noradrenérgica mantiene un ritmo con deflexiones máximas a las diez horas del inicio del período luminoso y mínimas a las diez horas de oscuridad (Quay, 1981). En relación a los ácidos nucleicos, destacar la constancia en la concentración de ácido dexosirribonucleico frente a la variación en el ácido ribonucleico, tanto a través del proceso de maduración como dentro de un ciclo luz-oscuridad. (Zatz et al., 1976).

Según la naturaleza de sus efectos catalíticos, las enzimas halladas en la glándula las podemos agrupar en cinco categorías: Oxirreductasas, transferasas, entre las que destaca la serotonina - N - acetiltransferasa, paso limitante en la vía de serotonina a sus metoxiderivados; liasas, isomerasas e hidrolasas. Los altos niveles de adenilatociclase oscilan rítmicamente cada veinticuatro horas (Quay, 1981).

Entre las coenzimas halladas en la glándula destacan Q-ubiquinona (Fabre et al., 1965) y una pteridina pineal semejante a la 6-L-eritrobiopterina (Ebels et al., 1979).

TABLA III. Constituyentes orgánicos que destacan por su concentración alta en la glándula pineal

Glucógeno
Acido neuramínico
Fosfolípidos
Taurina
Acido glutámico
Glicina
Glutamina
Alanina
Noradrenalina
Serotonina
S-adenosilmetionina
Hidroxindol-O-metiltransferasa
Adenilatociclasa
D-glucosa - 6 - fosfatocetol - isomerasa

(Adaptado de: Green et al., 1962; Guroff, 1972; Garbarg et al., 1974; Nir et al., 1974; Quay, 1974; Zatz et al., 1976; Greenberg y Weiss, 1978; Wanieswski y Suria, 1978; y Quay, 1981)

5.- FUNCIÓN

Es difícil imaginar como pudo pasar inadvertida la idea de que tanto las reacciones moleculares como la vida celular, originadas bajo las condiciones indispensables y siempre presentes de ciclos solares, lunares, con sus variaciones periódicas y estacionales de luz y temperatura influyeran en el origen de la biología reproductiva, la integridad individual y el mantenimiento de éstas.

Actualmente se considera a la glándula pineal como parte del sistema de biogeneradores rítmicos centrales (Arendt, 1985a). Los organismos poseen sistemas de captación de las condiciones medioambientales que los rodean. La glándula pineal actúa como un "regulador de reguladores", traduciendo constantemente una gran variedad de estímulos, tanto externos (luz, temperatura, ferhormonas, humedad, antígenos, magnetismo, etc) como internos (estímulos psicógenos, autoantígenos, células cancerosas) en cambios neuroendocrinos. Esto permite un ajuste permanente del organismo a los requerimientos básicos, tales como la función cíclica gonadal, compensación y neutralización de un estímulo psicógeno, y finalmente una apropiada optimización de la reactividad a antígenos y agentes infecciosos (Pierpaoli y Maestroni, 1987). A través del tiempo, y mediante mecanismos actualmente no dilucidados, los seres organizan ritmos endógenos autosostenidos tales que en ausencia del estímulo originario se comportan como ante su presencia (Moore-Ede et al., 1983).

Las observaciones de los ritmos biológicos humanos conducen a la hipotética existencia de al menos tres osciladores endógenos: Uno en el núcleo supraquiasmático hipotalámico, que originaría ritmos de actividad, vigilia-sueño, descanso y acciones con él relacionadas. Otro estaría en relación con la temperatura corporal y las fases del sueño y un tercero en

relación con la memoria y los actos automáticos (Folkard et al., 1983). Los ritmos circanuales son más difíciles de estudiar que los circadianos y ultradianos. Hay razones para creer que la glándula pineal tiene influencia en los ritmos circadianos y ultradianos, a través de la modulación pulsátil de hormonas y la facilitación de ciertas actividades neurales (Arendt, 1985a).

La pineal es probablemente la glándula evolutiva en el curso de la ontogenia neuroendocrina cuya maduración y función condiciona y promueve la organización final del sistema hipotálamo-hipofisis-gonadoadrenal (Pierpaoli y Maestroni, 1987).

Los primeros estudios funcionales de la glándula pineal se enfocaron en relación con la maduración de las gónadas. Se describió un significativo incremento de los niveles de excreción de 6-hidroximelatonina en orina coincidente con los primeros signos de pubertad en ambos sexos. En chicos prepúberes la elevación de melatonina en suero coincide con una elevación de hormona luteinizante. En chicas la elevación coincide con la menarquia. Estudios de seguimiento en mujeres adultas fértiles, el mayor aumento ocurre en el sangrado menstrual y los niveles más bajos coinciden con la oleada de liberación de hormona luteinizante a mitad del ciclo. Con los estudios existentes no podemos atribuirle un papel definitorio a la glándula pineal en relación con la función gonadal, salvo el de modulador que a veces inhibe y otras estimula. (Preslock, 1984).

La glándula pineal participa en el desarrollo del sistema inmune. La hipófisis inicia el proceso y a través de la glándula organiza el timo, y éste a su vez, la respuesta inmune. La privación de la glándula pineal durante la vida neonatal conduce a una depresión de la actividad y a alteraciones en la arquitectura tímica (Cardarelli, 1990). En el transcurso de la existencia, la melatonina, principal hormona sintetizada y liberada por la glándula pineal, actúa como un potente inmunoregulador capaz de contrarrestar los efectos

inmunosupresores del estrés, tanto psicológico como infeccioso. Estas acciones las ejerce indirectamente a través del sistema opioide endógeno afectando la síntesis y/o el nivel de péptidos opioides que se unen a los receptores κ o μ de células inmunocompetentes (Maestroni y Pierpaoli, 1981). La idea de que el eje glándula pineal-melatonina-sistema opioide endógeno influye en la hemopoyesis de la médula osea a través de la producción endógena y liberación de factores con funciones reguladoras básicas en inmunidad y homeostasis tisular es muy factible, pero los resultados actuales son todavía contradictorios (Pierpaoli et al., 1987; y Vaughan et al., 1987). La actividad oncostática y antiproliferativa de la melatonina ha sido ampliamente estudiada (Blask, 1984; y Regelson y Pierpaoli, 1987). Combinando estos efectos con la actividad sobre la hematopoyesis en la médula osea se nos sugiere un importante nexo entre la función pineal, medular y los mecanismos antiproliferativos. Se estudia el papel de la glándula pineal en los fenómenos de tolerancia inmune durante la ontogenia (Maestroni y Pierpaoli, 1981), y los cambios en la glándula durante el embarazo y la regulación temporal de la histocompatibilidad madre- feto (Reiter, 1978). La concurrencia entre el timo-sistema inmune y el envejecimiento por un lado, y la pineal-crono biológico por otro, desvelan una teoría sobre el emvejecimiento inmune. En la cima se encuentra el oscilador hipotalámico que a través de la pineal hace la función tímica. Así el *primun movens* del envejecimiento podemos situarlos en los parámetros endógenos y/o exógenos que cargan el crono en el hombre y presumiblemente en todas las especies multicelulares (Cardarelli, 1990).

La glándula pineal ejerce su influencia mediante la liberación pulsatil de hormonas y la síntesis o captación, concentración y liberación de péptidos e indolalquilaminas, con acciones neuroendocrinas, tanto locales como a distancia.

La síntesis de noradrenalina comienza al captar el pinealocito, de forma activa, L-tiroxina. Esta pasa a los axones noradrenérgicos donde sufre hidroxilación, considerada paso limitante, y finaliza con la betahidroxilación de la dopamina, en los gránulos densos de las terminaciones nerviosas noradrenérgicas. Probablemente la producción de pequeñas cantidades es espontánea, mientras que la estimulación nerviosa libera grandes cantidades. Su unión a los betareceptores adrenérgicos provoca un aumento de la actividad de la adenilatociclase (King y Steinlechner, 1985). Tanto la producción de noradrenalina como el número de receptores beta, varían a lo largo del ciclo luz-oscuridad en las veinticuatro horas, aquella, con un máximo nocturno y un número máximo de receptores al final del periodo lumínico (Craft et al., 1984).

La captación de L-triptófano por el pinealocito a través de transporte activo está regulada por receptores noradrenérgicos. Sus niveles en la glándula tienen un pico al final del periodo de luz y una disminución en el periodo oscuro, en desfase con el triptófano circulante (Sugden, 1979).

La síntesis de serotonina comienza en la mitocondria con la hidroxilación del triptófano, a través de la activación regulada por el receptor betadrenérgico mediante monofosfato cíclico de adenosina. Después, ya en el citoplasma, se descarboxila. Las concentraciones de serotonina se mantienen, en pineal de rata, a un ritmo bien definido de veinticuatro horas; con picos diurnos y depresiones nocturnas (Fig. 9). La serotonina se localiza en la glándula tanto en los pinealocitos como en las terminaciones adrenérgicas, llegando a unas concentraciones superiores a las de cualquier otro tejido. (Lorenberg et al., 1962; Romijn et al., 1977; y King et al., 1984).

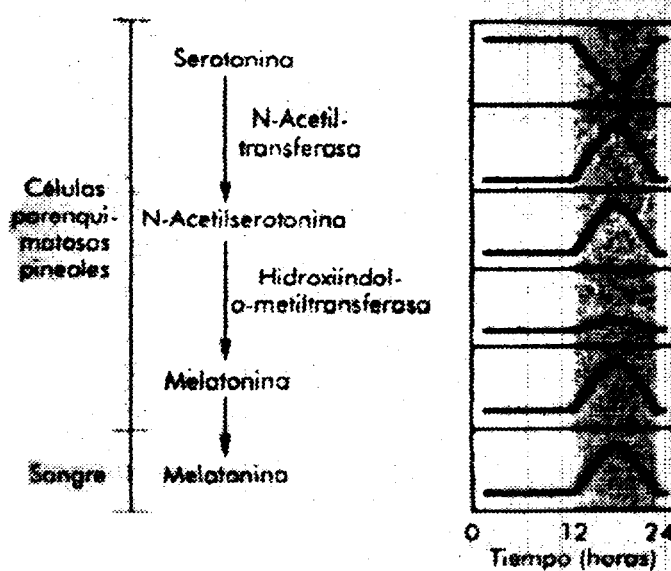


Fig. 9 Ritmo circadiano de la concentración intrapineal de varias sustancias y del nivel de melatonina en sangre. (Ganong, 1994).

En el citosol de los pinealocitos, no así en las terminaciones nerviosas, se encuentran las enzimas N-acetiltransferasa e hidroxindol-0-metiltransferasa. Aquí comienza la síntesis de la melatonina. (Tabla IV). La N-acetilación de la serotonina se considera paso limitante en la síntesis de la hormona. La actividad de esta enzima está regulada por los receptores betadrenérgicos a través del monofosfato cíclico de adenosina. La hidroxindol -0- metiltransferasa es igualmente regulada por estímulos noradrenérgicos pero a través del monofosfato cíclico de guanosina. Las concentraciones de ambas enzimas mantienen un ritmo cíclico de veinticuatro horas. La melatonina se encuentra a concentraciones relativamente bajas en la glándula pineal. Suponemos que la liberación

desde el pinealocito se efectúa por difusión simple debido a su liposolubilidad y a que no se ha descrito ningún tipo de transporte activo. (Deguchi y Axelrod, 1972; Varghan, 1981; y Sugden y Klein, 1983).

TABLA IV Bioquímica y metabolismo de la melatonina.

Identificación	N-acetil-5-metoxitriptamina	Lerner et al., 1959
Síntesis	Glándula pineal. Otros lugares: retina, intestino delgado, glándula Harderiana	Reiter et al., 1978
Liberación	Difusión simple (?). Al sistema vascular y al líquido cefalorraquídeo	Rollag et al., 1978 Reppert et al., 1980
Vida media	Circulante de 20 minutos	Arendt, 1985b
Localización	Se aísla en plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, saliva y líquido folicular	(*)
Metabolismo	En hígado Parcialmente en tejido nervioso	Kopin et al., 1961 Hirata et al., 1974
Excreción	Renal. En orina se aísla hasta 1% intacta Parcialmente en heces	Kveder y Mc. Isaac, 1961 Jones et al., 1969

(*) Reppert et al., 1980; Miles et al., 1985a y 1985b; Vakkuri, 1985; Brzezinski et al., 1987; y Sizonenko y Lang, 1988).

La glándula pineal capta péptidos naturales. De los homogenados de la glándula se aíslan los relacionados en la Tabla V. Aunque aún quedan por determinar la especificidad y la posibilidad de síntesis *in situ*.

La arginina-vasitocina se sintetiza en la glándula pineal (Pavel et al., 1979) y es liberada al líquido cefalorraquídeo, actuando la melatonina como su factor liberador. Tiene un efecto antigonadotrófico periférico (Vaughan et al., 1980).

TABLA V. Péptidos identificados en extractos de glándula pineal.

Hormona estimulante de los melanocitos	Captado por pinealocitos
Arginina-vasitocina	Sintetizada en glándula pineal
Factor de crecimiento neural	No medido químicamente
Hormona liberadora de gonadotropina	
Hormona liberadora de la h. luterinizante	Captado por pinealocitos
Lisina-vasitocina	No medido químicamente
Metionina-encefalina	Captado por pinealocitos
Factor inhibidor de los melanocitos	Captado por pinealocitos
Neurofisina I y II	
Oxitocina	
Péptido inductor del sueño delta	No medido químicamente
Proteína acídica fibrilar glial	No medido químicamente
Proteína acídica fibrilar glial	No medido químicamente
Somatostatina	Captada por pinealocitos
Sustancia P	
Hormona liberadora de tirotrópina	Captada por pinealocitos

(Basada en: Pavel et al., 1979; y Vaughan et al., 1980).

6. REGULACIÓN

Edad. La amplitud de la producción de melatonina disminuye con la edad, al menos la que se pueda aislar en plasma (Smith et al., 1978) y líquido cefalorraquídeo (Iguchi et al., 1982).

Temperatura. En ratas expuestas a treinta y tres grados centígrados de temperatura ambiente durante veinticuatro horas, día y noche, se obtiene una disminución de la actividad de la hidroxindol-0-metiltransferasa y de la N-acetiltransferasa y, por ende, de melatonina (Nir y Hirschmann, 1978). En tortugas, se obtiene una relación entre niveles de melatonina sérica y temperatura ambiente. Animales mantenidos a treinta y un grados centígrados, tienen unos niveles circulantes superiores a los mantenidos a veintitrés grados centígrados (Owens y Gern, 1981). Una disminución de la temperatura provoca un descenso en los niveles plasmáticos de melatonina llegando a suprimir el ritmo día-noche. Se sugiere, que al menos en los reptiles, los indoles estarían implicados en la transducción de la información térmica (Vivien-Roels y Arent, 1981; y Vivien-Roels y Pevet, 1983).

Estrés. El ejercicio físico sostenido incrementa los niveles de melatonina plasmática en los humanos (Claustrat et al., 1981).

Luz-oscuridad. La capacidad de la glándula pineal, para actuar como un órgano transductor fotoneuroendocrino, siguió a la observación de que la síntesis de melatonina se produce en la oscuridad y no en la luz (Axelrod, 1974). Es un rasgo único en dicha glándula. La percepción comienza en la retina, desde donde parten fibras retinohipotalámicas que hacen sinapsis en los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos, y se proyectan a la columna gris intermediolateral de la médula espinal. Las fibras de las neuronas preganglionares pasan de la médula al ganglio cervical superior, y las fibras postganglionares forman parte de los nervios coronarios. En oscuridad, la

noradrenalina sintetizada en la glándula, interactúa con los receptores betadrenérgicos que elevan la concentración de monofosfato cíclico de adenosina intracelular, aumentando la actividad de la triptofano hidrolasa, N-acetiltransferasa e hidroxindol-O-metiltransferasa. La luz captada en la retina inhibe la liberación de noradrenalina y la síntesis hormonal, de forma rápida, aún siendo la iluminación de duración muy corta (Illnerova y Vanecek, 1982). La intensidad de luz requerida varía considerablemente entre especies y con la historia lumínica previa del individuo. En el hombre oscila entre ciento cincuenta y doscientos microvatios por centímetro cuadrado, aproximadamente dos mil quinientos lux. En relación a la longitud de onda, es el rango azul el de inhibición máxima (509 nm). La ceguera causa un ritmo de melatonina plasmático de fase libre con un período ligeramente mayor de veinticuatro horas. Los individuos que viven bajo luz artificial permanentemente o en zonas con quinientos lux de iluminación corren igual suerte. (Lynch et al., 1978; Lewy et al., 1980; y Reiter et al., 1983).

Esteroides. En ovejas, se obtiene una amplitud de la secreción de melatonina tras la ovariectomía, pero solo de forma temporal, durante cuatro meses; pasando entonces a cifras semejantes a los controles (Arendt et al., 1983).

Melatonina. La melatonina exógena no parece afectar la amplitud en la fase de secreción de la endógena, si bien la pineal tiene receptores para melatonina (Cardinali et al., 1981 y Kennaway et al., 1982).

Fármacos. Los fármacos que influyen en la regulación de la glándula pineal se relacionan en la tabla VI.

TABLA VI. Regulación farmacológica de la glándula pineal humana

Agonistas adrenérgicos	>	Estimulan la producción diurna con un retraso de 1-2 h. (*)	Klein, 1979
Antagonistas betadrenérgicos	#	Suprimen la liberación nocturna	Cowen et al., 1983
Agonistas alfadrenérgicos	=	Potencian la estimulación o inhibición inducida por los betaagonistas o antagonistas	Deguchi y Axelrod, 1972
Endorfina	>	Estimula la liberación	Claustrat et al., 1981
Inhibidor de aminoácido descarboxilasa	#	Suprime el incremento de liberación nocturna (*)	Arendt et al., 1981
Inhibidor de la captación de noradrenalina	>	Incrementa la amplitud del ritmo de liberación de melatonina en 24 h.	Thompson et al., 1983
Anticolinérgico		No tiene efectos sobre el nivel plasmático de melatonina	Vaughan et al., 1976
Metanfetamina	<	Acorta el período nocturno de niveles altos. (*)	Vaughan et al., 1976
Neuroléptico	>	Inhibe la 6-hidroxilación manteniendo niveles altos durante el día	Smith et al., 1979
5-hidroxitriptófano	>	Aumenta la liberación de melatonina sérica (**)	Namboodiri et al., 1983

(*) Descrito en ratas.

(**) Descrito en ovejas.

7. MECANISMO DE ACCIÓN: RECEPTORES

En apartados anteriores se ha expuesto como consideramos en la actualidad el funcionamiento de la glándula pineal como un transductor de una gran variedad de estímulos externos medio ambientales (Arendt, 1988). Con ellos, elabora un conjunto de señales que informan o adaptan fisiológicamente al organismo. Al menos, una de éstas, la melatonina, se acopla en unas determinadas estructuras de células dianas: los receptores de melatonina. ¿Dónde se localizan?, ¿que estructura tienen? y ¿como funcionan?; son algunas de las cuestiones que en la actualidad se intentan responder. Antes de poder describir su composición y fisiología, hubo que estudiar técnicas que permitieran su localización. Los primeros trabajos buscaban cambios intracelulares debidos a la acción de la melatonina. A mediados de los años setenta, se conoció que la incubación de leucocitos circulantes humanos con melatonina incrementaba en ocho veces o más la concentración intracelular de monofosfato cíclico de guanosina (Sandler et al., 1975). Las consecuencias de un incremento intralinfocitario de monofosfato cíclico de guanosina suponen un incremento en la producción de anticuerpos y en los neutrófilos estimula la liberación de enzimas lisosómicos y la quimiotaxis. En los monocitos tiene un efecto contrario, inhibiendo la quimiotaxis (Genta y Hill, 1976). En esta línea se observaron incrementos máximos dobles o triples de la actividad intracelular de la guanilatociclasa al incubar células de diferentes tejidos en concentraciones de melatonina nanomolar. Así ocurrió con células de adenohipófisis, tiroides, testículos, ovarios, intestino delgado e hígado. En este último, se apreció estimulación enzimática con concentraciones de melatonina del orden picomolar (Vesely, 1980). Otros autores estudiaron el efecto de la incubación con melatonina sobre células inmunes (Pierpaoli y Maestroni, 1987; y

Maestroni et al., 1988), células neoplásicas (Blask y Hill, 1986; Kothari, 1987; y Hill y Blask, 1988) y ováricas (Webley et al., 1988).

En 1978 Cohen y colaboradores plantearon una nueva forma de localizar receptores de melatonina en diferentes tejidos empleando como ligando melatonina marcada con tritio. Consiguieron uniones específicas en ovarios de hamster sirios (Tabla VII), ratas Sprague-Dawley, y humanos. Posteriormente en uteros, ojos, hígados, piel, testículos y tiroides de rata y hamster. En otros tejidos y homogenados de cerebro total, la unión de melatonina tritiada no fué perceptible. Una de las características de este ligando es su baja actividad específica.

Con una técnica semejante, un año después, se publicaba la unión específica de melatonina tritiada a preparaciones de membranas crudas en diferentes regiones del cerebro bovino (Cardinali et al., 1979). En éste estudio se incluyó la unión diferencial a distintos componentes intracelulares, siendo máxima en la fracción mitocondrial (sesenta y siete por ciento), mínima en la fracción microsomal (quince por ciento) y ligeramente mayor en la nuclear (dieciocho por ciento). Otros investigadores han hecho estudios de unión comparativos, entre fracciones de membrana y citosol en cerebros; células del hipocampo de ratas y células del striatum bovino (Niles et al., 1987). El análisis Scatchard de las uniones reveló una única población de receptores siendo de afinidad similar, ligeramente superior en las fracciones de membrana, y con una capacidad de unión ocho veces superior en éstas, en relación a la fracción de citosol. En 1980, se estudió la unión de melatonina a preparaciones de membranas crudas de glándula pineal bovina. El estudio fué comparativo entre las fracciones de sedimento nuclear crudo, mitocondrial, y microsomal. Las uniones se distribuyeron en un cincuenta por ciento en la fracción mitocondrial, un treinta y nueve por ciento

TABLA VII. Receptores de Melatonina localizados con melatonina tritiada.

Tejidos	Tipos de receptores por análisis de Scatchard	Concentración de receptores	Inhibición de la unión por competición	Factores que disminuyen la unión	Autores
Ovario de hamster	Dos: K= 0,55 micromolar K= 6,3 nanómolar	250 fmol/mg proteínas 650 fmol/mg proteínas	Melatonina nativa 6-fluoromelatonina 5-metoxindol Serotonina 5- metoxitriptamina	Concentraciones crecientes de cationes: Na, K, Mg,Ca	Cohen et al. 1978
Cerebro hipotálamo medio bovino	Uno: K=12 nanómolar	8 fmol/mg proteínas 14 fmol/mg proteínas	Melatonina nativa 5-metoxitriptofol ac.5-metoxindol acético Serotonina 5-hidroxitriptofol 5-metoxitriptamina N- acetilserotonina Triptamina 2-metilindol 5-hidroxitriptófano ac.5-hidroxiindolacético 6-hidroxi melatonina Indometacina	Incubación con tripsina ClK 10 mM ClNa 120 mM Cl ₂ Mg>1.25mM	Cardinali et al., 1979
Cerebro hipocampo de rata	Uno: K= 15 nanomolar	1.312 fmol/mg proteínas	Noradrenalina Serotonina Dopamina Melatonina 5-metoxitriptofol N-acetil serotonina 5-metoxitriptamina		Niles et al., 1987
Cerebro pineal bovina.	Uno: K = 700 nanomolar	270 ± 85 fmol/mg proteínas	6-hidroxi melatonina 5-hidroxitriptófano ac.5-metoxindolacético ac. 5-hidroxiindolacético Triptamina 5-metoxitriptofol 5-meoxitriptamina 2-metilindol Serotonina N- acetilserotonina	Incubación con tripsina y adición de iones mono o divalentes a la incubación.	Vacas y Cardinali 1980.

en la nuclear y un once por ciento en la microsomal. La unión específica era termolábil y dependiente del pH con un máximo observado a pH fisiológico (Vacas y Cardilali, 1980).

La melatonina radioiodada (Vakkuri et al., 1984a) supuso una mejora técnica en la localización de receptores melatonínicos. Comparada con la melatonina tritiada la radioiodomelatonina tiene aproximadamente cien veces más de actividad específica que aquella y su obtención es mas simple. En relación con la melatonina nativa su peso molecular es superior en algo mas de la mitad. El átomo de iodo está incluido en el carbono C-2 del anillo indólico como mostraron los creadores de ésta técnica (Vakkuri et al., 1984b) por espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética y confirmaron Niles y colaboradores en 1987. No obstante, su peso molecular, no conlleva cambios en su estructura espacial ni en su especificidad antigénica (Vakkuri et al., 1984a; y Weaver et al., 1988).

Mediante la melatonina radioiodada como ligando, se han puesto de manifiesto las uniones tras exposición a placas de rayos-X contituyendo la autoradiografía. Con ésta técnica diversos autores han revelado los diferentes sitios de unión de la melatonina en distintas regiones cerebrales. Dubokovich y Takahashi (1987) estudiaron los sitios de unión de melatonina radioiodada en membranas de retina de pollo en forma comparada. Las afinidades de la melatonina radioiodada y sus análogos estaban estrechamente relacionadas con sus potencias de inhibición de la liberación de dopamina, indicando una asociación entre los sitios de unión y la respuesta funcional regulada por melatonina. Este mismo autor (Dubocovich, 1988a y 1988b) estudio el antagonista del receptor de melatonina luzindole (2-benzil-N-acetilriptamina) así como las características farmacológicas de los receptores.

Las variaciones circadianas de los receptores fueron estudiadas en las membranas de cerebro total de ratas por Zisapel y colaboradores (1988). La afinidad de los receptores no varió significativamente durante el ciclo luz-oscuridad, pero la capacidad de unión aumentó progresivamente durante el periodo lumínico, con un máximo al final del mismo, seguido de una caída brusca desde el comienzo del período oscuro hasta su final.

La influencia de la testosterona circulante sobre los receptores de melatonina en membranas de diferentes regiones del cerebro de ratas, fue estudiada en un trabajo comparativo entre ratas orquidectomizadas y controles. El número de receptores fue el doble en los controles que en las ratas castradas. El tratamiento con estradiol no afectó la densidad de receptores en las ratas castradas y sin embargo la administración de melatonina los revirtió significativamente (Zisapel y Anis, 1988). Este mismo autor, Nava Zisapel (1988), estudió el potente antagonista de la melatonina ML-23 N-[(3,5-dinitrofenil)-5- metoxitriptamina].

La presencia de receptores de melatonina a nivel periférico la hemos constatado en glándula Harderiana de rata (López-González et al., 1991), en células sanguíneas humanas: linfocitos (López-González et al., 1992a) y neutrófilos (López-González et al., 1993), así como su relación con segundos mensajeros. (López-González et al., 1992b, 1992c). También lo estudiamos en esplenocitos de rata (Rafii-El-Idrissi et al., 1995).

En relación con la ontogénesis los receptores de melatonina, fueron estudiados en membranas de eminencia media e hipófisis de ratas Wistar. En la hipófisis del veinteaño día de vida fetal y en la eminencia media del segundo día de vida postnatal, ya se apreciaron uniones específicas de melatonina radioiodadas. La afinidad de los receptores fue similar en la eminencia media y en la hipófisis, de machos y hembras, y no sufrieron

cambios significativos a lo largo del desarrollo. La concentración de receptores en la hipófisis era mayor en fetos de veinte días y gradualmente disminuyó en el curso de la vida postnatal. En machos de veintinueve días de vida postnatal era inferior del diez por ciento de su valor en fetos. También, en ratas hembras, la densidad de receptores disminuía durante el desarrollo postnatal, siendo cinco veces mayor en el séptimo día de edad que en el veintiuno. En eminencia media el número de receptores se disminuyó con el desarrollo postnatal (Vanecek, 1988a).

Las modificaciones de sitios de unión frente a la duración del ciclo luz-oscuridad fue estudiada en membranas de eminencia media e hipófisis de hamster Golden machos adultos. Los hamsters mantenidos durante cuarenta y nueve días en ciclos cortos de luz presentaron una densidad de receptores constantes en eminencia media, y aumentó ligeramente en adenohipófisis. Tras ciento veintiseis días en ciclos cortos de luz, se apreció un marcado descenso en el número de receptores de ambas estructuras. Combinando un descenso de temperatura con ciclos cortos de luz, ya a los setenta y siete días se observó un marcado descenso en la densidad de receptores en ambas estructuras (Vanecek y Jansky, 1989).

En otro estudio de unión de melatonina a receptores del núcleo supraquiasmático de rata mediante autoradiografía cuantitativa, se observó que una hora después del comienzo de luz se encontró una única población de receptores con una $K_d = 40$ pM y una unión máxima de 12 fmol/mg proteína, y sin embargo tras once horas de luz se apreciaron dos poblaciones receptores: una de alta afinidad con $K_d = 37$ pM y unión máxima de 7 fmol/mg proteína, y otra de baja afinidad con una $K_d = 51$ nM y una unión máxima de 237 fmol/mg proteína (Laitinen et al., 1989).

El peso molecular de los receptores de melatonina, así como su relación con la proteína que une los nucleótidos de guanina, fue estudiada

en membranas de cerebro total de lagartija (por ser este animal donde se aisló un mayor número de sitios de unión de entre mamíferos, aves, reptiles y anfibios en experiencias previas). El análisis de Scatchard indicó la existencia de dos poblaciones de receptores: unos con alta afinidad, $K_d = 23$ pM y una unión máxima de 82 fmol/mg proteína, y otra de baja afinidad con una $K_d = 206$ pM y una unión máxima de 118 fmol/mg proteína. La solubilización y separación de los complejos ligando-receptor produjo dos picos; uno con un peso molecular mayor de cuatrocientos mil daltons, correspondiente al complejo ligando-receptor unido a proteína G, y otro pico, con un peso aproximado de ciento diez mil daltons, que correspondía a los receptores de melatonina (Duncan et al., 1989).

Se han realizado estudios de competición mediante densidad óptica de placas autorradiográficas en cerebros humanos. El análisis de imágenes de las secciones hipotalámicas humanas dieron curvas de competición monofásicas. Los valores de inhibición de la mitad del máximo en el núcleo supraquiasmático, fueron de ciento cincuenta picomoles en los adultos, y de ciento diez picomoles en los fetos. La 6-cloromelatonina, agonista de la melatonina, desplazó completamente a la melatonina radioiodada de sus uniones en el núcleo supraquiasmático, no así la serotonina que lo hizo en un treinta y tres por ciento, o la noradrenalina en un veintiuno por ciento (Reppert et al., 1988).

B. GLÁNDULA TÍMICA

1. ANATOMÍA

El timo se encuentra situado debajo del esternón en el mediastino anterosuperior (Fig. 10 y 11). Descansa sobre la vena cava superior, el cayado aórtico y sus ramas, así como los troncos venosos braquicefalicos. Está formado por dos lóbulos asimétricos, con forma oblonga y aplanados. (Spalteholz, 1976). Tiene un color gris rojizo. Al nacer pesa entre 15 y 20 gramos. (Robbins et al., 1989), hasta alcanzar un peso de unos 30 gramos.

Ambos lóbulos están unidos entre si por un tejido conjuntivo laxo; las conexiones con los órganos que le rodean son laxas en su cara anterior y recias en el resto de su extensión (Spalteholz, 1976).

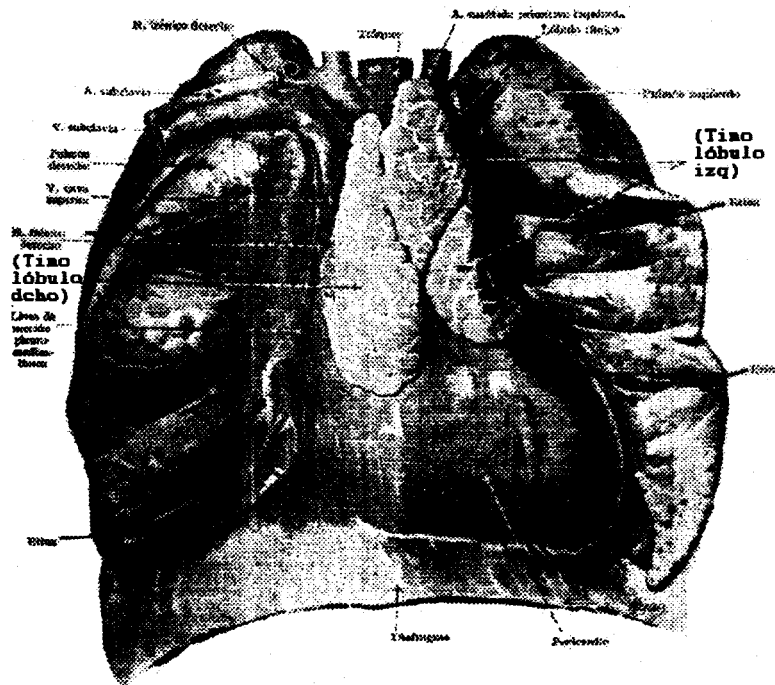


Fig. 10 Vista anterior. Los pulmones se han separado lateralmente mediante erinas. Timo de un joven de 12 años. (Spalteholz, 1976)

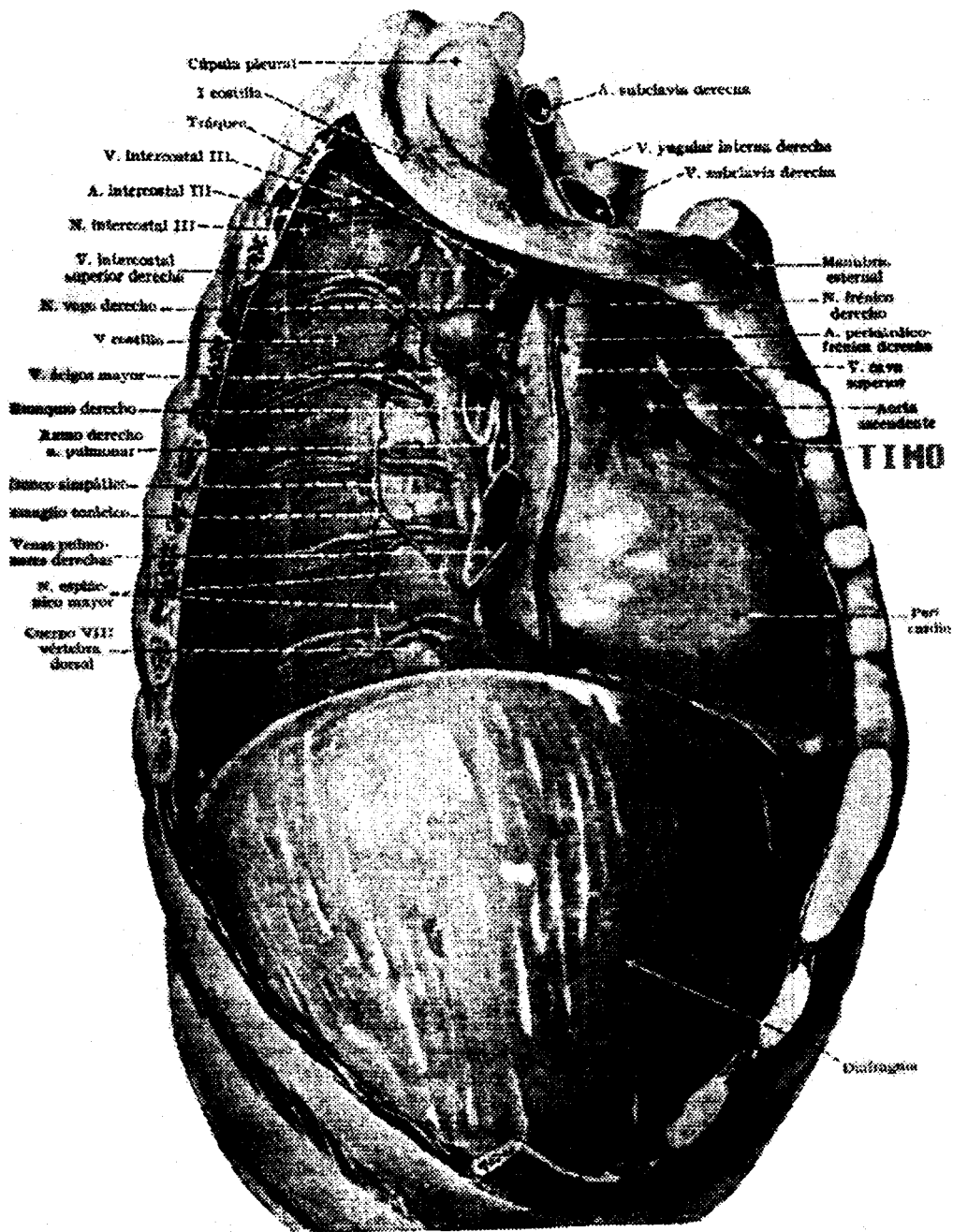


Fig 11 Vista lateral derecha del timo, previa separación del pulmón y la pleura (Spalteholz, 1976).

El timo tiene un origen embriológico doble, por un lado, los linfocitos de origen mesenquimal, y por otro, las células epiteliales endodérmicas. Los linfocitos procedentes de los islotes sanguíneos del saco vitelino y del tejido hematopoyético del hígado, invaden el esbozo epitelial endodérmico, de la tercera bolsa faríngea (Carrascal, 1991). La entrada de progenitores linfoides en el timo es escasa, se producen en dos o tres oleadas durante el periodo embrionario. A partir de la octava-novena semana de gestación la malla epitelial del timo se halla poblada. Al tercer mes de gestación está completamente desarrollado y continúa creciendo. Después del nacimiento las células formadoras de linfocitos provienen exclusivamente de la médula ósea (Farreras y Rozman, 1988).

La involución del timo implica dos procesos distintos, la sustitución grasa y la depleción linfocitaria (Fig.13) que parecen suceder independientemente y según una cronología distinta.

Corpúsculos de Hassall en la médula



Tejido adiposo

Fig. 13 Corte histológico de timo senil. Se puede apreciar su desaparición de la lobulación típica, la infiltración grasa así como la abundancia de corpúsculos de Hassall. (Welsch. 1995).

Los adipocitos hacen su aparición con el nacimiento, su número aumenta lentamente hasta la pubertad y a partir de entonces la infiltración adiposa progresa con gran rapidez. Al principio sucede en los septos interlobulillares y luego se extiende a la corteza y médula. Se origina a partir de precursores en el tejido conjuntivo interlobulillar (Fawcett, 1994). El número de linfocitos comienza a disminuir desde el primer año de vida y continúa a un ritmo constante. A pesar de la involución el timo adulto continúa funcionando, y cuando sus células son estimuladas, reaccionan aumentando la producción de linfocitos. (Carrascal, 1991).

Los cordones de células epiteliales persisten y siguen secretando hormonas químicas a lo largo de la vida (Burkitt et al., 1993). En la vejez, (Fig. 14) el timo consiste en una estructura fibroadiposa de unos 15 a 20 gramos., con pequeños islotes de células reticulares, corpúsculos de Hassall y algunos linfocitos (Carrascal, 1991).

En el nacimiento el órgano no muestra diferencia sexual alguna. Mas tarde es en la mujer, por término medio, algo mas ligero que en el hombre (Spalteholz, 1976).

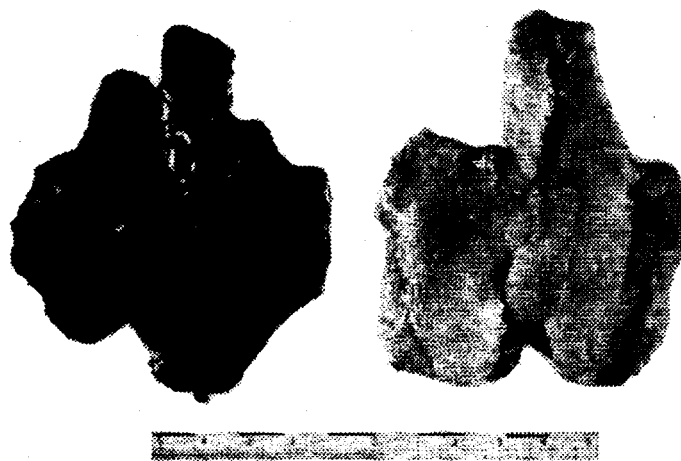


Fig. 14 Fotografía comparativa entre el timo perteneciente a una niña de 9 años (drcha) y a una mujer de 80 años (Izq.). (Kendall, 1981)

2. HISTOLOGÍA

Cada lóbulo tímico está constituido por una malla de células epiteliales, que a modo de esponja, organiza lobulillos poliédricos de medio a dos milímetros de diámetro. (Fawcett, 1994).

Ambos lóbulos, derechos e izquierdo, están revestidos de una cápsula de tejido conectivo laxo. Este tejido, compuesto por fibras de colágena y algunas elásticas, en su exterior, se fusiona con el aerolar circundante y, en su interior, emite septos interlobulillares incompletos que separan parcialmente los lobulillos entre sí. (Leeson et al., 1989).

En cada lobulillo (Fig. 15) se aprecia una zona cortical oscura que tiñe mas intensamente con hematoxilina, ya que posee una mayor concentración celular, y otra medular clara con tejido mas difuso. (Junqueira y Carneiro, 1987).

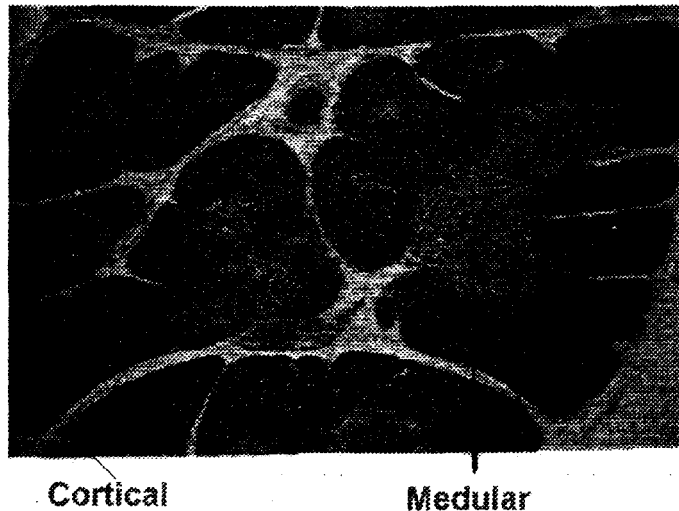


Fig. 15 Corte histológico de un timo perteneciente a un feto humano. Se pueden apreciar la disposición de los lóbulos, así como las distintas zonas cortical y medular. (Welsch, 1995)

Los tabiques de tejido conjuntivo, que llevan vasos y nervios, se extienden centripetamente desde la superficie hasta alcanzar el límite córtico- medular. (Fawcett, 1994).

El riego arterial del timo procede de las arterias tímicas, ramas de las mamarias internas o torácicas (Spaltholz, 1976) y de las tiroideas inferiores, ramas de las subclavias. Las arterias penetran en el timo por la cápsula, los septos interlobulillares y se ramifican a nivel de la unión córtico-medular.

Los vasos corticales tienen un endotelio continuo mientras que los de la médula y septos interlobulillares pueden ser fenestrados. (Wheater et al., 1993). El epitelio que rodea los vasos es de origen mesodérmico y forma una gruesa barrera ante la entrada de material antigénico. (Leeson et al., 1989). Las células endoteliales poseen prolongaciones finas que perforan la membrana basal y contactan con las epiteliales. (Junqueira, 1987).

Las vénulas postcapilares, en la unión córtico-medular, tienen un endotelio cuboideo especializado que permite la entrada y salida de los linfocitos del timo. (Whealer et al., 1993). Las vénulas de las travéculas interlobulillares drenan en el tronco braquiocefálico izquierdo y en las venas tiroideas. (Leeson , 1989).

El timo posee vasos linfáticos eferentes, pocos, y se localizan en las paredes de los vasos sanguíneos de mayor calibre, en los septos y en la cápsula. (Junqueira y Carneiro 1987). Drenan hacia los ganglios mediastínicos anteriores, traqueobronquiales y esternales. (Leeson et al., 1989; y Fawcett, 1994).

Las fibras simpáticas y parasimpáticas, derivadas de la cadena simpática cervical y de los nervios frénicos, acompañan a los vasos sanguíneos. Algunos ejercen funciones vasomotoras, (solo se han observado terminaciones vasomotoras de nervios simpáticos) pero otros terminan en la médula en relación con un conjunto de probable naturaleza

neuroendocrina; sus productos de secreción incluyen: péptido intestinal vasoactivo, oxitocina, vasopresina, neurofisiina y acetilcolinesterasa. (Wheater, 1993).

La cortical y la medular poseen los mismos tipos celulares aunque en proporciones diferentes. Los componentes celulares del timo son los linfocitos (timocitos), las células reticuloepiteliales, células reticulares mesenquimatosas y macrófagos (Junqueira y Carneiro, 1987).

Las células mas abundantes en el timo son los linfocitos en diversos estados de maduración. (Fawcett, 1994). Presentan ciertas variaciones dependiendo de su ubicación: en la cortical están en íntimo contacto unos con otros, sin tejido conjuntivo interpuesto. Esta masa compacta es comparable a un epitelio o al cerebro, en razón de la escasez de sustancia intercelular. En las zonas mas periféricas se encuentran los linfocitos mayores (linfoblastos), (Wheater et al., 1993) con un núcleo redondo u oval de 9 micrómetros de diámetro, rico en cromatina y con uno o dos nucleolos grandes. El citoplasma es abundante y basófilo. Llama la atención el alto número de polirribosomas libres frente a su escaso retículo endoplasmático rugoso. En una pequeña escotadura de la envoltura nuclear se localiza un diplosoma, rodeado por un pequeño aparato de Golgi. Las mitocondrias son pocas y tienden a agruparse en torno a éste. Solo excepcionalmente se ven algunos cuerpos multivesiculares, gránulos densos pequeños y gotitas de líquidos. (Fawcett, 1994).

Conforme nos aproximamos hacia el centro del lobulillo las imágenes mitóticas son menos frecuentes y se acrecienta el número de células degeneradas con núcleos pignóticos así como las formas linfocitarias pequeñas. Estas tienen un núcleo redondo fuertemente teñido de cuatro a cinco micrómetros de diámetro con un nucleolo pequeño. El ribete citoplasmático es muy delgado y contiene unos pocos ribosomas libres en

su mayoría dispersos. El pequeño aparato de Golgi que deforma ligeramente el núcleo. Las mitocondrias y el retículo endoplasmático rugoso son raros de ver. Ocasionalmente se encuentran cuerpos multivesiculares, gotas lipídicas y gránulos densos pequeños. (Fawcett, 1994).

Los linfocitos grandes (Fig. 16) constituyen una pequeña proporción de la población linfocitaria del lobulillo. En la medular son mucho menos abundantes, pequeños, con forma irregular y un citoplasma relativamente mayor (Fawcett, 1994).

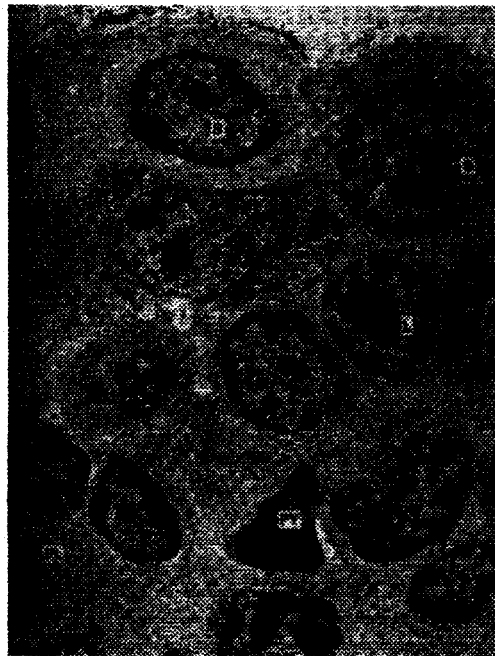


Fig. 16 Corte histológico perteneciente a un timo de rata en zona cortical. En ellas se pueden apreciar linfocitos grandes (B), linfocitos maduros (L), células picnóticas (PY) y células plasmáticas. (Kendall, 1981)

Las células epiteliales son poligonales y estrelladas. Menos numerosas en la cortical, con citoplasma escaso y prolongaciones muy largas y finas (Fig. 17). En la zona medular forman una maya densa con cuerpos voluminosos y citoplasma abundante. Este es acidófilo con acumulos de filamentos intermedios de queratina, pocas mitocondrias, escaso retículo endoplasmático rugoso así como ribosomas libres. El aparato de Golgi es pequeño (Wheater et al., 1993). Son característicos ciertos gránulos electrodensos, tal vez de naturaleza secretoria. Se observan algunas vacuolas que contiene una matriz transparente y, aunque son escasas en el timo fetal y en la corteza superficial, su número se incrementa con la edad, especialmente en las regiones corticales profundas. El núcleo es grande, pálido, redondo y central con unos siete a once micrómetros de



Fig. 17 Corte histológico perteneciente al timo de un joven de 12 años. En él se pueden apreciar células epiteliales reticulares claras (PER) y oscuras (DER) así como células reticulares interdigitales (IDC). (Kendall, 1981)

diámetro. Posee uno o dos nucleolos pequeños y su cromatina es clara y fina. La membrana de estas células es muy rica en desmosomas, mediante los cuales se unen entre sí. (Junqueira y Carneiro 1987 y Carrascal, 1991).

En la médula tímica pueden observarse unas formaciones características, ovoides y eosinófilas de unos veinte a ciento cincuenta micrómetros de diámetro denominados corpúsculos o cuerpos de Hassall (Fig. 18).

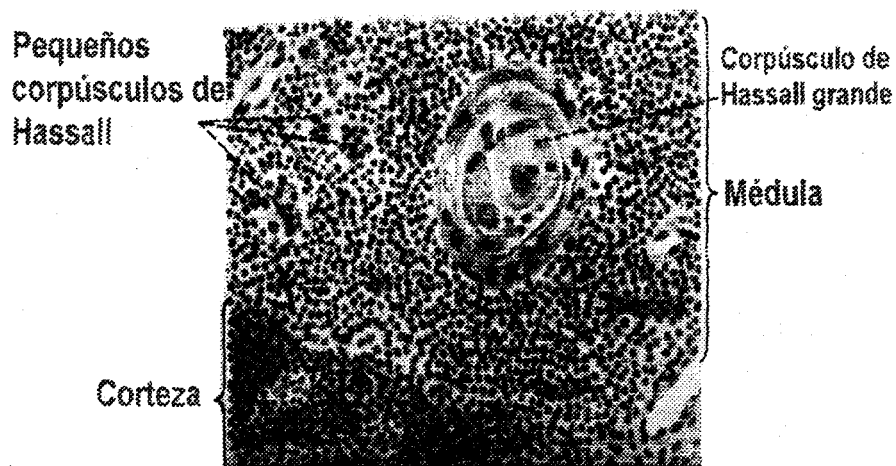


Fig.18 Corte histológico de un timo infantil en el cual podemos apreciar en la zona medular (superior derecha) un corpúsculo de Hassall, así como la zona cortical (ángulo inferior izquierdo). (Welsch, 1995).

Aparecen por primera vez durante la vida fetal, aumentando su número de forma notable en periodos de destrucción intensa de linfocitos. Crecen en tamaño paralelamente con la edad. El corpúsculo se inicia con una sola célula epitelial medular que se hialiniza, queratiniza y termina por necrosarse. Este proceso se repite en las células epiteliales circundantes, hasta formar una masa lamelar organizada en capas concéntricas semilunares. Las células circundantes pueden conservar sus conexiones desmosómicas entre sí. Las centrales pueden calcificarse y en ocasiones experimentar lisis originando una estructura quística. (Carrascal, 1991; Wheater et al., 1993; y Fawcett, 1994).

Los macrófagos son escasos en la población celular cortical pero constantes. Mas frecuentes en regiones perivasculares. Fagocitan linfocitos. Se presentan vacuolados, pálidos y semejantes en estructuras a los macrófagos de otras partes del cuerpo. (Wheater et al., 1993). En la zona de intercepción corticomedular, estas células adoptan una forma estrellada, interdigitada y se comportan como presentadoras de antígenos. (Fig. 19). En el interior medular son raras. (Wheater et al., 1993).

Dentro del parénquima en la periferia del tejido cortical y en el tejido conjuntivo, a lo largo de los vasos sanguíneos, se suelen encontrar células plasmáticas. (Fawcett, 1994).

Las células musculares en el timo han sido muy estudiadas desde la asociación entre timo y miastemia gravis. La población celular no es muy constante pero se incrementan a lo largo de la vida y con los cambios estacionales. No están innervadas. (Kendall, 1981).

En la zona medular se advierten algunos mastocitos. (Carrascal, 1991).



Fig. 19 Corte histológico perteneciente a la zona medular de un timo de rata. En él podemos apreciar una célula reticular interdirigida (IDC). (Kendall, 1981).

3. FUNCIÓN

El timo se considera un órgano linfoide primario, perteneciente al sistema inmune específico. Está relacionado con el reconocimiento de antígenos y el mecanismo por el cual el sistema se estimula para producir la neutralización y destrucción de estos. El sistema linfático consta de unos componentes centrales y otros periféricos, interconectados por una red de vasos sanguíneos y linfáticos (Kirkwood y Lewis, 1985).

El timo es un componente central implicado en la linfopoyesis o diferenciación y maduración de células capaces de actuar en las reacciones inmunes mediadas por ellas. (Gomez de la Concha, 1992) : el rechazo de los homoinjertos, de las reacciones tardías a las proteínas antigénicas (hipersensibilidad tardía), del ataque inmune a un huésped que no responde inmunológicamente (reacción de injerto contra huésped), y la respuesta inmune frente a hongos, bacterias intracelulares facultativas y ciertos virus (Fawcett, 1994).

La linfopoyesis se inicia en la vida fetal con la llegada, por vía sanguínea de unas pocas células primordiales linfoides en la octava-novena semana. Esta emigración no es al azar y se postula la existencia de una secreción previa de factores tímicos que atraen a dichas células (Roitt, 1991). Una vez en el timo comienzan a diferenciarse en linfocitos grandes. Estos proliferan en la corteza dando origen a generaciones de células más pequeñas, bajo la influencia del microambiente epitelial. (Fawcett, 1994).

Algunas células epiteliales tímicas allí ubicadas se observan con timocitos en vesículas intracitoplasmáticas demostrando así su intervención en el proceso de maduración. Los linfocitos se van organizando en lóbulos delimitando una zona cortical y otra medular. En ésta, se encuentran las células interdigitadas derivadas de la médula ósea, ricas en antígenos MHC

de clase II que aportan el proceso de aprendizaje para el reconocimiento de los autoantígenos. Algunas células corticales emigran a la médula y maduran en ella (Fig. 20) pero la mayoría de los linfocitos pequeños tienen una vida intratímica muy corta, dos o tres días, siendo destruidos en la corteza por los macrófagos (Fawcett, 1994).

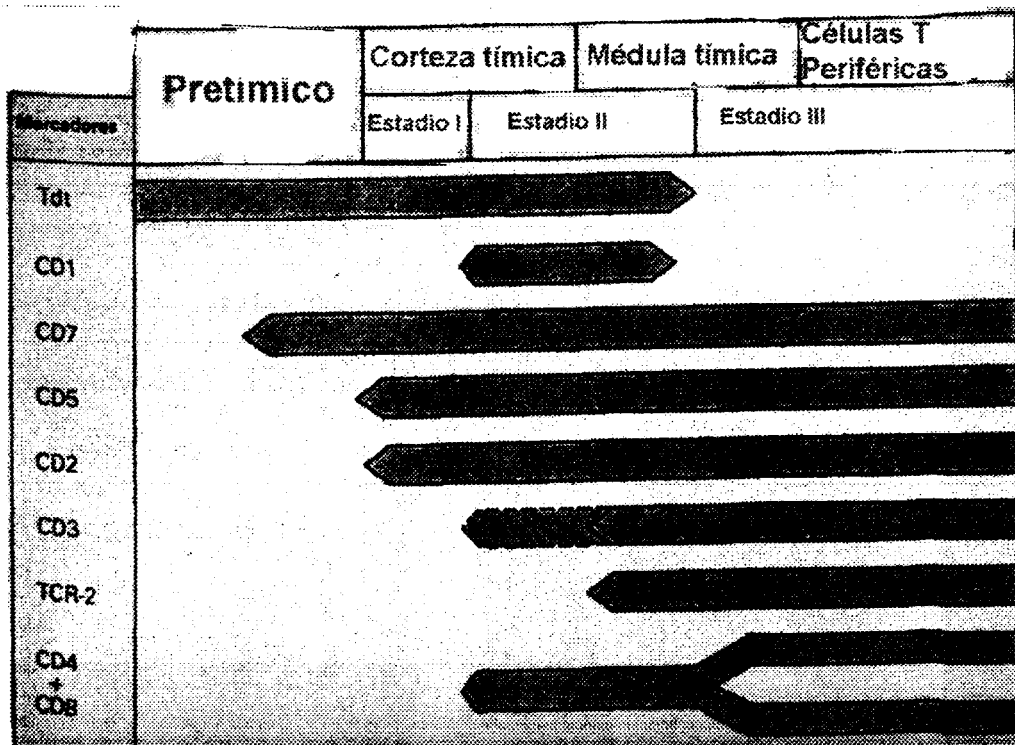


Fig. 20 Maduración de timocitos. Sucesivo desarrollo de los marcadores de membrana en los linfocitos T. (Roitt et al., 1991)

Las células maduras medulares abandonan el timo a través de las vénulas postcapilares de la unión corticomedular aunque no se descarta que puedan hacerlo por los vasos linfáticos. Estas células poseen receptores que les permiten su emigración hacia áreas específicas de los tejidos linfoides periféricos o secundarios (Roitt et al., 1991). Los linfocitos que abandonan el timo son funcionalmente inertes. El mecanismo y el momento en el que se hacen inmunocompetentes, en la actualidad, es desconocido (Fawcett, 1994).

Los análisis sobre el reagrupamiento de los genes que codifican los dos receptores de las células T así como los estudios fenotípicos de los antígenos de membranas superficiales sugieren que en el timo tiene lugar al menos dos vías de diferenciación de células T: la mayor parte de los timocitos se diferencian hacia células TCR-2+ presentes en los tejidos linfoides secundarios y en la circulación. Una minoría lo hacen a células TCR-1+, presentes en circulación (donde suponen menos 5% del total de los linfocitos circulantes) y con especial tropismo por la epidermis y las mucosas. (Roitt et al., 1991). Los factores tímicos tienen una acción tanto local como periférica (Tabla VIII), algunos actúan sobre las células T en sus distintos estadios de desarrollo mientras otros lo hacen en su mantenimiento dentro de los órganos linfoides secundarios (Roitt, 1991).

La atrofia generalizada del sistema linfoide en animales que se timectomizaron al nacer es debida a la falta de algún factor tímico que estimula el desarrollo y mantenimiento del tejido linfoide periférico (Junqueira y Carneiro 1987). Estos factores disminuyen con la edad paralelamente a la atrofia tímica.

El timo puede tanto recibir señales nerviosas y hormonales como transmitir las a través de sus propias hormonas. Se ha observado un efecto inmunosupresor mediado por los corticoides, endorfinas y metencefalina. Sin embargo, cuando el estímulo es contrarrestado por una respuesta adecuada, el sistema inmunitario puede no afectarse e incluso estimularse y responder de un modo más intenso de lo habitual. Esta respuesta puede ir mediada por la melatonina. Por otro lado las células linfoides pueden producir hormonas como ACTH, FSH y TSH, las cuales ejercen acciones moduladoras sobre las respuestas inmunes. (Roitt, 1991).

Los esteroides suprarrenales, y la hormona adrenocorticotrófica a través de ellos, ocasionan una reducción de las mitosis y una disminución del

TABLA VIII. Hormonas y factores tímicos.

Nombre	Química	Comentario	Función
Timosina (Fracción 5) *	Péptidos α , β , γ Secuencia α -1: 28 a. a. de PM 3.108.	Algunos se producen en las células epiteliales tímicas.	Estimulan la linfopoyesis.
Timopoyetina 1, 2 y 3 .	Secuencia: 49 a. a. de PM 5.562.	Producidos únicamente en timo, actividad en pentapéptido (TP-5)*	Estimulan la diferenciación a linfocitos T
Factor humoral tímico (THF)	Secuencia: 31 a. a. de PM 3.220.	Con secuencia parcial	Faforece la reacción de rechazo de injertos.
Timoestimulina (TP-1)	Grupo de péptidos.	Peor caracterizado	
Factor tímico sérico (FTS)*	Secuencia: 9 a.a. de PM 847.	Presente en suero, desaparece tras timectomía.	Induce el desarrollo de marcadores en células T.
Ubiquitina	Secuencia: 74 a.a. de PM 8.457.	Presente en timo, también en otros tejidos, bacterias y levaduras.	

(*). Preparaciones que se han sintetizado artificialmente.

(a.a.). Aminoácidos.

Adaptada de Junqueira y Carneiro, 1987; Leesson et al., 1989; Roitt et al., 1991; y Fawcett, 1994

número de linfocitos sobre todo en la cortical. (*In vivo* los timocitos corticales son mas sensibles a los esteroides que los medulares). Las hormonas sexuales aceleran la involución del timo y la castración tiene el efecto opuesto. La hormona del crecimiento producida por la hipófisis anterior estimula el desarrollo tímico de modo inespecífico (Junqueira y Carneiro 1987). La tiroidectomía acelera la involución tímica (Leeson et al., 1989).

El timo contiene células madres para la diferenciación de células cebadas; y su presencia es necesaria para la eosinófilopoyesis. (Leeson et al., 1989).

OBJETIVOS

La existencia de una posible interacción entre la glándula pineal y el timo, pasa por estudiar los mecanismos mediante los cuales la melatonina puede regular la función del timo. Aparte de la posible existencia de mecanismos directos que no se estudian en el presente trabajo, se postula la existencia de un mecanismo directo de acción de la melatonina sobre el timo. Para ello se estudia (Tabla IX) la existencia de receptores de melatonina en dicha glándula.

Se utiliza como radioligando para estudiar los receptores la 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina, un análogo de alta finidad ampliamente utilizado para estudiar el receptor de melatonina en diferentes tejidos. Por otro lado, se utiliza una preparación de membranas crudas de timo de rata como diana para estudiar la unión del radioligando. En estas condiciones se realizan los siguientes tipos de experimentos:

- 1º- Caracterización cinética, estequiométrica y farmacológica de la unión de la melatonina a la preparación de membranas.
- 2º- Estudio de la unión de la melatonina a las membranas de timo durante el desarrollo postnatal.
- 3º- Se estudia el ritmo circadiano de la unión de melatonin a la preparación de membranas.
- 4º- Se estudia el efecto de la exposición de los animales a la luz continua sobre la unión de melatonina a la preparación de membranas.
- 5º- Se estudia el efecto de la pinealectomía sobre la unión de melatonina a las membranas.

TABLA IX. Objetivos: Estudio de los receptores de melatonina en timo.

RADIOLIGANDO: 2 - [I ¹²⁵]- melatonina.
TEJIDO : membranas crudas de timo de rata.
ESTUDIOS :
1- Características cinéticas, estequiométricas y farmacológicas.
2- Desarrollo postnatal.
3- Ritmo circadiano.
4- Efecto de la luz cotínua.
5- Efecto de la pinealectomía.

CAPÍTULO 1

1. UNIÓN DE LA 2-[¹²⁵I] MELATONINA A MEMBRANAS DE TIMO DE RATAS PARCIALMENTE PURIFICADAS

JNI 02376

Specific binding of 2-[¹²⁵I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus

M.A. Lopez-Gonzalez^a, A. Martin-Cacao^a, J.R. Calvo^a, R.J. Reiter^b, C. Osuna^a and J.M. Guerrero^a

^a The University of Seville School of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Seville, Spain, and ^b The University of Texas Health Science Center at San Antonio, Department of Cellular and Structural Biology, San Antonio, TX, USA

(Received 19 January 1993)

(Accepted 19 January 1993)

Key words: Melatonin; Melatonin binding sites; Pineal; Thymus; Immune system

Summary

Melatonin binding sites were characterized in partially purified rat thymus membranes. The specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin ([¹²⁵I]MEL) to thymus membranes was dependent on time and temperature, stable, saturable, and reversible. Concentration-dependent binding of [¹²⁵I]MEL to thymus membranes was saturable and resulted in a linear Scatchard plot, suggesting binding to a single class of binding sites. The K_d for this single site was 0.47 nM with a binding capacity of 1.01 pM. In competition studies, the specific binding of [¹²⁵I]MEL to thymus membranes was inhibited by increasing concentrations of native melatonin. Scatchard analysis showed that, unlike in saturation studies with [¹²⁵I]MEL, data were compatible with the existence of two classes of binding sites: a high-affinity site with a K_d of 1.72 ± 0.25 nM and a binding capacity of 1.40 ± 0.18 pM, and a low-affinity site with a K_d of 1226 ± 325 nM and a binding capacity of 460 ± 87 pM. Interestingly, K_d and BC values of the high-affinity binding site described by competition studies are similar to those obtained by saturation studies with [¹²⁵I]MEL. Binding of [¹²⁵I]MEL to thymus membranes was specific as indicated by the fact no other melatonin precursor or derivative was as potent as melatonin in inhibiting the binding of [¹²⁵I]MEL to membranes. Results strongly suggest that melatonin is involved in regulation of thymus activity.

Introduction

The pineal gland, and its major hormone melatonin, is capable of translating environmental lighting information into signals that modulate reproductive, adrenal and other neuroendocrine interactions as well as immune function (Reiter, 1991a,b). Although a relationship between the pineal gland and the immune system has been suspected for decades, only in recent years has convincing evidence accumulated on the existence of such an interaction (Guerrero and Reiter, 1992).

Maestroni and co-workers have demonstrated that melatonin enhances antibody production against T-dependent antigens in normal mice, and counteracts the immunosuppression induced by acute stress or pharmacologically-administered corticosteroids on antibody production, thymus weight, and antiviral resistance (Maestroni and Conti, 1989, 1990; Maestroni et al., 1986, 1987, 1988). Mechanisms involved in the immunostimulatory effect of pineal gland are not well understood, but some evidence suggests that the release of opioid peptides and interleukin-2 by T-helper cells may participate in this mechanism by activating, at least, natural killer activity (Del Gobbo et al., 1989) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (Giordano and Palermo, 1991).

The effect of melatonin on the immune system is also supported by the existence of specific binding sites

Correspondence to: Juan M. Guerrero, The University of Seville School of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Avda Sanchez Pizjuan 4, 41009-Seville, Spain.

for melatonin in human lymphocytes (Lopez-Gonzalez et al., 1992a) and chick splenocytes (Pang and Pang, 1992). In recent studies, we have described the presence of two classes of melatonin binding sites in human blood lymphocytes (Lopez-Gonzalez et al., 1992a): a low-affinity binding site coupled to cyclic GMP production and a high-affinity binding site which apparently is not coupled to cyclic nucleotide synthesis. However, new findings have shown that melatonin bound to high-affinity binding sites in human lymphocytes can potentiate the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in stimulating cyclic AMP production (Lopez-Gonzalez et al., 1992b,c). Although melatonin by itself did not affect cyclic AMP accumulation in these cells, it did potentiate the effect of VIP on cyclic nucleotide production at physiological doses for both drugs.

In this paper, we show the presence of 2- $[^{125}\text{I}]$ iodomelatonin ($[^{125}\text{I}]\text{MEL}$) binding sites in partially purified rat thymus membranes. The specificity and affinity of the binding sites suggest that they might be relevant in studies on the role of pineal gland and melatonin in regulating thymus function.

Materials and Methods

Materials

$[^{125}\text{I}]\text{MEL}$ was purchased from the Radiochemical Centre (Amersham, UK). The specific activity of the radioligand was 1900–2175 Ci/mmol and was used within 60 days of purchase. Purity of the radioligand was checked by silica gel column chromatography (SGCC) and was found to be >95% pure (Vakkuri et al., 1984). Melatonin, 6-hydroxymelatonin, *N*-acetylserotonin, 5-hydroxytryptophol, 5-methoxytryptophol, tryptamine, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxy-L-tryptophan, 5-methoxy-DL-tryptophan, 5-methoxytryptamine, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-methoxyindole-3-acetic acid, DL-tryptophan, (-)-norepinephrine, isoproterenol and phenylephrine were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Other drugs were obtained from commercial sources.

Animals and membrane preparations

Male Wistar rats (8 weeks old) born in our animal facility were used. Animals received food and water ad libitum and were exposed to an automatically regulated light-dark (LD) cycle of 14:10; the lights were turned off daily from 2000 through 0600 h. The animals were killed by decapitation between 1600 and 1800 h and their thymus, free from parathyroid lymph nodes, was rapidly dissected. Tissues were homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, with 4 mM CaCl_2 and centrifuged at $30,000 \times g$ for 30 min. Pellets (partially purified membranes) were washed twice with homogenization buffer and resuspended in the same buffer. Membrane prepa-

rations were stored at -80°C until used for binding assays. Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

Binding studies

Binding assay conditions were essentially as previously described for lymphocyte studies (Guerrero et al., 1981; Calvo et al., 1986) and other membrane preparations (Lopez-Gonzalez et al., 1991). Briefly, membranes (up to 2 mg/ml) were incubated with $[^{125}\text{I}]\text{MEL}$ (100–1000 pM) in 35 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 50 mM NaCl and, when necessary, native melatonin and other drugs, in a total reaction volume of 100 μl . Reaction was initiated by the addition of membranes, performed at the times and temperatures indicated, and terminated by the addition of 100 μl ice-cold 35 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. Membrane-bound $[^{125}\text{I}]\text{MEL}$ was separated by centrifugation, then washed with 10% saccharose, and the radioactivity was determined. Data are reported as specific binding, i.e., total tracer bound minus the amount of tracer that was not displaced by 1 mM melatonin. No detectable degradation of $[^{125}\text{I}]\text{MEL}$ during the incubation occurred as SGCC of aliquots of the incubation medium taken before and after incubation revealed similar amounts of radioactivity (98%) in the position of $[^{125}\text{I}]\text{MEL}$.

Results

Figure 1 depicts the time course of specific binding of $[^{125}\text{I}]\text{MEL}$ to rat thymus membranes at 0, 15 and 37°C. The rate of binding was more rapid at 37°C compared with 0 or 15°C. At 37°C, binding reached its maximal value at 15 min; thereafter, binding quickly decreased from peak values to the termination of the incubation. At 15°C, binding reached a maximum by 1 h and remained stable for an additional hour. At 0°C,

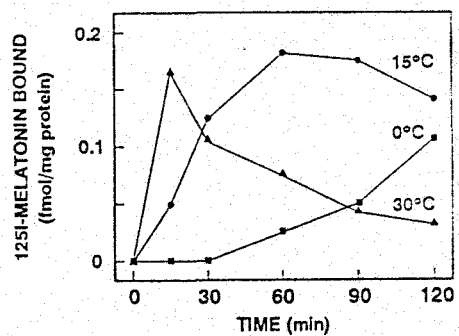


Fig. 1. Association of $[^{125}\text{I}]\text{MEL}$ binding in thymus membranes at 0, 15 and 37°C. $[^{125}\text{I}]\text{MEL}$ (100 pM) was incubated with thymus membranes (1 mg/ml) at the times indicated. Each point is the mean of three experiments performed in duplicate. Standard error was always less than 15% of the mean.

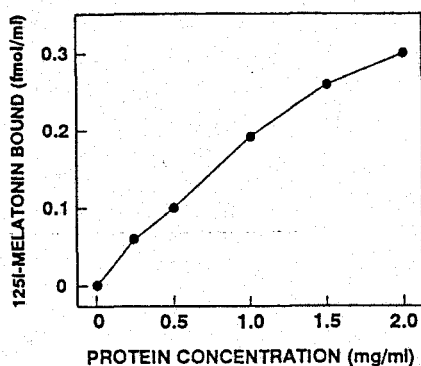


Fig. 2. Effect of thymus membrane concentration on [¹²⁵I]MEL binding. Membranes (up to 2 mg/ml) were incubated with [¹²⁵I]MEL (100 pM) for 60 min at 15°C. Each point is the mean of three experiments performed in duplicate. Standard error was always less than 15% of the mean.

binding was slower than at 15°C but, by the end of the incubation, both temperatures exhibited similar binding. At 15°C, extraction of radioligand after a binding assay showed that more than 98% of radioactivity comigrated on SGCC with authentic [¹²⁵I]MEL; no other radiolabeled peaks were observed. Thus, [¹²⁵I]MEL is stable during the course of a standard binding assay at 15°C. Therefore, further experiments were performed at 15°C for 60 min to provide for maximal binding with no observable degradation of the tracer. Binding of [¹²⁵I]MEL to thymus membranes was also proportional to protein concentration up to 2 mg/ml (Fig. 2). Further experiments were performed with 1 mg/ml membrane protein. Binding of [¹²⁵I]MEL to thymus membranes was also reversible. Dissociation of the tracer-membrane complex was studied by the addition of 100 μM MEL; this test indicated a half-time of dissociation of about 5 min (Fig. 3).

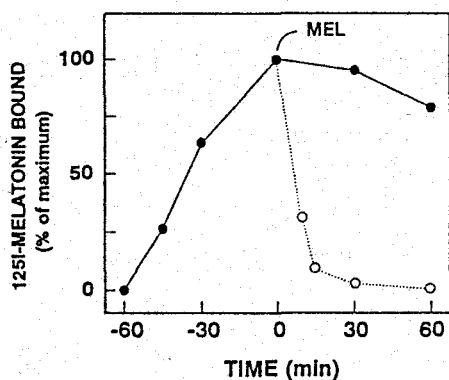


Fig. 3. Dissociation of [¹²⁵I]MEL binding in thymus membranes. [¹²⁵I]MEL (100 pM) was incubated with membranes (1 mg/ml) at 15°C at the times indicated (●). After 60 min incubation, 100 μM melatonin was added and the radioactivity specifically bound was determined at the times indicated (○), and expressed as the percentage of radioactivity at time zero. Each point is the mean of three experiments performed in duplicate. Standard error was always less than 15% of the mean.

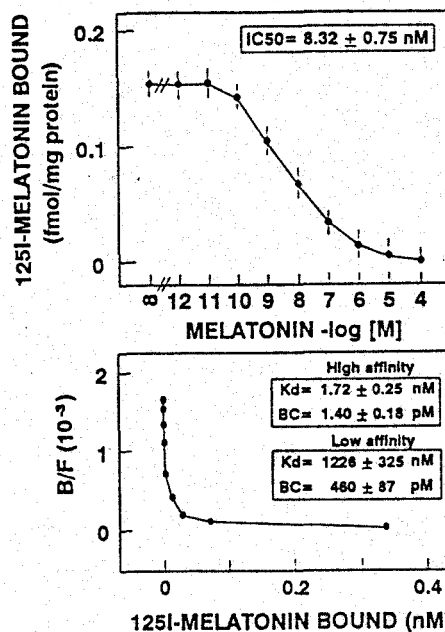


Fig. 4. Competitive inhibition (top) and Scatchard plot (bottom) of [¹²⁵I]MEL binding to thymus membranes by native melatonin. Membranes (1 mg/ml) were incubated with [¹²⁵I]MEL (100 pM) and increasing concentrations of native melatonin for 60 min at 15°C. Each point is the mean ± standard error of four experiments performed in triplicate.

In competition studies, the specific binding of [¹²⁵I]MEL to thymus membranes was inhibited by increasing concentrations of native melatonin (Fig. 4, top); 50% inhibition was observed at 8.32 ± 0.75 nM melatonin. When interpreted by the Scatchard analysis (1949), the data were compatible with the existence of two classes of binding sites: a high-affinity site with a K_d of 1.72 ± 0.25 nM and a binding capacity of 1.40 ± 0.18 pM, and a low-affinity site with a K_d of 1226 ± 325 nM and a binding capacity of 460 ± 87 pM (Fig. 2, bottom). However, concentration-dependent binding of [¹²⁵I]MEL to thymus membranes was saturable (Fig. 5, top) and resulted in a linear Scatchard plot suggesting binding to a single class of binding sites (Fig. 5, bottom). The K_d for the single site was 0.47 nM with a binding capacity of 1.01 pM. Results are in close agreement with data obtained from competition studies for the high-affinity binding site.

The pharmacological characterization of [¹²⁵I]MEL binding to rat thymus membranes was carried out with tracer concentrations of radioligand (100 pM) and with different metabolites involved in the melatonin synthesis pathway (Table 1). 6-hydroxymelatonin was 5 times less effective than melatonin in inhibiting [¹²⁵I]MEL binding to thymus membranes. 5-hydroxyindoles were much less effective, exhibiting IC_{50} values 150-fold higher than that exhibited by melatonin. However, 5-hydroxyindoles were more effective than the corresponding 5-methoxyindoles which were shown to be

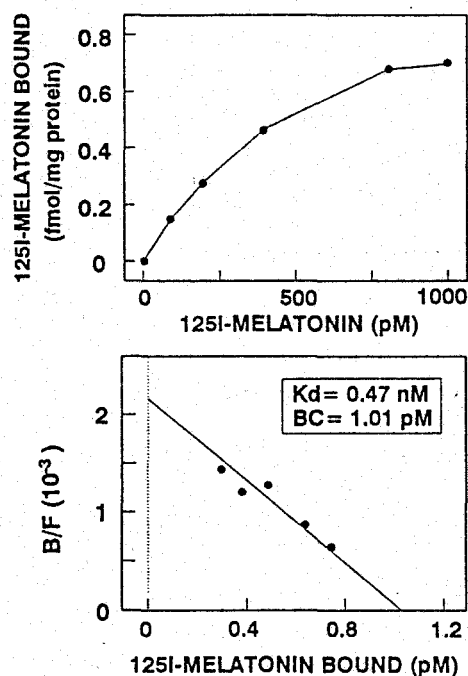


Fig. 5. Saturation isotherm (top) and Scatchard plot (bottom) of [125 I]MEL binding in thymus membranes. Membranes (1 mg/ml) were incubated with increasing concentrations of [125 I]MEL (up to 1000 pM) for 60 min at 15°C. Each point is the mean of two experiments performed in duplicate.

TABLE 1

Pharmacological profile of the [125 I]MEL binding site in rat thymus membranes.

Drugs	IC ₅₀ (nM)
5-Methoxyindoles	
Melatonin	9
6-Hydroxymelatonin	43
5-Methoxyindole-3-acetic acid	13,000
5-Methoxytryptophol	27,000
5-Methoxy-DL-tryptophan	> 100,000
5-Methoxytryptamine	> 100,000
5-Hydroxyindoles	
N-Acetylserotonin	1,500
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	7,000
5-Hydroxytryptophol	10,000
5-Hydroxytryptamine	22,000
5-Hydroxy-L-tryptophan	27,000
Indoles	
Tryptamine	16,000
DL-Tryptophan	> 100,000
Miscellaneous compounds	
(-)-Norepinephrine	> 100,000
Isoproterenol	> 100,000
Phenylephrine	> 100,000

^a Thymus membranes were incubated with 100 pM [125 I]MEL in the absence or in the presence of increasing concentrations of each drug (up to 0.1 mM) at 15°C for 60 min. The IC₅₀ value is the concentration of the drug required to inhibit binding of [125 I]MEL by 50%. Results are the mean of three experiments performed in duplicate.

ineffective. On the other hand, binding of [125 I]MEL to thymus membranes was not affected by either norepinephrine or various α - and β -adrenergic agonists.

Discussion

In the present paper we show, for the first time, that melatonin may interact with rat thymus membranes through both high- and low-affinity binding sites. Binding of [125 I]MEL by rat thymus membranes fulfills all criteria for binding to a receptor site. Thus, binding exhibits properties such as dependence on time and temperature as well as reversibility and specificity. Interpretation of the stoichiometric data by the Scatchard analysis (Scatchard, 1949) disclosed two classes of melatonin binding sites with different affinities (1.72 and 1226 nM) in thymus membranes when saturation studies were performed using unlabeled melatonin in addition to the tracer. However, when saturation studies were performed using exclusively increasing concentrations of [125 I]MEL, only 1 class of binding sites was found. Affinity of this receptor ($K_d = 0.47$ nM) is similar to that found for the high-affinity receptor described by the first method. The use of lower concentrations of [125 I]MEL than unlabeled melatonin in stoichiometric studies may explain the apparent disagreement in the number of receptor sites. The binding capacity of high-affinity melatonin binding sites is also similar using both methods (1.40 and 1.01 pM), while the binding capacity of low-affinity binding sites is roughly 300- \times higher (460 pM) and it is calculated only using unlabeled melatonin. The affinity of the high-affinity binding site is in the same range of the melatonin binding site described in human lymphocytes (Lopez-Gonzalez et al., 1992a), and 5-50 times lower than that in receptors described for median eminence-pars tuberalis (Vanecek, 1988; Weaver et al., 1989), suprachiasmatic nucleus (Laitinen and Saavedra, 1990), area postrema (Laitinen et al., 1990), and Harderian gland (Lopez-Gonzalez et al., 1991). Thus, the K_d value obtained for melatonin receptors in rat thymus membranes was slightly higher than serum melatonin concentrations at night in adult rats or humans (200 pM). However, during the rat prepubertal state, serum melatonin levels at night can reach the nM range (Reiter et al., 1985), possibly allowing melatonin binding sites in the thymus to recognize circulating melatonin. However, the low-affinity binding site of melatonin is unlikely related to a physiological role of the hormone in the thymus.

The pharmacological characterization of the melatonin binding site labeled by [125 I]MEL indicated that only 6-hydroxymelatonin approached the effectiveness of melatonin in displacing [125 I]MEL bound to lymphocytes (Table 1). Other indoles including 5-hydroxy- and

5-methoxyindoles were less effective or ineffective. The order of potency agrees with that described by other authors (Dubocovich and Takahashi, 1987; Vanecek, 1988; Laitinen et al., 1990; Lopez-Gonzalez et al., 1992a).

The physiological role of melatonin binding sites in thymus remains unclear. However, several authors have shown a physiologic link between pineal gland and thymus (Cardarelli, 1990). The major thrust of early hypotheses was keyed to the concept that the thymus and pineal gland acted jointly to regulate cell, tissue and organism growth (Berman, 1921). Several decades later, it was shown that administering pineal extracts in long-term experiments resulted in an increase of thymus weight accompanied by lymphoid cell hyperplasia in both the medullary and the cortical zones of the gland (Milcu and Pitis, 1943). Moreover, neonatal pinealectomy leads to thymic atrophy (Devecerski, 1963), and an impairment of immune potential expressed as diminution of both antibody production (Csaba et al., 1966) and Arthus reactivity to bovine serum albumin (Jankovik et al., 1970). Melatonin is also recognized as an immuno-enhancing factor in a mode counteracting the immunosuppressive influence of corticosterone (Maestroni et al., 1986, 1988). Interestingly, immuno-enhancing activity of melatonin is observed only in mice injected with T-dependent antigens, suggesting that the hormone exerts its effects on the thymus gland. Recent studies have also shown that melatonin causes a marked increase in the affinity and a decrease in the density of thymic receptors for adrenal steroids, suggesting that hormone steroid receptors in the thymus may be a target site for the interaction between melatonin and adrenal steroids in modulation of the immune response (Persengiev et al., 1991a,b). Adrenal steroids are known to inhibit the immune response, and involution of the thymus is generally accepted as a reliable sign of the immunosuppressive action of steroid hormones (Akano et al., 1985). Therefore, binding of melatonin to thymocytes might be considered, in addition to other possibilities, a mechanism which could explain the functional interactions between the pineal hormone melatonin and the thymus.

In conclusion, the present work describes the presence of high-affinity melatonin binding sites in rat thymus membranes. The K_d value of the high-affinity binding site is in the nM range, suggesting that melatonin may play a physiological role in rat thymus regulation, at least during the nighttime, when melatonin levels are highest.

Acknowledgments

Supported by grants from Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia (PM91-0616) and Spain-USA

Joint Committee. JMG was supported by a fellowship of the NATO Scientific Program.

References

- Akano, S.F., Cascio, C.S., Shinsako, J. and Dallman, M.F. (1985) Corticosterone: narrow range required for normal body and thymus weight and ACTH. *Am. J. Physiol.* 219, R527-R532.
- Berman, L. (1921) *The Glands Regulating Personality*. McGrath, College Park.
- Calvo, J.R., Molinero, P., Jimenez, J., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1986) Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with rat lymphoid cells. *Peptides* 7, 177-181.
- Cardarelli, N.F. (1990) The role of the thymus-pineal gland axis in an immune mechanism of aging. *J. Theor. Biol.* 145, 397-405.
- Csaba, G., Fischer, J. and Acs, T. (1966) The effect of pinealectomy and thymectomy on the immune capacity of the rat. *Experientia* 22, 168-169.
- Del Gobbo, V., Libri, V., Villani, N., Calio, R. and Nistico, G. (1989) Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 5, 567-571.
- Devecerski, V. (1963) Contributions à l'étude de l'effet de l'épiphysectomie sur l'histophysiologie du thymus. *Acta Anat.* 54, 352-353.
- Dubocovich, M.L. and Takahashi, J.S. (1987) Use of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3916-3920.
- Giordano, M. and Palermo, M.S. (1991) Melatonin induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Pineal Res.* 10, 117-121.
- Guerrero, J.M. and Reiter, R.J. (1992) A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr. Res.* 18, 91-113.
- Guerrero, J.M., Prieto, J.C., Elorza, F.L., Ramirez, R. and Goberna, R. (1981) Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 21, 151-160.
- Jankovik, B.D., Isakovik, K. and Petrovic, S. (1970) Effect of pinealectomy on immune reaction in the rat. *Immunology*, 18, 1-6.
- Laitinen, J.T. and Saavedra, J.M. (1990) Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology* 126, 2110-2115.
- Laitinen, J.T., Flügge, G. and Saavedra, J.M. (1990) Characterization of melatonin receptors in the rat area postrema: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Neuroendocrinology* 51, 619-624.
- Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Rubio, A., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1991) Characterization of melatonin binding sites in the Harderian gland and median eminence. *Life Sci.* 48, 1165-1171.
- Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C. and Guerrero, J.M. (1992a) Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulation by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP production. *J. Pineal Res.* 12, 97-104.
- Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C., Rubio, A. and Guerrero, J.M. (1992b) Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. *Neurosci. Lett.* 136, 150-152.
- Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C., Rubio, A. and Guerrero, J.M. (1992c) Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating cyclic AMP production in human lymphocytes. *J. Pineal Res.* 12, 174-181.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- Maestroni, G.J.M. and Conti, A. (1989) Beta-endorphin and dinorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 333-340.
- Maestroni, G.J.M. and Conti, A. (1990) The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4⁺, Thy-1⁺ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J. Neuroimmunol.* 28, 167-176.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1986) Role of the pineal gland in immunity. I. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol.* 13, 19-30.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1987) Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 68, 384-391.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1988) Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 63, 465-469.
- Milcu, S.M. and Pitis, M. (1943) Contributions à l'étude de la corrélation thymo-épiphytaire. *Acta Endocr. (Bucarest)* 9, 13-15.
- Pang, C.S. and Pang, S.F. (1992) High affinity specific binding of 2-[125]iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken. *J. Pineal Res.* 12, 167-173.
- Persengiev, S., Marinova, C.H. and Patchev, V. (1991a) Steroid hormone receptor in the thymus: a site of immunomodulatory action of melatonin. *Int. J. Biochem.* 23, 1483-1485.
- Persengiev, S., Patchev, V. and Velez, B. (1991b) Melatonin effects on thymus steroid receptors in the course of primary antibody responses: significance of circulating glucocorticoid levels. *Int. J. Biochem.* 23, 1487-1489.
- Reiter, R.J. (1991a) Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiologic interactions. *Endocr. Rev.* 12, 151-180.
- Reiter, R.J. (1991b) Pineal gland: Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol. Metab.* 2, 13-19.
- Reiter, R.J., Esquifino, A.I., Champney, T.H., Craft, C.M. and Vaughan, M.K. (1985) Pineal melatonin production in relation to sexual development in the male rat. In: D. Gupta, D. Borrelli and A. Attanasio (Eds.), *Paediatric Endocrinology*, Croom and Helm, London, pp. 190-202.
- Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
- Vakkuri, O., Lamsa, E., Rahkamaa, E., Ruotsalainen, H. and Lepaluoto, J. (1984) Iodinated melatonin: Preparation and characterization of the molecular structure by mass and ¹H NMR spectroscopy. *Anal. Biochem.* 142, 284-289.
- Vanecek, J. (1988) Melatonin binding sites. *J. Neurochem.* 51, 1436-1440.
- Weaver, D.R., Rivkees, S.C. and Reppert, S.M. (1989) Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. Neurosci.* 9, 2581-2590.

2. COMENTARIO Y DISCUSIÓN

En este artículo se describe por primera vez que la melatonina interacciona con membranas de timo de rata, cumpliendo todos los criterios de unión de la melatonina al receptor. La unión muestra propiedades como dependencias en el tiempo y temperatura así como reversibilidad y especificidad. La interpretación de los datos estequiométricos por el análisis de Scatchard mostró dos clases de receptores de melatonina con afinidades diferentes (1,72 y 1.226 nM) en membranas de timo cuando los estudios de saturación se realizaron usando melatonina fría añadida al marcador. No obstante, cuando los estudios de saturación se realizaron exclusivamente usando aumentos de concentración de melatonina marcada, solamente se encontró una clase de receptores. La afinidad de este receptor ($k_d = 0,47$ nM) es similar a la encontrada para los receptores de alta afinidad hallados por el primer método. El uso de concentraciones menores de melatonina marcada que de melatonina fría en los estudios estequiométricos pueden explicar la aparente discrepancia en el número de receptores.

La capacidad de unión de los receptores de melatonina de alta afinidad es también similar cuando se usan ambos métodos mientras que la capacidad de unión de los receptores de baja afinidad es ligeramente mayor (300 pM y 460 pM) cuando son calculados usando exclusivamente melatonina fría. La afinidad de los receptores de alta afinidad esta en el mismo rango que la de los receptores de melatonina descritos en linfocitos humanos (López-González et al., 1992 a), y unas 5-50 veces menores que los receptores descritos en *pars tuberalis*- eminencia media (Vanecek, 1988b; y Weaver et al., 1989), núcleo supraquiasmático (Laitinen y Saavedra, 1990), área postrema (Laitinen et al., 1990) y glándula Harderiana (López-González et al., 1991). Así los valores de la K_d obtenidos para los

receptores de melatonina de membranas de timo de rata eran ligeramente mayores que las concentraciones de melatonina sérica nocturnas en ratas adultas o humanos (200 pM). No obstante, durante el estado prepuberal, los niveles de melatonina sérica nocturnos pueden alcanzar el rango nM (Reiter et al., 1985), permitiendo de esta manera que los receptores tímicos de melatonina puedan reconocer la melatonina circulante. Además, los receptores de melatonina de baja afinidad probablemente no estén relacionados con un papel fisiológico de esta hormona en el timo.

La caracterización farmacológica de los receptores de melatonina puso de manifiesto que solamente la 6-hidroximelatonina puede desplazar a la melatonina de su unión. Otros indoles incluyendo los 5-hidroxi y los 5-metoxindoles eran menos efectivos o inefectivos. El orden de potencia concuerda con el descrito por otros autores (Dubocovich y Takahashi, 1987; Vanecek, 1988; Laitinen et al., 1990; López- González et al., 1992a).

Algunos autores han relacionado fisiológicamente las glándulas pineal y tímica. Estas glándulas pueden actuar conjuntamente para regular el crecimiento celular, tisular y del propio organismo (Berman, 1921; y Cardareli, 1990). Milcu y Pitis (1943) administraron extractos pineales en experimentos de larga duración, obteniéndose un aumento del peso tímico acompañado de una hiperplasia linfóide en la corteza y médula de la glándula. Además, la pinealectomía neonatal conduce a la atrofia tímica y a un empeoramiento de la función inmune (Devecerski, 1963; Csaba et al., 1966). La melatonina también es reconocida como un factor inmunoestimulador al contrarrestar la influencia inmunosupresora de la corticosterona (Maestronin et al., 1986-1988), observándose solamente su efecto en ratones inyectados con antígenos T-dependientes, lo que sugiere que la hormona ejerce su efecto mediante el timo. También se ha encontrado que la melatonina causa un aumento considerable en la afinidad

y una disminución en la densidad de los receptores tímicos para esteroides adrenales, sugiriendo que los receptores esteroideos en el timo pueden ser una diana para la interacción entre melatonina y esteroides adrenales en la modulación de la respuesta inmune (Persengiev et al., 1991 a,b). Los esteroides adrenales inhiben la respuesta inmune y actúan sobre la involución tímica como signo de su acción inmunosupresora (Akano et al., 1985) de ahí, que la unión de melatonina a timocitos podría considerarse, aparte de otras posibilidades, como un mecanismo que explicara las interacciones funcionales entre la melatonina y el timo.

CAPÍTULO 2

2. UNIÓN DE LA 2-[¹²⁵I] MELATONINA A MEMBRANAS DE TIMO DE RATAS DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

Binding of 2-[¹²⁵I]melatonin by rat thymus membranes during postnatal development

A. Martin-Cacao^a, M.A. Lopez-Gonzalez^a, R.J. Reiter^b, J.R. Calvo^a and J.M. Guerrero^a

^aThe University of Seville School of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Seville, Spain; and ^bThe University of Texas Health Science Center at San Antonio, Department of Cellular and Structural Biology, San Antonio, Texas, USA

(Received 28 December 1992; revision received 25 February 1993; accepted 2 March 1993)

1. Summary

Previously, we have demonstrated the presence of melatonin binding sites in thymus membranes of adult rats. In this paper, we show that the binding of melatonin by thymus membranes changes during postnatal development. Maximum binding was observed in newborn rats; thereafter, binding decreased progressively during the first weeks of life and exhibited the lowest values in adult animals. Stoichiometric studies showed that the decrease in melatonin binding was due to changes in the binding capacity (2.5-fold) rather than to changes in the affinity of the receptor for the ligand. The results suggest a physiological role of melatonin in regulating thymus activity early during postnatal development.

2. Introduction

The pineal gland and its major hormone melatonin are capable of translating environmental lighting information into signals that modulate reproductive, adrenal and other neuroendocrine interactions as well as immune function [1–3]. Although a relationship between the pineal gland and the immune system has been suspected for

decades, only in recent years has convincing evidence accumulated on the existence of such an interaction [4–12]. The effect of melatonin on the immune system is also supported by the existence of specific binding sites for melatonin in human lymphocytes [13] and chick splenocytes [14]. We have described the presence of two classes of melatonin binding sites in human blood lymphocytes [13]: a low-affinity binding site coupled to cyclic GMP production and a high-affinity binding site which apparently is not coupled to cyclic nucleotide production. Recently, new findings showed that melatonin bound to high-affinity binding sites in human lymphocytes potentiates the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in stimulating cyclic AMP production. Although melatonin by itself did not affect cyclic AMP accumulation in these cells, it augmented the effect of VIP on cyclic nucleotide production at physiological doses for both drugs [15,16].

In a recent report [17], our group has shown the presence of melatonin binding sites in partially purified rat thymus membranes. The specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin ([¹²⁵I]MEL) to thymus membranes was dependent on time and temperature and was stable, saturable, and reversible. The specificity and affinity of the binding sites suggest that they might be a relevant tool to study the role of the pineal gland and melatonin in regulating thymus function. In the present work, we show that the binding of melatonin to thymus membranes changed during postnatal development. Maximal binding was observed in

Key words: Melatonin; Pineal; Thymus; Immune system

Correspondence to: Juan M. Guerrero, The University of Seville School of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Avda Sanchez Pizjuan 4, 41009-Seville, Spain. Phone/Fax: 34 5 490 7048.

wborn rats; thereafter, binding decreased progressively during the first weeks of life and exhibited the lowest values in adult animals. The results suggest a physiological role of melatonin in regulating thymus activity early during postnatal development.

Materials and Methods

1. Materials

[¹²⁵I]MEL was purchased from the Radiochemical Centre (Amersham, UK). The specific activity of the radioligand was 1900–2175 Ci/mmol and was used within 60 days of purchase. Purity of the radioligand was checked by silica gel column chromatography (SGCC), and it exhibited 95% purity [18]. Native melatonin was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Other reagents were obtained from commercial sources.

2. Animals and membrane preparations

Adult male Wistar rats born in our animal facility were used. Animals received food and water *ad libitum* and were exposed to an automatically regulated light-dark (LD) cycle of 14:10; the lights were turned off daily from 2000 through 00 h. The animals were killed by decapitation between 1600 and 1800 h at the ages indicated, and their thymus was rapidly removed. The tissues were homogenized in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 with 4 mM CaCl₂ and centrifuged at 30 000 g for 30 min. Pellets (partially purified membranes) were washed twice with homogenization buffer and resuspended in the same buffer. Membranes were stored at -80°C until used for binding assays. The protein concentration was determined by the method of Lowry et al. [19] using bovine serum albumin as the standard.

3. Binding studies

Binding assay conditions were essentially as previously described for lymphocyte studies [20,21] and other membrane preparations [22]. Briefly, membranes (2 mg/ml) were incubated with [¹²⁵I]MEL (100 pM) in 35 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, containing 50 mM NaCl and, when

necessary, native melatonin, in a total reaction volume of 100 μl. The reaction was initiated by the addition of membranes, performed at 15°C for 60 min, and terminated by the addition of 100 μl ice-cold 35 mM Tris-HCl buffer pH 7.4. Membrane-bound [¹²⁵I]MEL was separated by centrifugation and then washed with 10% saccharose, and the radioactivity was determined. Data are reported as specific binding, i.e., total tracer bound minus the amount of tracer that was not displaced by 100 μM melatonin. No detectable degradation of [¹²⁵I]MEL during the incubation occurred as SGCC of aliquots of the incubation medium taken before and after incubation revealed similar amounts of radioactivity (98%) in the position of [¹²⁵I]MEL.

Values are expressed as the mean ± standard error (SE). Data were statistically analyzed using an ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls multiple range test.

4. Results

In the first experiment, a group of animals was killed not later than 24 h after they were born. Other animals were killed at 1, 2, 3, 4, or 11 weeks of age. The thymus of each rat was collected and processed for melatonin-binding studies. As shown in Fig. 1, the maximum level of [¹²⁵I]MEL binding to thymus membranes was ob-

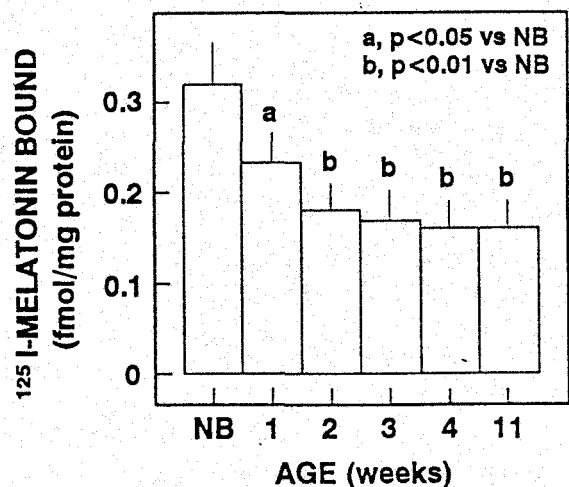


Fig. 1. [¹²⁵I]MEL binding in thymus membranes of newborn rats (NB) and in 1-, 2-, 3-, 4-, and 11-week-old rats. [¹²⁵I]MEL (100 pM) was incubated with thymus membranes (1 mg/ml) at 15°C for 60 min. Each point is the mean ± SE of 10 animals.

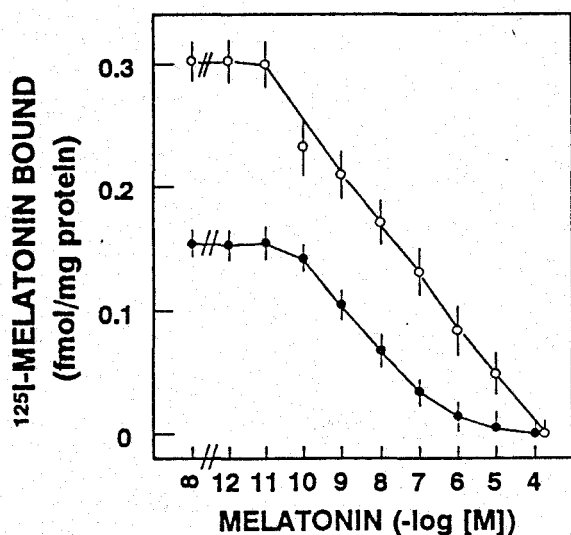


Fig. 2. Competitive inhibition of [125 I]MEL binding to thymus membranes from newborn (○—○) and 11-week-old rats (●—●) by native melatonin. Membranes (1 mg/ml) were incubated with [125 I]MEL (100 pM) and increasing concentrations of native melatonin for 60 min at 15°C. Each point is the mean \pm SE of 8 experiments performed in triplicate.

tained in newborn rats. In 1-week-old animals, the binding significantly decreased, and in 2-week-old and older animals, the binding of [125 I]MEL exhibited the lowest values.

In the following experiment, stoichiometric studies were performed using thymus membranes of newborn and 11-week-old animals. As shown in Fig. 2, the specific binding of [125 I]MEL to thymus membranes of either age was inhibited by increasing concentrations of native melatonin; 50% inhibition was observed at 4.5 ± 1.2 and 8.3 ± 2.5 nM melatonin in newborn and 11-week-old animals, respectively. When interpreted by Scatchard analysis [23], the data were compatible with the existence of two classes of binding sites: a high-affinity site with a low binding capacity and a low-affinity site with a higher binding capacity (Fig. 3). As can be seen in Table 1, the affinities of the high- and low-affinity binding sites for [125 I]MEL were similar at both ages. However, the binding capacity had clearly decreased in the thymus membranes of adult rats when compared with newborn rats.

5. Discussion

Binding of [125 I]MEL by rat thymus mem-

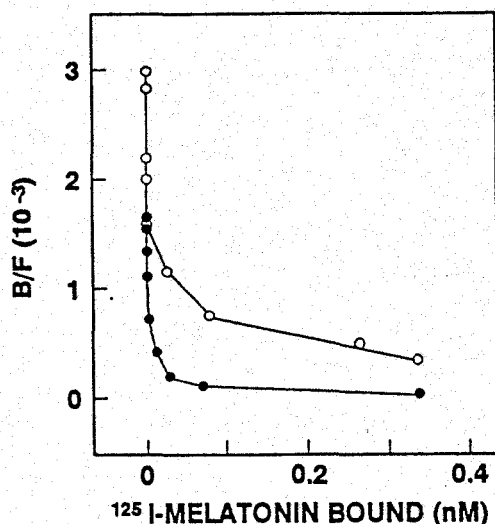


Fig. 3. Scatchard plot of data presented in Fig. 2.

branes has been previously described [17]; the binding characteristics fulfill all criteria for binding to a receptor site. Thus, binding exhibits properties such as dependence on time and temperature as well as reversibility and specificity. Interpretation of the stoichiometric data by the Scatchard analysis disclosed two classes of melatonin binding sites with different affinities. The affinity of the high-affinity binding site was in the same range as that of the melatonin binding site described in human lymphocytes [13].

In this paper, we present evidence for changes in melatonin binding by rat thymus membranes related to age. Results showed that binding was lower in adult rats than in newborn animals. Moreover, this decrease is due to changes in the

TABLE 1

Characteristics of melatonin binding sites in rat thymus membranes.

	Newborn rats	11-week-old rats
<i>High affinity</i>		
K_d (nM)	1.97 ± 0.25	1.79 ± 0.20
BC (pM)	8.40 ± 1.40	2.93 ± 0.45^a
<i>Low affinity</i>		
K_d (nM)	3700 ± 625	2500 ± 455
BC (pM)	7270 ± 879	885 ± 235^a

K_d , dissociation constant; BC, binding capacity.

^a $P < 0.01$ vs. newborn rats.

ing capacity of both high- and low-affinity binding sites, rather than to changes in their affinity. These age-related changes in binding capacity could be the consequence of changes in the serum melatonin concentration during the same period of time. In fact, during the first week of age, serum melatonin levels are low because maturation of the pineal gland and its melatonin rhythm occur during the first and second weeks of life [24]. Thus, the circadian rhythms in pineal melatonin content and *N*-acetyltransferase (the limiting enzyme in melatonin production) activity appear as early as 4 days after birth, but a circadian rhythm of melatonin production begins between postnatal days 7 and 10 [25-27]. On the other hand, sympathetic innervation and β -adrenergic receptors (which mediate the rhythmic production of melatonin) are present from the end of the second week of extrauterine life [28]. The low melatonin levels during the first days of life could be responsible for the increase in melatonin binding sites in the thymus due to a negative feedback mechanism.

The physiological relevance of the changes in melatonin binding sites during postnatal development remains to be studied. In fact, the presence of the thymus-pineal gland axis has been postulated [3,29], and the affinity of melatonin binding sites in the thymus should allow the gland to regulate serum levels of melatonin during the prepubertal period [17,30]. Additional data supporting a role for melatonin and the pineal gland during early development were reported by several authors. Thus, the thymus and pineal gland appear to act jointly to regulate cell, tissue, and organismal growth [31], and administering pineal extracts in long-term experiments resulted in an increase in thymus weight, accompanied by lymphoid cell hyperplasia in both the medullary and cortical zones of the gland [32]. Moreover, neonatal pinealectomy leads to thymic atrophy and an impairment of immune potential expressed as a diminution of both antibody production [34] and Arthus reactivity to bovine serum albumin [35]. Therefore, the increase in melatonin binding sites described in this paper during early postnatal development might be considered a compensatory mechanism, in addition to others, to explain the interrelationship between melatonin and thymus function.

mus function.

In conclusion, the present work describes a decrease in melatonin binding sites in rat thymus membranes of adult rats when compared with newborn animals. This decrease is due to changes in the binding capacity of both high- and low-affinity binding sites, rather than to changes in the affinity of the receptor for the ligand. Although further experiments are required, the higher capacity of thymic melatonin binding sites in newborn rats suggests that melatonin may be involved in a specific regulation of thymus function early during development.

Acknowledgements

Supported by grants from Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia (PM91-0616) and Spain-USA Joint Committee. J.M.G. was supported by a fellowship of the NATO Scientific Program.

References

- [1] Reiter, R.J. (1991) *Endocrinol. Rev.* 12, 151.
- [2] Reiter, R.J. (1991) *Trends Endocrinol. Metab.* 2, 13.
- [3] Guerrero, J.M. and Reiter, R.J. (1992) *Endocrinol. Res.* 18, 91.
- [4] Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1986) *J. Neuroimmunol.* 13, 19.
- [5] Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1987) *Clin. Exp. Immunol.* 68, 384.
- [6] Maestroni, G.J.M., Conti, A. and Pierpaoli, W. (1988) *Immunology* 63, 465.
- [7] Maestroni, G.J.M. and Conti, A. (1989) *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 333.
- [8] Maestroni, G.J.M. and Conti, A. (1990) *J. Neuroimmunol.* 28, 167.
- [9] Del Gobbo, V., Libri, V., Villani, N., Calio, R. and Nistico, G. (1989) *Int. J. Immunopharmacol.* 5, 567.
- [10] Giordano, M. and Palermo, M.S. (1991) *J. Pineal Res.* 10, 117.
- [11] Lewinski, A., Zelazowski, P., Sewerynek, E., Zerek-Melen, G., Szkudlinski, M. and Zelazowska, E. (1989) *J. Pineal Res.* 7, 153.
- [12] Colombo, L.L., Chen, G.J., Lopez, M.C. and Watson, R.R. (1992) *Immunol. Lett.* 33, 123.
- [13] Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C. and Guerrero, J.M. (1992) *J. Pineal Res.* 12, 97.
- [14] Pang, C.S. and Pang, S.F. (1992) *J. Pineal Res.* 12, 167.
- [15] Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C., Rubio, A. and Guerrero, J.M. (1992) *Neurosci. Lett.* 136, 150.
- [16] Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Osuna, C., Rubio, A.

and Guerrero, J.M. (1992) *J. Pineal Res.* 12, 174.

- [17] Lopez-Gonzalez, M.A., Martin-Cacao, A., Calvo, J.R., Reiter, R.J., Osuna, C. and Guerrero, J.M. (1993) *J. Neuroimmunol.* (in press).
- [18] Vakkuri, O., Lamsa, E., Rahkamaa, E., Ruotsalainen, H. and Leppaluoto, J. (1984) *Anal. Biochem.* 142, 284.
- [19] Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- [20] Guerrero, J.M., Prieto, J.C., Elorza, F.L., Ramirez, R. and Goberna, R. (1981) *Mol. Cell. Endocrinol.* 21, 151.
- [21] Calvo, J.R., Molinero, P., Jimenez, J., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1986) *Peptides* 7, 177.
- [22] Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Rubio, A., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1991) *Life Sci.* 48, 1165.
- [23] Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660.
- [24] Gupta, D. (1986) *J. Neural Transm. [Suppl.]* 21, 217.
- [25] Klein, D.C., Namboodiri, M.A.A. and Auerbach, D.A. (1981) *Life Sci.* 28, 1975.
- [26] Rubio, A., Osuna, C. and Guerrero, J.M. (1991) *Endocrinology* 128, 1661.
- [27] Rubio, A., Guerrero, J.M., Reiter, R.J. and Osuna, C. (1993) *Endocrinology* 132, 393.
- [28] Lytle, L.D., Hook, K.A. and Torres, G. (1988) *Pineal Res. Rev.* 6, 172.
- [29] Cardarelli, N.F. (1990) *J. Theor. Biol.* 145, 397.
- [30] Reiter, R.J., Esquifino, A.I., Champney, T.H., Craft, C.M. and Vaughan, M.K. (1985) in: *Paediatric Endocrinology* (D. Gupta, D. Borrelli and A. Attanasio. Eds.) pp. 190-202, Croom and Helm, London.
- [31] Berman, L. (1921) *The Glands Regulating Personality.* McGrath, College Park.
- [32] Milcu, S.M. and Pitis, M. (1943) *Acta Endocr. Bucarest* 9, 13.
- [33] Devecerski, V. (1963) *Acta Anat.* 54, 352.
- [34] Csaba, G., Fischer, J. and Acs, T. (1966) *Experientia* 22, 168.
- [35] Jankovik, B.D., Isakovik, K. and Petrovic, S. (1970) *Immunology* 18, 1.

2. COMENTARIO Y DISCUSIÓN

Este artículo pone de manifiesto cambios en la unión de melatonina a membranas de timo de rata relacionados con la edad. La unión era menor en ratas adultas que en animales recién nacidos. Esta disminución era debida a cambios en la capacidad de unión de los receptores de baja y alta afinidad mas que a cambios en su afinidad. Estos cambios relacionados con la edad en la capacidad de unión podrían ser las consecuencias de cambios en la concentración de melatonina sérica durante el mismo periodo de tiempo. Durante la primera semana de vida los niveles de melatonina sérica son bajos debido a una falta de maduración de la glándula pineal y de su ritmo circadiano (Gupta, 1986). Los ritmos circadianos de contenidos de melatonina y de la actividad de N- acetiltransferasa (la enzima limitante en la producción de melatonina) aparecen al cuarto día después del nacimiento, y el ritmo diario de la producción de melatonina aparece entre los días séptimo y décimo de vida postnatal (Klein et al., 1981; Rubio et al., 1991 y Rubio et al., 1993). Por otro lado, la inervación simpática y los receptores betadrenérgicos (mediadores de la producción rítmica de melatonina) están presente desde el final de la vida extrauterina (Lytle et al., 1988). Los bajos niveles de melatonina durante los primeros días de vida podrían ser los responsables del incremento de receptores de melatonina en el timo, debido a un mecanismo de retroalimentación negativa. Estos cambios de receptores de melatonina durante el desarrollo postnatal así como su papel fisiológico permanecen aún por determinar. Se ha postulado la existencia de un eje pineal- timo (Cardarelli, 1990; Guerrero y Reiter, 1992), que junto con los receptores de melatonina en el timo, permitirían reconocer los niveles séricos de melatonina durante el periodo prepuberal (Reiter et al., 1985).

El aumento de los receptores de melatonina descritos en este artículo durante el desarrollo postnatal podría considerarse como un mecanismo, aparte de otros, para explicar la interrelación entre las funciones de las glándula tímica y pineal.

CAPÍTULO 3

**1. VARIACIONES DIARIAS EN LA UNIÓN DE LA 2-[I¹²⁵]
MELATONINA A MEMBRANAS DE TIMO DE RATAS: EFECTOS
DE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ CONTÍNUA Y PINALECTOMÍA**

Diurnal Variations In [¹²⁵I]Melatonin Binding by Rat Thymus Membranes: Effects of Continuous Light Exposure and Pinealectomy

Alejandro Martin-Cacao, M.A. Lopez-Gonzalez, Juan R. Calvo, *Mirta Giordano, and Juan M. Guerrero

*Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville School of Medicine and Virgen Macarena Hospital, Seville, Spain; and *Laboratory of Immunology, Institute of Hematologic Research, National Academy of Medicine, Buenos Aires, Argentina*

Summary: Binding of melatonin by rat thymus membranes exhibited diurnal changes. Binding increased during the daytime and reached maximal values before entering the dark period. Then, binding decreased rapidly during the dark phase. In rats kept in light at night, binding of [¹²⁵I]melatonin by membranes was significantly higher than in animals that entered the normal dark period. Neonatal pinealectomy, which suppresses the circadian rhythm of melatonin, led to an increase in melatonin binding of 106%. Moreover, in animals maintained under continuous light exposure, which corresponds to functional pinealectomy, binding of melatonin by thymus membranes also increased in a time-dependent manner. The results support the hypothesis of a regulatory role of melatonin in the thymus in which melatonin downregulates its own binding sites. **Key Words:** Melatonin—Pineal gland—Immune system—Thymus.

Melatonin, the main pineal hormone, is involved in many pleiotropic activities as a neuroendocrine transducer organ: it is involved in the regulation of seasonal reproduction (1), influences hematopoiesis (2), modifies life span in aging mice (3), and inhibits tumor growth (4). A growing body of evidence also suggests that melatonin can modulate the immune response (5). Maestroni et al. (6–10) have demonstrated that melatonin enhances antibody production against T-dependent antigens in normal mice. Melatonin also counteracts the immunodepression induced by acute stress or pharmacologically administered corticosteroids on antibody production, thymus weight, and antiviral resistance (6–10). Mechanisms involved in the immunostimulatory effect of the pineal gland are not well understood, but some evidence suggests that the release of opioid peptides,

Received July 11, 1995; returned for revision August 22, 1995; accepted September 20, 1995.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Juan M. Guerrero, University of Seville School of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Avda Sanchez Pizjuan 4, 41009-Seville, Spain.

interleukin-2 (IL-2), and IL-4 (11) by CD4⁺ T-lymphocytes may participate in the mechanism by activating, at least, natural killer activity (12) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (13,14). The immunoenhancing effect of melatonin also may be responsible for the reported antitumoral function of the pineal gland (15).

The effect of melatonin on the immune system is also supported by the existence of specific binding sites for melatonin in lymphoid cells (16,17). We have previously described the presence of binding sites for melatonin in human lymphocytes (18,19): a high affinity binding site ($K_d = 5$ nM) which apparently is not coupled to cyclic nucleotide production, and a low affinity binding site ($K_d = 208$ nM) coupled to cyclic guanosine monophosphate production. We also have provided evidence for the presence of low-affinity melatonin binding sites ($K_d = 2,000$ nM) in human granulocytes (20). In other species, melatonin binding sites have been described in spleens of mouse, guinea pig, duck, chicken, and pigeon with K_d values in the 0.1 nM range (21–23). Similar findings have been shown in the rat thymus, where the K_d value of the melatonin binding site is in the 1 nM range (24,25). We also have recently described the presence of high-affinity binding sites for melatonin in rat splenocytes exhibiting a dissociation constant of 0.39 nM (26).

In this article we study the diurnal modifications in the binding of melatonin to rat thymus and the effects of continuous light exposure and pinealectomy. Results support the hypothesis of a regulatory role of melatonin in the immune system in which melatonin downregulates its own binding site.

MATERIALS AND METHODS

Materials

2-[¹²⁵I]iodomelatonin was purchased from the Radio Chemical Centre (Amersham, England). The specific activity of the radioligand was 1,900–2,175 Ci/mmol and was used for 60 days. Purity of the radioligand was checked by silica gel column chromatography (SGCC) and was >95%. Melatonin and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Other drugs were obtained from commercial sources.

Animals and Membrane Preparations

Male wistar rats (6–8 weeks of age) born in our animal facilities were used. Animals received food and water ad libitum, were maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and exposed to an automatically regulated light:dark (L:D) cycle of 14:10 h; unless otherwise specified, the light was turned off daily from 19:00 through 05:00 h. When required, animals were pinealectomized. Neonatal pinealectomy was performed within the 48 h after birth, deep hypothermia being used as the anesthetic. Sham-pinealectomized neonates were used as controls. The animals were killed by decapitation at the times indicated, and the thymus, free from parathymic lymphonodes, was rapidly dissected. Tissues were homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, with 4 mM CaCl₂ and centrifuged at 30,000 g for 30 min. Pellets (partially purified membranes) were washed twice with homogenization buffer and resuspended in the same buffer. Membrane preparations were stored at -80°C until used for binding assays. Protein concentration was determined by the method

of Lowry et al. (27) using BSA as standard.

Binding Studies

Binding assay conditions were as previously described for lymphocyte studies (19,20,24–26,28). Briefly, membranes (2 mg/ml) were incubated with [¹²⁵I]melatonin (100 pM) in 35 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 50 mM NaCl and, when necessary, native melatonin, in a total reaction volume of 100 µl. Reaction was initiated by the addition of membranes, performed at 15°C for 60 min, and terminated by the addition of 100 µl ice-cold 35 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. Membrane-bound [¹²⁵I]melatonin was separated by centrifugation, then washed with 10% saccharose, and the radioactivity was determined. Data are reported as specific binding, i.e., total tracer bound minus the amount of tracer that was not displaced by 100 µM melatonin (<40% of total binding). No detectable degradation of [¹²⁵I]melatonin during the incubation occurred as SGCC of aliquots of the incubation medium taken before and after incubation showed similar amounts of radioactivity (98%) in the position of [¹²⁵I]melatonin.

Values are expressed as the mean ± standard error (SE). Data were statistically analyzed using an analysis of variance (ANOVA) followed by a Student-Newman-Keuls multiple range test.

RESULTS

Binding of [¹²⁵I]melatonin by rat thymus membranes exhibited a diurnal profile (Fig. 1). Binding increased during the daytime and reached maximal values before entering the dark period. Then, binding decreased rapidly during the dark phase. In rats kept in light at night, binding of [¹²⁵I]melatonin by membranes measured at 21:00, 01:00, and 05:00 h was significantly higher than in animals that entered the normal dark period. In fact, binding values were similar to those found during the day.

The following studies were performed in order to determine whether melatonin pro-

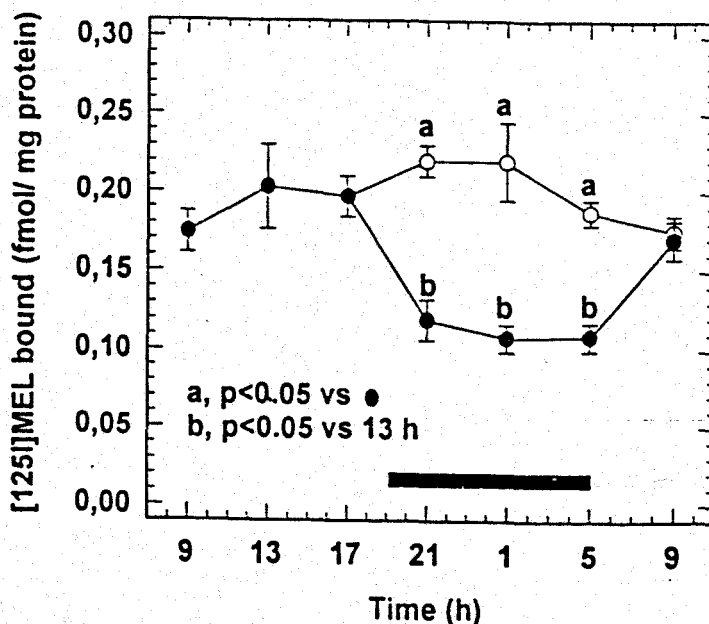


FIG. 1. Circadian rhythm and effect of light exposure at night on [¹²⁵I]melatonin binding to rat thymus membranes. On the day of the experiment, animals were maintained under the normal daily 14:10 light-dark (L:D) cycle (●—●) or under light exposure at night (○—○). Animals were killed at the times indicated and thymus was collected for [¹²⁵I]melatonin binding determinations. Membranes (2 mg/ml) were incubated with [¹²⁵I]melatonin (100 pM) at 15°C for 60 min. The filled bar indicates the dark period for control animals. Each point is the mean ± standard error of five experiments performed in triplicate.

duction by the rat could modulate binding of melatonin by thymus membranes. Thus, neonatal pinealectomy, which suppresses the melatonin circadian rhythm, led to an increase in melatonin binding of 106% (Fig. 2). An additional experiment was performed maintaining the animals under continuous light exposure, which results in a functional "pinealectomy." Figure 3 shows that light exposure increased binding of melatonin by thymus membranes. Binding increased progressively in a time-dependent manner until reaching maximal values at 3–5 days of light exposure.

DISCUSSION

Melatonin is the primary indoleamine hormone produced by the pineal gland. The synthesis and secretion into the bloodstream occur preferentially during the dark period because of an activation of the adrenergic, sympathetic neurons that innervate the

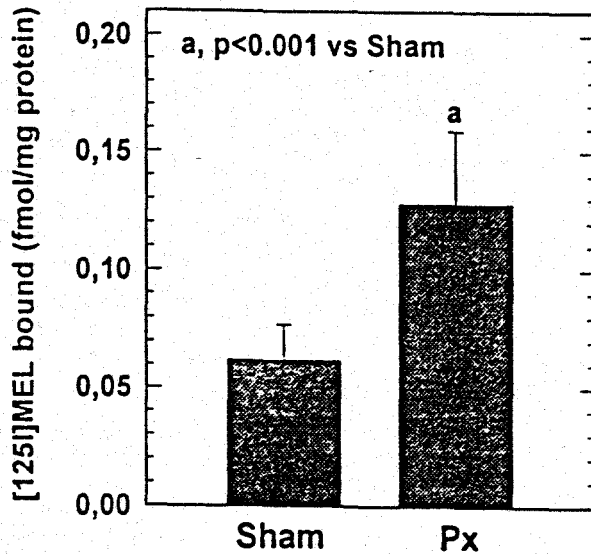


FIG. 2. Effect of pinealectomy on [¹²⁵I]melatonin binding to rat thymus membranes. Newborn animals were pinealectomized (Px) or sham operated (Sham) and were killed 3 weeks later. Membranes (2 mg/ml) were incubated with [¹²⁵I]melatonin (100 pM) at 15°C for 60 min. Each point is the mean ± standard error of six experiments performed in triplicate.

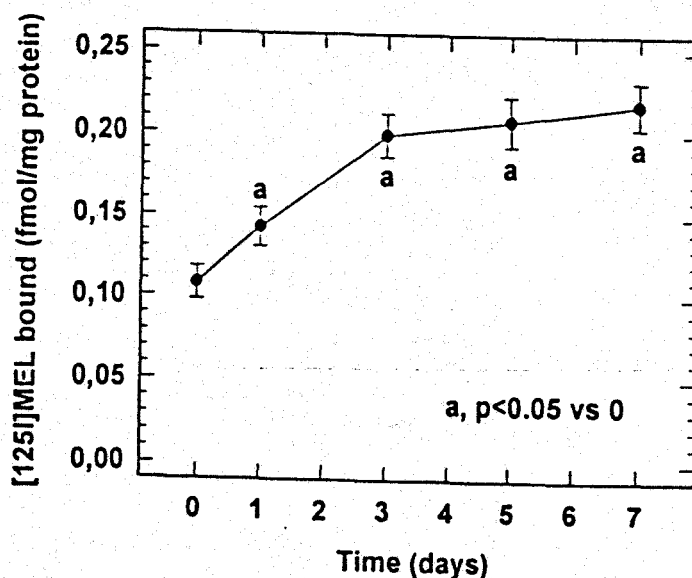


FIG. 3. Effect of continuous light exposure on [¹²⁵I]melatonin binding to rat thymus membranes. Rats were exposed to constant light for the days indicated; then thymus membranes were isolated and incubated (2 mg/ml) with [¹²⁵I]melatonin (100 pM) for 60 min at 15°C. Each point is the mean ± standard error of seven experiments performed in triplicate.

pineal gland. The melatonin synthesis is under the control of the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in the hypothalamus (1). Thus, the nocturnal melatonin signal is thought to be a chemical transducer of information about the light:dark cycle.

Melatonin binding sites in rat thymus have been previously described by our group (24,25). The binding was shown to be dependent on time and temperature, stable, saturable, and reversible. Concentration-dependent binding of [¹²⁵I]melatonin to thymus membranes was saturable and resulted in a linear Scatchard plot, suggesting binding to a single class of binding sites. The K_d for this single site was 0.47 nM, a value similar to the serum melatonin concentrations at night in adult rats (0.2–0.3 nM), possibly allowing melatonin binding sites in the thymus to recognize circulating melatonin (29). In the present article we have studied the effect of three different experimental conditions that decrease serum melatonin levels on binding of [¹²⁵I]melatonin by rat thymus membranes.

The results show that there is an inverse relationship between melatonin production and melatonin binding by the thymus. Thus, during the light/dark cycle, melatonin binding was high during the day, when serum melatonin concentration is low; at night, when serum melatonin is high, binding of the hormone by thymus was low. However, maintaining the animals under light exposure at night, the decrease in melatonin binding was completely prevented. In this study, binding of [¹²⁵I]melatonin to rat thymus membranes increased in animals after pinealectomy or under constant light exposure, which is considered as functional pinealectomy. Both experimental conditions are also associated with low serum concentrations of melatonin. Although stoichiometric studies remain to be performed after pinealectomy or continuous light exposure, previous results in rat spleen suggest that these changes in the binding of melatonin to thymus membranes are associated with changes in the binding capacity rather than to changes in the affinity of the receptor (21,26). Our results agree with previous investigations that a diurnal rhythm exists in the binding capacity of [¹²⁵I]melatonin in different tissues (30–33). On the contrary, injection of melatonin resulted in a dose-dependent decrease in the density of melatonin receptors in the spleen of the guinea pig (34). Results from studies on binding sites and the diurnal responses of the animal to exogenous administration of melatonin also show that sensitivity to melatonin appears to be inversely related to the levels of endogenous hormone in the animal. Because the inhibitory effect of melatonin on the neuroendocrine-reproductive axis in the late afternoon, but not in the morning, Reiter et al. (35) suggested that the changed sensitivity of the animal might be related to alterations in the response of melatonin receptors; i.e., when the melatonin level was high, it produced a desensitization of the receptors. However, late in the light period, the receptors may have become responsive (35). Although kinetic and stoichiometric characteristics of melatonin receptors in the thymus appear to be different from those described in the central nervous system (36), our results also support this hypothesis. Thus, when animals were maintained under light exposure, after pinealectomy, or late in the light period, endogenous melatonin levels remain low and, consequently, melatonin binding increased. However, the mechanism of melatonin receptor regulation requires further investigation.

In conclusion, rat thymus membranes specifically bind melatonin with an affinity that is compatible with a physiological role of the hormone in this organ. Moreover, this binding is regulated by the serum concentrations of the hormone under the experimental conditions studied. Therefore, results report the hypothesis of a regulatory role of melatonin

on the thymus function in which melatonin downregulates its own binding site.

REFERENCES

1. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiologic interactions. *Endocr Rev* 1991;12:151-80.
2. Vaughan MK, Hubbard GH, Champney TH, Vaughan G, Little JC, Reiter RJ. Splenic hypertrophy and extramedullary hematopoiesis induced in male Syrian hamster by short photoperiod or melatonin injections and reversed by melatonin pellets or pinealectomy. *Am J Anat* 1987;179:131-6.
3. Pierpaoli W, Yi C. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. *J Neuroimmunol* 1990;27:99-109.
4. Lissoni P, Barni S, Tancini G, et al. Immunotherapy with subcutaneous low-dose interleukin-2 and the pineal indole melatonin as a new effective therapy in advanced cancers of the digestive tract. *Br J Cancer* 1993;67:1404-7.
5. Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992;18:91-113.
6. Maestroni GJM, Conti A. Beta-endorphin and dinorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int J Immunopharmacol* 1989;11:333-40.
7. Maestroni GJM, Conti A. The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4⁺, Thy-1 cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J Neuroimmunol* 1990;28:167-76.
8. Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. I. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol* 1986;13:19-30.
9. Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol* 1987;68:384-91.
10. Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 1988;63:465-9.
11. Maestroni GJM. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* 1995;18:84-9.
12. Del Gobbo V, Libri V, Villani N, Calio R, Nistico G. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol* 1986;5:567-71.
13. Giordano M, Palermo MS. Melatonin induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Pineal Res* 1991;10:117-21.
14. Giordano M, Vermeulen M, Palermo MS. Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. *FASEB J* 1993;7:1052-4.
15. Blask DE, Hill SM, Pelletier DB, Anderson JM, Lemus-Wilson A. Melatonin: an anticancer hormone of the pineal gland. *Adv Pineal Res* 1989;3:259-63.
16. Guerrero JM, Calvo JR, Osuna C, Lopez-Gonzalez MA. Binding of melatonin by lymphoid cells in humans and rodent. *Adv Pineal Res* 1994;7:109-17.
17. Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Pozo D, Guerrero JM. Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J Pineal Res* (in press).
18. Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuna C, Guerrero JM. Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulation by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP production. *J Pineal Res* 1992;12:97-104.
19. Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuna C, Rubio A, Guerrero JM. Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating cyclic AMP production in human lymphocytes. *J Pineal Res* 1992;12:174-81.
20. Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Segura JJ, Guerrero JM. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotech Ther* 1993;4:253-62.
21. Pang CS, Pang SF. High affinity specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken. *J Pineal Res* 1992;12:167-73.
22. Poon AMS, Pang SF. 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sci* 1992;50:1719-26.
23. Yuan H, Pang SF. [¹²⁵I]iodomelatonin-binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variation. *J Endocrinol* 1991;128:475-82.
24. Lopez-Gonzalez MA, Martin-Cacao A, Calvo JR, Reiter RJ, Osuna C, Guerrero JM. Specific binding of 2-[¹²⁵I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J Neuroimmunol* 1993;45:121-6.
25. Martin-Cacao A, Lopez-Gonzalez MA, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Binding of 2-[¹²⁵I]melatonin by rat thymus membranes during postnatal development. *Immunol Lett* 1993;36:59-64.
26. Rafii-El-Idrissi M, Calvo JR, Pozo D, Harmouch A, Guerrero JM. Specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production. *J Neuroimmunol* 1995;57:171-8.

27. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
28. Guerrero JM, Prieto JC, Elorza FL, Ramirez R, Goberna R. Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. *Mol Cell Endocrinol* 1981;21:151-60.
29. Reiter RJ. Normal patterns of melatonin in the pineal gland and body fluids of human and experimental animals. *J Neural Transm Suppl* 1986;21:35-54.
30. Zisapel N, Nir I, Moshe L. Circadian variations in melatonin-binding sites in discrete areas of the male rat brain. *FEBS Lett* 1988;232:172-6.
31. Laitinen JT, Castren E, Vakkuri O, Saavedra JM. Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 1989;124:1585-7.
32. Liu ZM, Pang SF. [¹²⁵I]melatonin-binding sites in the bursa of Fabricius of birds: binding characteristics, sub-cellular distribution, diurnal variations and age studies. *J Endocrinol* 1993;138:51-7.
33. Vanecek J, Kosar E, Vorlijek J. Daily changes in melatonin binding sites and the effect of castration. *Mol Cell Endocrinol* 1990;73:165-70.
34. Poon AMS, Pang SF. Modulation of 2[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the guinea pig spleen by melatonin injection is dependent on the dose and period but not the time. *Life Sci* 1994;19:1441-8.
35. Reiter RJ, Petterborg LJ, Trakulrunsi C, Trakulrunsi WK. Surgical removal of the olfactory bulbs increases sensitivity of the reproductive system of female rats to the inhibitory effects of late afternoon melatonin injection. *J Exp Zool* 1980;212:47-52.
36. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *TIPS* 1995;16:50-6.

2. COMENTARIO Y DISCUSIÓN

La melatonina es la principal hormona indolamina producida por la glándula pineal. La síntesis y secreción al torrente circulatorio ocurre preferentemente en el periodo de oscuridad debido a la activación de las neuronas simpáticas adrenérgicas que inervan la glándula pineal. La síntesis de melatonina esta bajo control del reloj circadiano en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Reiter, 1991). La señal de melatonina nocturna parece ser un transductor químico de la información acerca del ciclo luz-oscuridad.

La K_d de los receptores de melatonina (0,47 nM) tiene un valor similar a las concentraciones de melatonina sérica nocturna en ratas adultas (0,2 - 0,3 nM) permitiendo que los receptores de melatonina tímicos reconozcan los niveles de melatonina circulante (Reiter, 1986).

Este artículo estudia el efecto de tres condiciones experimentales diferentes que disminuyen los niveles de melatonina sérica sobre la unión de melatonina marcada a membranas de timo de rata.

Los resultados indican que hay una relación inversa entre la producción de melatonina y la unión de melatonina al timo. Durante el ciclo luz-oscuridad, la unión de melatonina era mayor durante el día, cuando la concentración de melatonina sérica es baja; por la noche, cuando la melatonina sérica es alta, la unión de la hormona por el timo era baja. Además, el mantenimiento de los animales a una exposición de luz continua durante la noche, impidió completamente el descenso en la unión de melatonina al timo. También la unión de melatonina marcada a membranas tímicas de ratas incrementó en estos animales después de la pinealectomía o bajo la exposición a luz continua, que es considerada como una pinealectomia funcional. Ambas condiciones experimentales están también

asociadas con bajas concentraciones séricas de melatonina. Aunque estudios estequiométricos deberían realizarse después de pinealectomía o exposición a luz continua, resultados previos en bazo de ratas sugieren que estos cambios en la unión de melatonina a membranas de timo están asociados con cambios en la capacidad de unión mas que con cambios en la afinidad del receptor (Pang, 1992 y Rafii-El-Idrissi et al., 1995).

Nuestros resultados concuerdan con las investigaciones previas de que existe un ritmo diario en la capacidad de unión de melatonina marcada a diferentes tejidos (Zisapel et al., 1988 y Vanecek, 1990)

Asimismo, la inyección de melatonina resulta en una disminución dependiente de la dosis en la densidad de receptores de melatonina en bazo de cobaya (Poon y Pang, 1994). Debido a los efectos inhibitorios de la melatonina sobre el eje neuroendocrino-reproductivo por la tarde, pero no por la mañana, se ha sugerido (Reiter et al., 1980) que este cambio en la sensibilidad del animal podría estar relacionado con alteraciones en la respuesta de receptores de melatonina; es decir, cuando el nivel de melatonina era alto, se producía una desensibilización de receptores. Además, durante la última fase del periodo de luz los receptores podrían comenzar a responder (Reiter., et al 1980). Aunque las características cinéticas y estequiométricas de los receptores de melatonina en el timo parecen ser distintas de los descritos en el sistema nervioso central, nuestros resultados también apoyan esta hipótesis. Así, cuando los animales eran mantenidos bajo exposición a luz continua, sometidos a pinealectomía o durante la última fase del periodo de luz en el ciclo luz-oscuridad, los niveles de melatonina endógena permanecen bajos y consecuentemente la unión de melatonina incrementa.

CONCLUSIONES

Primera. La unión de melatonina a la preparación de membranas de timo es dependiente del tiempo de incubación, la temperatura y de la concentración proteínas de membrana. Las condiciones de mayor estabilidad son las de incubación a quince grados centígrados durante una hora con un miligramo por mililitro de concentración de proteínas.

Segunda La unión de melatonina a las membranas es reversible con un tiempo de semidisociación de aproximadamente cinco minutos.

Tercera. La unión de melatonina a las membranas se inhibe con concentraciones crecientes de melatonina fría con una IC^{50} de 8,32 nM.

Cuarta. La unión de melatonina a las membranas se satura incrementando la concentración del radioligando. La representación de Scatchard muestra una sola población de receptores con una K_d de 0,47 nM.

Quinta. Los estudios farmacológicos indican que solo la melatonina y en menor potencia la 6-hidroximelatonina son capaces de inhibir la unión del radioligando a las membranas.

Sexta: Los estudios de desarrollo postnatal muestran que la unión de melatonina a las membranas de timo es máxima en ratas recién nacidas, disminuyendo progresivamente durante las primeras semanas de vida. Esta disminución se debe a cambios en la capacidad de unión mas que a cambios en la afinidad.

Séptima: La unión de melatonina a las membranas muestra un ritmo circadiano con unión máxima durante el día y mínima durante la noche.

Octava: La exposición de los animales a luz continua, hasta una semana, muestra un aumento de la unión de la melatonina a la preparación de membranas que es proporcional al tiempo de exposición a la luz.

Novena: La pinealectomía provoca un aumento de unión de la melatonina a las membranas de timo.

Conclusión General: En la preparación de membranas de timo de rata existen sitios de unión de alta afinidad y especificidad para la melatonina. Estos sitios de unión pueden estar regulados por la propia melatonina ya que cuando los niveles de la hormona son bajos, por ejemplo en las ratas recién nacidas, durante el día, por exposición a la luz continua o tras pinealectomía, se incrementa notablemente la capacidad de unión a las membranas.

BIBLIOGRAFÍA

Adam C. y Tannery P. eds. (1974). *En Rene Descartes, Ouvres. Vol. XI.* Vrin, Paris.

Akano S. F., Cascio C. S., Shinsako J y Dallman M. F. (1985). Corticosterone narrow range required for normal body and thymus weight and ACTH. *Am J Physiol*, 219:527- 532..

Allen D. J., Allen J. S., Didio L. J. S. y McGrath J. A. (1981). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis of the human pineal body with emphasis on calcareous concretions. *J Submicrosc Cytol*, 13:675-695.

Arendt J., Ho A. K., Land C. A., Marston A. Nohira V. Isymons A.M. (1981). Differential effect of benserazide. (Ro4-4602). On the concentration of indolamine in rats pineal and hypothalamus. *Br J Pharmacol*, 22: 257-262.

Arendt J., Laud C. A. y Symons A. M. (1983). Plasma melatonin increases in ewes following ovariectomy. *J Reprod Fertil*, 68: 213-218.

Arendt J. (1985 a). Mammalian Pineal rhythms. *En Pineal Research Reviews.* (Reiter R. J. ed.). Liss A. R. Nueva York. Vol 3: 161-213.

Arendt J. (1985 b). Assay of melatonin and its metabolites. Results in normal and unusual environments. *En Melatonin in Humans.* (Wurtman R. J. y Waldhauser F. eds.) Viena: 11-32.

Arendt J. (1988). Melatonin: review . *Clin Endocrinol*, 29: 205-229.

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

Bardasano Rubio, J. L. (1979). En *La Glandula Pineal*. H. Blume Ediciones. Madrid: 13-52.

Bargmann W. (1943). *Die Epiphyse cerebri*. Von Moellendorff. En *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, VI/4'. Springer. Berlin: 309-505.

Berman L. (1921). En *The Glands Regulating Personality*. McGrath College Park.

Blask D. E. (1984). *The Pineal Gland*. (Reiter R. J. ed.). Raven Press Nueva York: 253-285.

Blask D. E. y Hill S. M. (1986). Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm*, 21 (supl) : 433-444.

Blask D. E., Hill S.M., Pelletier D. B., Anderson J. M., y Lemus-Wilson A. (1989). Melatonin: An anticancer hormone of the pineal gland. *Adv Pineal Res*, 3: 259-263.

Bloom W. y Fawcett D. W. (1973). *Epifisis o Cuerpo Pineal*. En *Tratado de Histologia*. Labor ed. Buenos Aires. Capitulo 21: 537-544.

Brzezinski A., Seibel M. M., Lurch H. J., Deng M. H. y Wurtman R. J. (1987). Melatonin in human preovulatory follicular Fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, 64: 865-867.

Burdach, K. F. (1819-1826). vom Baue und leben des gehirns. On the structure and life of the Brain. Dyk, vol. I, II y III. Leipzig.

Calvo J. R., Molinero P., Jimenez J., Goberna R. y Guerrero J. M. (1986). Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with rat lymphoid cells. *Peptides*, 7: 177-181.

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

Cardarelli N. F. (1990). The role of the thymus-pineal gland axis in an immune mechanism of aging. *J Theor Biol.*: 145: 397- 405.

Cardinali D. P., Vacas M. I. y Boyer E. E. (1979). Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinol*, 105 (2): 437-441.

Cardinali D. P., Vacas M. I. y Gejman P. V. (1981). The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. *J Neural Transm*, 52: 1-21.

Carrascal E. (1991). En *Histologia Universidad de Salamanca* ed. Salamanca 2ª edic. Capitulo 56 y 60 : 31- 34 y 55-58.

Castiglioni, A. (1931). En: *Historie de la Medicine*. Payot. Paris.

Claustrat B., Brun J. y Brun J. (1981). Melatonin secretion in man: stimulating Effect of destyrosinegamma- endorphin. *Neuroendocrinol Letters*, 3: 35-37.

Cohen M., Roselle D. y Chabner B. (1978). Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature*, 274: 894-895.

Colombo L. L., Chem G. J., Lopez M. C. y Watson R. R. (1992). *Immunol Lett* 33: 123.

Cowen P. J., Fraser S., Sammons R. y Green A. R. (1983). Atenolol reduces plasma melatonin concentrations in man. *J Clin Pharmacol*, 15: 579-581.

Craft C. M., Morgan W. W. y Reiter R J. (1984). 24 Hour changes in catecholamine synthesis in rat and hamster pineal glands. *Neuroendocrinol*, 38: 193-198.

Csaba G., Fischer J. y Acs T. (1966). The effect of pinealectomy and thymectomy on the immune capacity of the rat. *Experientia*, 22: 168-169.

Deguchi T. y Axelrod J. (1972). Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. *Anal Biochem*, 50: 174-179.

Del Gobbo V., Ilibri V., Villani N., Calio R. y Nistico G. (1989). Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int. P J Immunopharmacol*, 11(5): 567-573.

Deveceski V. (1963). Contributions à l'étude de l'effet de Lépiphysectomie sur. L'histophysiologie du thymus. Acta Anat, 54:352-353.

Dubocovich M. L. y Takahashi J. S. (1987). Use of 2-[¹²⁵I] iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina Pro. Natl Acad Sci USA, 84: 3916-3920.

Dubocovich M. L. (1988 a). Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. J Pharmacol Exp Therap, 246 (3): 902-910.

Dubocovich M. L. (1988 b). Pharmacology and function of melatonin receptors. FASEB J, 2: 2.765-2.763.

Duncan M. J., Takahashi J. S. y Dubocovich M. L. (1989). Characteristics and autoradiographic localization of 2-iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. Endocrinol, 125 (2): 1.011-1.018.

Ebels I. y Benson B. (1978). A survey of the evidence that unidentified pineal substances affect the reproductive system in mammals. En Progress in Reproductive Biology. (Reiter R. J. y Karger S. eds). Hubinont P. O. ed . Nueva York. Vol 4 : 51.

Ebels I., de Morée A., Hus-Citharel A. y Moszkowska A. (1979). Survey of some active sheep pineal fractions and a discussion on the possible significance of pteridines in those fractions in bitro and in vivo assays. J Neural Transm, 44: 97.

Edinger, L. (1900). Vorlesungen über den Bau der Nervösen Centralorgane des Menschen und der Thiere. Vogel. Leipzig.

Engel, P. (1936). Die Physiologische und pathologische Bedeutung der Zirbeldrüse, ERGEB. Inn Med Kinderheilk, 50: 116.

Fabre L. F., Banks R. C., McIsaac W. M. y Farrell G. (1965). Effects of ubiquinone and related substances on secretion of aldosterone and cortisol. Am J Physiol, 208: 1275.

Farreras P. y Rozman C. (1988). Organos y células del sistema inmunitario En Medicina Interna. Doyma ed. Barcelona. 11ª edic. Vol 2. Capítulo 20:2593-2596.

Fawcett D.W. (1994). Glándula pineal. En Tratado de Histología. Emalsa Interamericana. Madrid. 11ª edic. Capítulo 14 y 21: 441-453 y 541-548.

Fiske V. M. (1941). Effect of light on sexual maturation, estrous cycles and anterior pituitary of the rat. Endocrinol, 29: 187.

Fiske V. M. (1960). Effect of the light on the weight of the pineal in the rat. Endocrinol, 66: 489.

Foa, C. (1912). Inertrofia dei testicoli e della cresta dopo l'asportazione della ghiandola pineale del gallo. Arch Ital Biol, 57: 233-252.

Folkard S., Wever R. A. y Wildgruber C. M. (1983). Multi-oscillatory control of circadian rhythms in human performance. *Nature*, 305: 223-225.

Ganong W. F. (1994). Otros organos endocrinos. En *Fisiologia Medica*. El Manual Moderno S.A. ed. Mexico D.F. 14ª edic. Capitulo 24: 422-424.

Garbarg M., Julien C. y Schwartz J. C. (1974). Circadian rhythm of histamine in the pineal gland. *Life Sci*, 14: 539-546.

Geneser F. (1990) Glandulas endocrinas. En *Histologi*. (Ida, ed.). Munksgaard. Copenhagen. Capitulo 21: 513-517.

Genta G. E. y Hill H. R. (1976). Paradoxical influence of cyclic AMP and cyclic GMP on human monocyte chemotactic responses. *Clin Res*, 24: 180 A (abstrac).

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

Giordano M., Vermeulen M. y Palermo M. S. (1993). Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. *Faseb J*, 7: 1052-1054.

Goette, A. (1875). Die Entwicklungsgeschichte der Unke (Bombinator igneus) als Grundlage einer vergleichenden Morphologie der Wirbelthiere. Mit einem Atlas von 22 Tafeln. Voss. Leipzig.

Gómez de la Concha E. (1992). Organos y celulas del sistema inmune. En *Inmunologia*. Idepsa ed. Madrid. Captulo I: 14-24.

Green J. P., Day M. y Robinson J. D. (1962). Some acidic substances in neoplastic mast cells and in the pineal body. *Biochem Pharmacol* 11: 957-961.

Greenberg L.H. y Weiss B. (1978). Beta-adrenergic receptors in aged rat brain. Reduced number and capacity of pineal gland to develop supersensitivity. *Science*, 201: 61- 63

Guerrero J. M., Prieto J. C., Elorza F. L., Ramirez R. y Goberna R. (1981) Interreaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cell. *Mol Cel. Endocrinol*, 21: 151-160.

Guerrero J. M. y Reiter R. J. (1992). A Brief Survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endor Res*, 18: 91-113.

Guerrero J. M., Calvo J. R., Osuna C., y López González M. A. (1994). Binding of melatonin by lymphoid cell in humans and rodent. *Adv Pineal Res*, 7: 109-117.

Gupta D. (1986). The pineal gland in relation to growth and development in children. *J Neural Transm*, (suppl) 21: 217-232

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

Hewig S. M. (1980) . Cerebrospinal fluid-contacting area in the pineal recess of the vole (*Microtus agrestis*), guinea pig (*Cavia cobaya*), and rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Cell Tiss Res*, 209: 473-484.

Hill S. M. y Blask D. E. (1988). Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res*, 48: 6.112-6.126.

Hirata F., Hayaishi O., Takuyama T. y Senoh S. (1974). In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem*, 249: 1311.

Iguchi H., Kato K. I. y Ibayashi H. (1982). Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 55: 27-29.

Illnerova H. y Vanecek J. (1982). Complex control of the circadian rhythm in N-acetyltransferase activity in the rat pineal gland. En *Vertebrate Circadian System*. (Aschoff J, Daan S. y Groos G. eds). Springer Verlag. Berlin: 285-296.

Jankovick B. D., Isakovick K. y Petrovic S. (1970). Effect of pinealectomy on immune reaction in the rat. *Immunology*, 18: 1-6.

Jones R. L., McGeer P. L. y Greiner A. C. (1969). Metabolism of exogenous melatonin in schizophrenic and non - schizophrenic volunteers. *Clin Chim Acta*, 26: 281- 285

Juillard M. T. (1979). The proteinaceous and possible physiological significance of dense- cored vesicles in hamster and mouse pinealocytes. *Ann Biochem Biophys*, 19: 413-428.

Junqueira L. C. y Carneiro J. (1987). En *Histologia Basica*. (Salvat eds.). Barcelona. 3ª edic. Capitulo 14 y 20: 291-299 y 446-448

Kahle W. , Leonhardt H. y Platzer W. (1977). En *Atlas de Anatomia*. Omega ed. Barcelona. Vol 3: 159.

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

Karasek M. (1983). Ultrastructure of the mammalian pineal gland: its comparative and functional aspects. En *Pineal Research Reviews* (Reiter R. J. ed.). Allan R. Liss. Nueva York. Vol 1: 1-48.

Kelly, D. E. (1968). Pineal Anatomy. En *The Pineal* (Wurtman, R. J. Axelrod, J. y Kelly, D. E. eds). Academic Press. Cap. New York.

Kelly, D. E. (1971). Develop mental aspects of amphibian pineal systems. En *The Pineal Gland, un Simposium de la Fundación CIBA*. Wolstenholme, G.E.V. y Knight, J. eds. Shurchill Livingstone. Edimburgo: 53

Kendall M. D. ed. (1981). En *The Thymus Gland*. Academic Press. London. Cap. 2, 3, 4, 6, 7 y 8: 21-111 y 113-177

Kennaway D. J., Gilmore T. A. y Seamrk R. F. (1982). Effectes of melatonin implants on the circadian rhythm of plasma melatonin and prolactin in sheep. *Endocrinol*, 110. 2186- 2188.

King T. S., Steinlechner S. y Reiter R. J. (1984). Day - Night differences in stimulated rates of 5-hydroxytryptamine turnover in the rat pineal gland. *Exp Brain Res*, 54: 432-436.

King T. S. y Steinlechner S. (1985). Pineal indolalky lamine synthesis and metabolism: kinetic considerations. En *Pineal Research Reviews*. (Reiter R. J. ed). Liss A. L. Nueva York. Vol 3: 69-113.

Kirkwood E. y Lewis C. C. Principios básicos básicos. En *Inmunología Médica Básica*. EMALSA (1985) Madrid: 3-16

Kitay, J. I. y Altschule, M. D. (1954). En *The Pineal Gland. A Review of the Physiologic Literature*, Harvard University Press, Cambridge, Massachussetts.

Klein D. C. (1979). Circadian rhythms in the pineal gland. En *Endocrine Rhythms*. Krieger D. T. ed.). Raven Press. Nueva York: 203-223.

Klein D. C., Namboodiri M. A. A. y Auerbach D. A. (1981). *Life Sci* 28: 1975.

Kölliker A. (1850). *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere*. Engelmann. Leipzig.

Kopin I. J., Pare C. M., Axelrod J. y Weissbach H. (1961). The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem*, 236:3072

Kothari L. S. (1987). Influence of chronic melatonin on 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene-induced mammary tumors in female Holtzman rats exposed to continuous light. *Oncol*, 44: 64-66.

Kühn C. G. (1822). En Claudii Galeni Opera Omnia, vol. XX. Leipzig. (Reimpreso 1964, por G. Olms, vol. II y III, Hildesheim.).

Kveder S. y Mclsaac W. M. (1961). The metabolism of melatonin (N-acetyl-5-metoxytryptamine) and 5-metoxytryptamine. J Biol Chem, 236: 3214.

Laitinen J. T., Castren E., Valkkuri O. y Saavedra J. M. (1989). Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. Endocrinology, 124: 1585-1587.

Laitinen J. T. y Saavedra J. M. (1990). Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cation and guanine nucleotides. Endocrinology, 126: 2110-2115.

Laitinen J. T., Flügge G. y Saavedra J. M. (1990). Characterization of melatonin receptors in the rat area postrema: modulation of affinity with cation and guanine nucleotides. Neuroendocrinology, 51: 619-624.

Le Cat N. C. (1700). Traite des Sensations et des Passions en General et des Sens en Particulier. V. La Chapelle. Paris.

Leeson T. S., Leeson C. R. y Paparo A. A. (1989). En Texto / Atlas de Histologia. Nueva Editorial Interamericana. Mexico D.C. 1ª edic. Capitulo 9 y 14: 343-347 y 594-596.

Lerner A. B., Case J. D., Takahashi Y, Lee T. H. y Mori W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J Amer Chem Soc, 80: 2.587.

Lerner A. B., Case J.D. y Heinzelman R. V. (1959). Structure of melatonin. J Amer Chem Soc, 81: 6.084.

Lerner A. B. y Case J.D. (1960). Melatonin. Fed Proc, 19: 590-592

Lewinski A., Zelazowki P., Sewerynek E., Zerek-Melen G., Szkudlinski M. y Zelazowska E. (1989). Melatonin induced suppression of human lymphocyte natural killer J Pineal Res, 7: 153-164.

Lewy A. J., Wehr T. A., Goodwin F. K., Newsome D. A. y Markei S. P. (1980). Light suppresses melatonin secretion in humans. Science, 210: 1267-1269.

Leydig, F. (1868). Über Organe eines sechsten Sinnes. Nova Acta Acad. Leopold Carol 34-V: 1-108. Blochmann, Leipzig.

Lissoni P., Barni S., Tancini G., Ardizzoia A., Rovelli F., Cazzaniga M., Brivio F., Piperno A., Aldeghi R., Fossati D., Characiejus D., Kothairi L., Conti A., y Maestroni G. (1993). Immunotherapy with subcutaneous low-dose interleukin-2 and the pineal indole melatonin as a new effective therapy in advanced cancers of the digestive tract. Br J Cancer. 67: 1404-1407.

Liu Z. M. y Pang S. F. (1993) [¹²⁵I] Melatonin - binding sites in the bursa of fabricius of birds: binding characteristics, subcellular distribution, diurnal variations and age studies. J Endocrinol, 138: 51-57.

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

López-González M. A., Calvo J. R., Osuna C. y Guerrero J. M. (1992a). Interelation of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulation by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP production J Pineal Res. 12: 97-104.

López-González M. A., Calvo J. R., Osuna C., Rubio A. y Guerrero J. M. (1992b). Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. Neurosci Lett, 136: 150-152.

López- González m. A., Calvo J. R. , Osuna C., Rubio A. y Guerrero J. M., (1992c). Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating cyclic AMP production in human lymphocytes J Pineal Res, 12: 174-181.

López-González M.A., Calvo J. R., Segura J. J. y Guerrero J. M. (1993). Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. Biotech ther, 4: 253-262.

Lovenberg W., Weissbach H. y Undedfriend S. (1962). Aromatic L-amino acid decarboxylase. J Biol Chem, 237: 89-92.

Lowry O. H. Rosenbrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent J Biol Chem, 193: 265-275.

Lynch H. J., Jimerson D. C., Ozaki I., Post R. M., Bunney W. E. y Wurtman R. J. (1978). Entrainment of rhythmic melatonin secretion in man to a 12 hour phase shift imn the light/ dark cycle. Life Sci, 23: 1557-1563.

Lytle L. D., Hook K. A. y Torres G. (1988). Maturational changes in rat pineal gland neuronal mechanisms controlling its functions. *Pineal Res Rev*, 6: 172-199.

Maestroni G. J. M. y Pierpaoli W. (1981). *Psychoneuroimmunology*. (Ader R. ed.). Academic Press. New York: 405-425.

Maestroni G. J. M., Conti A. y Pierpaoli W. (1986). Role of the pineal gland in immunity. I. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol*, 13: 19-30.

Maestroni G. J. M. , Conti A y Pierpaoli W. (1987). Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol*, 68: 384-391.

Maestroni G. J. M., Conti A. and Pierpaoli W. (1988). Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology*, 63: 465-469.

Maestroni G. J. M. y Conti A. (1989). Beta-endorphin and dinorphin mimic the circadian immunoenhancing and anti-stress effects of melatonin. *Int. J Immunopharmacol*, 11: 333-340.

Maestroni G. J. M. y Conti A. (1990) . The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4⁺, thy-1⁺ cell to release opioid agonists with immunoenhancing and anti-stress properties. *J Neuroimmunol*, 28: 167-176.

Marburg, O. (1907). Zur Kenntnis der normalen und pathologischen Histologie der Zirbeldrüse. Arb. Wien. Neurol. Inst. , 17: 217.

Milcu S. M. y Pitis M. (1943). Contributions à l'étude de la corrélation thymo-épiphyssaire. Acta Endocr (Bucarest), 9: 13-15

Miles A., Philbrick D. R. S., Tidmarsh S. F. y Shaw D. M. (1985a). Direct radioimmuno assay of melatonin in saliva. Clin Chem, 31: 1412- 1413.

Miles A., Philbrick D.R.S., Shaw D.M., Tidmarsh S.F. y Pugh A. J. (1985b). Salivary melatonin estimation in clinical research. Clin Chem, 31: 2041-2042

Moore-Ede M. C., Czeisler C. A. y Richardson G. S. (1983). Circadian timekeeping in health and disease. part. 1ª. Basic properties of circadian pacemakers. N Engl J Med, 309: 469-476.

Moore K. L. y Persaud. (1995). En Embriología Básica. Nueva editorial interamericana. Mexico D. F. 4ª edic.: 134-135 y 251-252.

Morimasa T., Wirz-Justice., Krauchi K., Arendt J., Williner R., Feer H. y Sholimans (1993). Multiple effects of chronic metamphetanine on temporal organization. 5th Japanese Congress of Biological Psychiatry (abstrat)

Namboodiri M.A., Sugden D., Klein D. C. y Mefford I. N. (1983). 5-hydroxytryptophan elevates serum melatonin. Science, 221: 659-661.

Niles L. P., (1987). [³H] melatonin binding in membrane and cytosol fractions from rat y calf brain. J Pineal Res, 4: 89-98.

Niles L. P., Pickering D. S. y Sayer B. G. (1987). HPLC-purified 2-[¹²⁵I] iodomelatonin labels multiple binding sites in hamster brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 147 (3): 949-956.

Nir I. , Briel G., Dames W. y Neuhoff V. (1974). Pineal proteins and free amino acids during ontogenesis in rats. *Neuroendocrinol*, 14: 34.

Nir I. y Hirschmann N. (1978). Pineal N-acetyltransferase depression in rats exposed to heat. *Experientia*, 34: 1645-1646.

Oksche A. (1971). Sensory and glandular elements of the pineal organ. En *The Pineal Gland, un simposium de la Fundación Ciba* (Wolstenholme, G. E. W. y Knight J. eds.) Churchill Livingstone. Edimburgo: 127.

Oksche A. , Ueck M. y Rådeberg C. (1971). Comparative ultrastructural studies of sensory and secretory elements in pineal organs. En *Mem Soc Endocrinol*. Cambridge University Press. Londres. 19:7.

Owens D. W. y Gern W. A. (1981). The pineal gland and melatonin in sea turtles. *Abstracts of the Ninth International Symposium of Comparative Endocrinology*. Hong Kong: 232.

Pang C. S. y Pang S. F. (1992). High affinity specific binding of 2- [125] iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken. *J. Pineal Res*, 12: 167-173.

Pang A. M. S. y Pang S. F. (1992). 2 [125]iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sci*, 50: 1719-1726.

Pavel S., Goldstein R., Popoviciu I., Corfarin O., Foldes A. y Farkas E. (1979). Pineal vasotocin: R E M sleep dependent release into cerebrospinal fluid of man. *Waking sleeping*, 3: 347-352.

Pearse A. E. (1969). The citochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and the embryology, physiology, and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem*, 17: 303.

Persengiev S., Marinova C. H. y Patchev V. (1991a). Steroid hormone receptor in the thymus: a site immunomodulatory action of melatonin. *Int J Biochem* 23: 1483- 1485.

Persengiev S., Patchev V. y Velez B. (1991b). Melatonin effects on thymus steroid receptor in the course of primery antibody responses: significance of circulating glucorticoid levels. *Int j Biochem*, 23: 1487-1489.

Piechowiak H. y Schnizer W. (1976). On electrolyte determinations in the pituitary and pineal gland: is there a diurnal rhythm. *Endokrinologie*, 67: 51.

Pierpaoli W. , Blakrishnan J., Yi C. X., Maestron G. J. M., Conti A., Sacke E. y Choay J. (1987). 15^a Int.Congress of Chemotherapy. Estambul.

Pierpaoli W. y Maestroni G. J. M. (1987). Melatonin: a principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its anti - ageing affects. *Inmmunol Lett*, 16: 355-362.

Pierpaoli W., y Yi C. (1990). The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. *J Neuroimmunol*, 27: 99-109.

Poon A. M. S. y Pang S. F. (1994). Modulation of 2[125 I] Iodomelatonin binding sites in the guinea pig spleen by melatonin injection is dependent on the dose and period but not the time. *Life Sci*, 19: 1441-1448.

Preslock J. P. (1984). The pineal gland: basic implications and clinical correlations. *Endocrine Reviews*, 2. Vol 5: 289-292.

Quay W. B. (1963 a). Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modification by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol*, 3: 473-480.

Quay W. B. (1963 b). Differential extractions for the spectrophotometric measurement of diverse 5-hydroxy and 5-metoxyindoles. *Analyt Biochem*, 5: 51.

Quay W. B. (1974). Pineal Chemistry in Cellular and Physiological Mechanisms. (Thomas Cg. C. ed.). Springfield Ill. Quay W. B. Pineal volume and latitudinal and cronobiological characteristics: Comparisons of five mammalian species. *Amer Zool*, 20: 898 (abstrac), 1980.

Quay W. B. (1981). General biochemistry of the pineal gland of mammals. En *The Pienal Gland, Anatomy and Biochemistry*. (Reiter J. R. ed.). Boca Raton. Vol 1: 174-198.

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

Regelson W. y Pierpaoli W. (1987). *Cancer Investig.*

Reissner, E. (1864). *Der Bau des centralen Nervensystems der ungeschwänzten Batrachier*. E. J. Karow, Dorpat.

Reiter R. J. y Hester R. J. (1965). Neuroendocrinological relationship. En *Metabolic Regulation of Physiologic Activity*. (Sacktor B., Reiter R. J., Wilson J. E. Smith H. J., Tiekert C. G. y Hester R. J. eds). Research Laboratory U. S. Army Edgewood Arsenal. Maryland: 13.

Reiter R. J. ed. (1978). *The Pineal and Reproduction*. *Progr Reprod Biol*. Karger. Basel. Vol 4.

Reiter R, J., Rollag M. D., Panke E. S. y Banks A. F. (1978). Melatonin: reproductive effects. *J Neural Transm*, 13 (supl): 209.

Reiter R. J., Petterborg L. J., Trakulrungsi C. y Trakulrungsi W. K. (1980). Surgical removal of the olfactory bulbs increases sensitivity of the reproductive system of female rats to the inhibitory effects of late afternoon melatonin injection. *J Exp Zool*, 212: 47-52.

Reiter R. J., Steinlechner S., Richardson B. A. y King T. S. (1983). Differential response of pineal melatonin levels to light at night in laboratory-raised and wild-captured 13-line ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*). *Life Sci*, 32: 2625-2629.

Reiter J. R., Esquicino A. I., Champney T. H., Craft C. M. y Vaughan M. K. (1985). Pineal melatonin production in relation to sexual development in the male rat. En: *Pediatric Endocrinology*. (Gupta D. Borrelli D. y Attanasio A. eds.). Croom and Helm. London: 190-202.

Reiter R. J. (1986). Normal patterns of melatonin in the pineal gland and body fluids of human and experimental animals. *J Neural Transm (suppl)*, 21: 35-54.

Reiter R. J. (1988). Neuroendocrinology of melatonin. En *Melatonin : Clinical perspectives*. (A.Miles D.R. S. Philbrick y Ch. Thompson eds). Oxford Medical Publications . Oxford : 1-42.

Reiter. R. J. (1991a). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiologic interactions. *Endocr Rew*, 12: 151-180.

Reiter R. J. (1991b). Pineal gland: Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol Metab*, 2: 13-19.

Reppert S. M., Perlow M. J. y Klein D. C. (1980). Cerebrospinal fluid melatonin. En *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid*. (Wood J. H. ed.). Plenum Publishers. Nueva York. Vol 1: 579-589.

Reppert S. M., Weaver D. R., Rivkees S. A. y Stopa E. G. (1988). Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*, 244: 78-81.

Robbins S. L., Cotran R. S. y Vinay K. (1989). Pathologic Basis of Disease. Saunders W. B. Company. Philadelphia. IV edici. Capítulos 5, 26 y 29.

Roitt I., Brostoff J. y Male D. (1991). En Inmunologia. Salvat. Barcelona. 2ª edic. Capítulos 3 y 9.

Rollag m. D., Morgan R. J y Niswender G. D. (1978). Route of melatonin secretion in sheep. *Endocrinol*, 102: 1.

Romijn H. J., Mud M. T. y Wolters P. S. (1977). A pharmacological and autoradiographic study on the ultrastructural localization of indolamine synthesis in the rabbit pineal gland. *Cell Tissue Res*, 185: 199-214.

Rubio A., Osuna C. y Guerrero J. M. (1991). β -and α -adrenergic mechanisms are involved in regulation of rat pineal type II thyroxine 5'-deiodinase activity during development. *Endocrinology*, 128: 1161-1167.

Rubio A., Guerrero J. M., Reiter R. J. y Osuna C. (1993). Regulation by β - and β adrenergic receptor of rat pineal N-acetyltransferase activity during development *Endocrinology*, 132: 393-398.

Sandler J. A., Clyman R. J., Manganiello V. C. y Vaughan M. (1975). The effect of serotonin (5-hydroxytryptamine) and derivatives on guanosine 3',5'-monophosphate in human monocytes. *J Clin Invest*, 55: 431-435 .

Scatchard G. (1949). The attractions of proteins form small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci*, 51: 660-672.

Schmidt R.F., Thews G. (1993). Endocrinología. En *Fisiología Humana*. (Mc. Graw-Hill-Interamericana España 1ª Edicc.) Madrid. Capítulo 17: 430.

Sizonenko P. C. y Lang U. (1988). Melatonin and human reproductive function. En *Melatonin: Clinical Perspectives*. (Miles A., Philbrick D. R. S. y Thompson Ch. eds). Oxford Medical Publications. Oxford: 62-78.

Smith J. A., Mee T. J. X. y Barnes J. D. (1978). Decrease in human melatonin concentration with age. *J Neural Transm*, 13 (supl): 396 (abstract).

Smith J. A., Barnes J. L. y Mee T. J. X. (1979). The effect of neuroleptic drugs on serum and cerebrospinal fluid melatonin concentrations in psychiatric patients. *J Pharm Pharmacol*, 31. 246-248.

Spalteholz W. (1976). *Atlas de Anatomía Humana*. Labor S. A. ed. Barcelona. 10ª edicc. Vol 3: 694, 696, 765, 766, 779.

Stevens A. y Stevens J. (1992). Sistema endocrino. En *Texto y Atlas de Histología*. Gower Medical Publishing. Londres. Capítulo 15: 14-15.

Sugden D. (1979). Circadian change in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J. Neurochem*, 33: 811-813.

Sugden D. y Klein D. C. (1983). Regulation of rat pineal hydroxyindole-0-methyltransferase in neonatal and adult rats. *J. Neurochem*, 40: 1647-1653.

Tapp E. (1980) . The Human Pineal Gland in Malignancy. J. Neural Transm. 48: 119-130.

Thompson C., Checkley S. A., Corn T., Franey C. y Arendt J. (1983). The own-regulation of pinela beta-adrenoceptores in depressed patients treated with desipramine. Lancet i:1101.

Vacas M.I. y Cardinali D. P. (1980). Binding sites for melatonin in bovine pial gland . Horm Res, 13: 121-131.

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

Vakkuri O., Lamsa E., Rahkamaa E., Ruotsalainen H. y Leppaluoto J. (1984 b). Iodinated melatonin: Preparation and characterization of the molecular structure by mass and ¹H NMR spectroscopy. Anal Biochem, 142. 284-289.

Vakkuri O. (1985). Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. Acta physiol Scand, 23: 151-154.

Vanecek J. (1988 a). The melatonin receptors in rat ontogenesis. Neuroendocrinol, 48: 201-203.

Vanecek J. (1988 b). Melatonin binding sites . J Neurochem, 51: 1436-1440.

Vanecek J. y Jansky L. (1989). Short days induce changes in specific melatonin binding in hamster median eminence and anterior pituitary. *Brain Res*, 477: 387-390.

Vanecek J., Kosar E., Vorlijek J. y Daily J. (1990). Changes in melatonin binding sites and the effects of castration. *Mol Cel Endocrinol*. 73: 165-170.

Vaughan G. M., Pelham R. W., Paud S. F., Loughling I., Wilson K. M., Sandock K. L., Waughan M. K., koslow S. H. y Reiter R. J. (1976). Nocturnal elevation of plasma melatonin and 5-hydroxyindole acetic acid in young men: attempts at modification by brief chages in environmental lighting and sleep and by autonomic drugs. *J Clin Endocrinol Metab*, 42: 552-764.

Vaughan M. K., Johnson L. I., Blask D. E., Brainard G. C., Dinh D. T., Petterborg L. J. y Reiter R. J. (1980). Effect of synthetic threonylserinyllysine (TSL), a proposed pineal peptyde, on reproductive organ weights and plasma and pituitary levels of LH, FSH and Prolactin in intact and castrated immature and adult male rodents. *Neuroendocrinol letters*, 2: 235-240.

Vaughan M. K. (1981). The pineal gland. A survey of its antigonadotropic substances and their actions. *En Endocrine Physiology III*. University park press. Baltimore: 41-95.

Vaughan M. K., Hubbard G. B., Champney T. H., Vaughan G. M. , Little J. C. y Reiter R. J. (1987). *Am J Anat*, 179: 131.

Vesely D. L. (1980). Melatonin enhances Guanylate cyclase activity in a variety of tissues. *Mol Cell Biochem* , 35: 55-58.

Vivien-Roels B. y Arendt J. (1981). Relative roles of environmental factors photoperiod and temperature in the control of serotonin and melatonin circadian variations in the pineal organ and plasma of the tortoise, *Testudo hermanni gemelin*. *Adv viosci*, 29: 401-406.

Vivien-Roels B. y Pévet P. (1983). The pineal gland and the synchronization of reproductive cycles with variations of the environmental climatic conditions, with special reference to temperature. En *Pineal Research Reviews*. (Reiter R. J. ed.). Liss A. R. Nueva York. Vol 1: 91-143.

Vollrath L. (1981). En *The Pineal Organ*. Springer Verlag. Berlin.

Waniewski R. A. y Suria A. (1978). GABA in the rat pineal gland. *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol*, 37: 908-911.

Weaver D. R., Namboodiri M. A. A. y Reppert S. M. (1988). Iodinated melatonin mimics action and reveals discrete binding sites in fetal brain. *FEBS Lett*, 228 (1): 123-127.

Weaver D. R., Rivkees S. C. y Reppert S. M. (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J Neurosci*, 9: 2581-2590.

Webley G. E., Luck M. R. y Hearn J. P. (1988). Stimulation of progesterone secretion by cultured human granulosa cells with melatonin and catecholamines. *J Reprod Fert*, 84: 669-677 .

Welsch U. (1995). Organos linfaticos. En *Histologia; Atlas en color de Anatomia Microscopica*. Marban ed. Madrid. 4ª edic. 125.

Wheater P. R. , Burkitt H. G. y Daniels V. G. (1987). Las glandulas endocrinas. En *Histologia Funcional*. (Jims ed). Barcelona. Capitulo 17: 273-274.

Wheater P. R., Burkitt H. G., Young B. y Heath J. W. (1993). En *Histologia Funcional*. (Lirngstone C. ed). Longman Group U. K. Limited 3ª edic. Capitulo 11 y 17: 200- 202 y 319-320.

Wiklund L. (1974). The development of serotonin - containing cells and the sympathetic innervation of the habenular region in the rat brain. *Cell Tiss Res*, 155: 231-243.

Wurtman R. J., Roth W. y Altschule M. D. (1961). Insteractions of the pineal and exposure to continous light on organ weights of female rats. *Acta Endocrinol*, 36: 617.

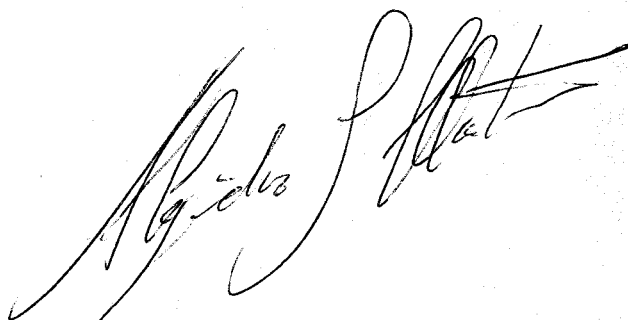
Yuan H. y Pang S. F. (1991). [¹²⁵ I] iodomelatonin-binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variation. *J Endocrinol* . 128: 475-482..

Zatz M. , Romero J. A. y Axelrod J. (1976). Diurnal variation in the requirement for RNA synthesis in the induccion of pineal N-acetyltransferase. *Biochem Pharmacol* 25: 903-906.

Zisapel N., Nir I. y Moshe L. (1988). Circadian variations in melatonin-binding sites in discrete areas of the male rat brain. *FEBS Lett*. 232: 172-176.

Zisapel N. y Anis I. (1988). Impact of circulating testosterone on iodomelatonin binding sites in the male rat brain. *Mol Cell Endocrinol*, 60: 119-126.

Zisapel N. (1988) Melatonin receptors revisited. Review article. *J Neural Transm*, 73: 1-5.



ALEJANDRO J.
MARTIN CACAO

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Alejandro Martín Cacao
titulada Receptores de melatonina en timo
de rata

acordó otorgarle la calificación de Apto Cum Laude

Sevilla, 8 de Octubre 1996

El Vocal,

H. Esquivel
El Presidente

C. Arana

El Vocal,

[Signature]
El Secretario,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado

[Signature]