

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

**Receptores centrales y periféricos de melatonina en teleósteo  
"Tinca tinca" : caraterización, farmacología y ritmicidad  
diaria y estacional**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Marcos A. López Patiño**

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5320936521

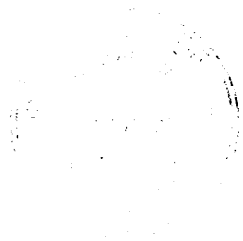
T 615.357  
LOP  
REC

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

RECEPTORES CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE MELATONINA EN  
EL TELEÓSTEO *Tinca tinca*. CARACTERIZACIÓN, FARMACOLOGÍA  
Y RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL.



R. 37645

MARCOS A. LÓPEZ PATIÑO

Madrid, Mayo del 2004

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II)

TESIS DOCTORAL



RECEPTORES CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE MELATONINA EN  
EL TELEÓSTEO *Tinca tinca*. CARACTERIZACIÓN, FARMACOLGÍA  
Y RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL.

MARCOS A. LÓPEZ PATIÑO

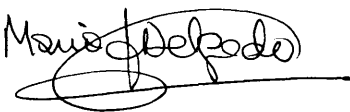
Madrid, Mayo del 2004

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**RECEPTORES CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE MELATONINA EN  
EL TELEÓSTEO *Tinca tinca*. CARACTERIZACIÓN, FARMACOLOGÍA  
Y RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL.**

Vº Bº

Los directores



Mª Jesús Delgado Saavedra



Ángel Luis Alonso Gómez

Interesado



Marcos A. López Patiño

Memoria presentada para optar al grado de  
**Doctor en Ciencias Biológicas**  
Por

**Marcos Antonio López Patiño**

Madrid, Mayo del 2004

**Dra. María Jesús Delgado Saavedra**, Profesora Titular de Universidad, del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid,

**Dr. Ángel Luis Alonso Gómez**, Profesor Titular de Universidad, del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid,

**INFORMAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada "Receptores centrales y periféricos de melatonina en el teleósteo *Tinca tinca*. Caracterización, farmacología y ritmicidad diaria y estacional" ha sido realizada por D. Marcos Antonio López Patiño bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Cumpliendo los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor en Biología. Por tanto, damos nuestra conformidad para su presentación ante la Comisión de Doctorado de la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid a 12 de mayo del 2004.



Fdo. Dra. María Jesús Delgado Saavedra

Fdo. Dr. Ángel Luis Alonso Gómez

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Doctores M<sup>a</sup> Jesús Delgado Saavedra y Ángel Luis Alonso Gómez y gracias a la financiación recibida del Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto AGL2001-0593-C03-03) y a la Beca Predoctoral otorgada al interesado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología. Agradecimiento especial merece la donación desinteresada por el Centro Nacional de Cíprinicultura "Vegas de Gadiana", de parte de los animales utilizados en el presente Trabajo.

A mi familia

A Ana

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que en un momento o en otro han tenido algo que ver en la realización de esta Memoria. Si tuviera que mencionarlas, este pequeño apartado dejaría de ser eso, pequeño, para ser el más extenso de este Trabajo. Por esta razón, les brindo un pequeño recordatorio. Este agradecimiento anónimo, va por ellos/as.

En primer lugar quiero agradecer a Mercedes la oportunidad que me ha brindado al poder trabajar en lo que me gusta. Su aportación como directora del grupo de investigación al que pertenezco y la confianza que me ha demostrado, sobre todo en los momentos de máxima necesidad y desesperación, ponen de manifiesto su enorme calidad como investigadora y, sobre todo, lo más importante, como persona. Sin tu ayuda, sin tu cariño, yo no podría haber terminado nunca este trabajo. Gracias Mercedes.

En todo trabajo, siempre hay momentos de debilidad. Pero también suele haber personas que ayudan a superarlos. Una de ellas, cómo no, es Maria Jesús. Mi creciente sentido de la supervivencia, unido a su EMPEÑO en que las cosas se acaben, trae como consecuencia una profunda confianza mutua. Para bien o para mal, no nos ocultamos nada de lo que nos afecta a los dos, y eso es básico en todo tipo de relaciones, ya sean laborales o de amistad. Maria Jesús, más que codirectora, es mi amiga, y si los dos no nos hubiéramos empeñado en sacar el trabajo adelante, muy posiblemente no habría escrito ni este párrafo de agradecimientos, ni esta Memoria. Gracias por tu ayuda, Maria Jesús.

Mención especial también merece, cómo no, el otro codirector: Angel Luis. Siempre dispuesto a ofrecer su ayuda, en lo que sea, desde arreglar un grifo, hasta resolver dudas de cualquier tipo, estén o no relacionadas con el trabajo. Es un cerebro, y un gran compañero y amigo, y le gusta seguir conservando estas cualidades. Sin tu colaboración, tanto en diseños experimentales, como en la realización de esta Memoria, mi trabajo se habría prolongado una buena temporada más, para disgusto de algunas personas, je, je.

A lo largo de la vida de una persona, siempre hay personas que influyen de forma positiva o negativa sobre uno. Ocurre bien de forma progresiva, o de forma traumática. Una persona ha conseguido que en el momento de máxima desesperación, yo fuera capaz de reaccionar y dar sentido a mi vida durante los últimos tres años. Sin Nuria yo no habría sido capaz de concluir mi labor científica en este Departamento, ni de acabar este trabajo. Gracias por ello. Nunca te olvidaré.

Por otro lado, me alegra saber que soy un gran animador. Quizás algún día me dedique a ello, porque la vida da muchas vueltas. Marisa lo sabe muy bien, pero yo no soy nada comparado con ella. Tú eras la verdadera animadora de aquellas entrañables matanzas y viajes. Gracias por ello. Todo fue más ameno.

Mención especial merece Ana. Tú estás siempre a mi lado. Allí donde te necesito



siempre estás dispuesta a ayudarme. Mi trabajo sin ti, a parte de ser un martirio, también hubiera sido imposible. Uno sólo no puede hacer esos "MEGAS" que nos hemos marcado. Tú tienes una tesis y media: la tuya, y la mitad de la mía. Sin ti, no hubiera habido tesis. Por eso te doy mis eternas gratitud y amistad. Espero no perderte nunca. Gracias también a Esther. Tu colaboración no alcanza los límites marcados por Ana, pero casi. Tu disposición a la colaboración y tu paciencia no deberías perderlas nunca. Cuando dos cabezotas se juntan, o salen mal parados, o colaboran hasta límites insospechados. Yo creo que en nuestro caso ha ocurrido lo segundo, y espero que siga. Gracias por tu participación en esta Tesis. También Marina, aunque se ha incorporado más tarde, ha participado activa y desinteresadamente en este trabajo. Vuelvo a repetir que uno solo no puede hacer un ensayo, y tú has sacrificado tu tiempo libre por mí. Gracias por ello.

Nunca podré olvidar los maravillosos momentos que he pasado en este Departamento. Ricardo, Alberto, Aintxane, Cristina (planta XII) y más recientemente Eva, tienen la culpa de ello. Los malos tragos se superan con gente como vosotros al lado. Os quiero mucho por ello. Me gustaría que vosotros pensárais sinceramente lo mismo de mí, eso sería bueno, porque habría conseguido parecerme a vosotros. Elvira merece una mención especial. Tu cariño, tu amistad y tu presencia, han sido el estímulo que algunos necesitábamos para no abandonar y continuar trabajando. Gracias por ser tú. Te queremos.

Otra persona que siempre está dispuesta a resolver los problemas técnicos que se presentan es Fernando. Siempre que te he necesitado, has estado, y eso es digno de mención y pone de manifiesto tu gran calidad humana. Gracias por ello.

Chiki, Isabel, siempre preocupadas por mi estado de ánimo. A veces parecía un gabinete psicológico. Todavía no me he vuelto loco, y vosotras habéis contribuido a que así sea. Gracias por ese interés que mostráis y que os engrandece. Más personas necesitarán de vosotras. Acudid a ellos/as, tal y como habéis hecho conmigo.

Por otro lado debo recordar a mis amigos Antonio, Ramón, Santi..., vosotros siempre estáis conmigo. Por eso os quiero agradecer el apoyo moral que siempre me habéis dado, aunque últimamente hayamos perdido algo el contacto.

El empeño, el ánimo, la fe ciega en mí, y las ganas de vivir que transmite Ana Vicente han sido un estímulo más que suficiente para que sacara fuerzas de donde no las había y continuar con este Trabajo. Por todo ello siempre tendrás mi cariño y mi eterna gratitud.

Mi último párrafo lo he querido reservar a mi familia más cercana. Mis padres, por su eterna paciencia, Eva por su enorme calidad humana, y Edu por su apoyo incondicional y el enorme despliegue técnico puesto a mi disposición, siempre tendréis en mí a una persona que os admira y os quiere. Sois un referente para mí, cada uno en vuestro ámbito. Vosotros habéis influido positivamente en mi crecimiento personal y humano. Soy como soy, sobre todo por vuestra culpa, y creo ser bueno. Gracias por ello.

## ABREVIATURAS

- AAAD,	Aminoácido aromático descarboxilasa.
- AA-NAT,	Arilalquilamina-N-acetiltransferasa.
- AMPc,	Adenosín monofosfato cíclico.
- Bmax,	Ubión máxima.
- cDNA,	ADN complementario.
- 6-Cl-Mel,	6-cloromelatonina.
- DA,	Dopamina.
- DD,	Oscuridad constante.
- e.e.,	Error estándar.
- e.e.m.,	Error estándar de la media.
- FSH,	Hormona estimulante del folículo.
- GABA,	Ácido gamma aminobutírico.
- GnRH,	Hormona liberadora de gonadotropinas.
- GTP $\gamma$ S,	5'-O-(3-tiotrifosfato) de guanosina.
- HIOMT,	Hidroxindol-O-metiltransferasa.
- IBMX,	Isobutilmetilxantina.
- IC <sub>50</sub> ,	Concentración inhibitoria 50.
- 2-I-Mel,	2-iodomelatonina.
- 2-[ <sup>125</sup> I]-Mel,	2-[ <sup>125</sup> I]-iodomelatonina.
- K <sub>+1</sub> ,	Tasa de asociación.
- K <sub>-1</sub> ,	Tasa de disociación.
- Kd,	Constante de disociación.
- Kd <sub>cinética</sub> ,	Constante cinética de disociación.
- K <sub>i</sub> ,	Constante de inhibición.
- LH,	Hormona luteinizante.
- LL,	Luz constante.
- MCA-NAT,	5-metoxycarbonilamino-N-acetiltriptamina.
- 5-MCPT,	5-metoxi-N-ciclopropanoiltriptamina.
- Mel,	Melatonina.
- mRNA,	ácido ribonucléico mensajero.
- NSB,	Unión inespecífica.
- NAS,	N-acetil-5-metoxitriptamina.
- 2-Ph-Mel,	2-fenilmelatonina.
- 4-P-PDOT,	4-fenil-2-propionamidotetralina.
- PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> ,	Prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub> .
- prot.,	Proteína.



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. LA TENCA: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE.</b> <b>BIOLOGÍA. FISIOLOGÍA. USOS</b> .....	2
<b>2. MELATONINA</b> .....	6
2.1. Síntesis y degradación.....	6
2.2. Regulación ambiental de la síntesis de melatonina.....	9
2.2.1. EFECTO DE LA LUZ.....	9
2.2.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	13
2.3. Regulación endógena.....	14
2.4. Acciones de la melatonina.....	16
<b>3. RECEPTORES DE MELATONINA</b> .....	18
3.1. Caracterización.....	18
3.2. Distribución.....	23
3.3. Interacción ligando-receptor.....	26
3.3.1. ESTRUCTURA DE LOS LIGANDOS MELATONINÉRGICOS.....	26
3.3.2. RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN.....	28
3.4. Regulación.....	30
3.4.1. VARIACIONES DIARIAS.....	30
3.4.2. CAMBIOS ESTACIONALES.....	33
3.4.3. CAMBIOS EN LA ONTOGENIA.....	34
<b>4. MODELOS <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSDUCCIÓN DE LA</b> <b>SEÑAL DE LA MELATONINA</b> .....	35
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	41
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44
<b>1. MATERIALES</b> .....	45
1.1. Productos.....	45
1.2. Instrumental.....	46
1.3. Material biológico: obtención y mantenimiento.....	46
<b>2. MÉTODOS</b> .....	47
2.1. Obtención de muestras.....	47
2.1.1. ENCÉFALO.....	47

2.1.2. DISECCIÓN DEL TEJIDO OCULAR. ....	47
2.1.3. TEJIDOS PERIFÉRICOS.....	48
2.2. Preparación de las membranas biológicas. ....	49
2.3. Técnicas analíticas. ....	51
2.3.1. PRINCIPIO DE ENSAYO DE RADIOLIGANDO (ERL). ....	51
2.3.1.1. Procedimiento general del ensayo. ....	54
2.3.1.2. Curvas de saturación. ....	55
2.3.1.3. Ensayos cinéticos.....	56
2.3.1.4. Ensayos farmacológicos. ....	57
2.3.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS. ....	57
2.4. Diseños experimentales.....	58
2.4.1 DISTRIBUCIÓN Y DENSIDADES RELATIVAS DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE 2-[ <sup>125</sup> I]-MEL EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE <i>Tinca tinca</i> . ....	58
2.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE 2-[ <sup>125</sup> I]-MEL EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE <i>Tinca tinca</i> . ....	59
2.4.3. EFECTO DEL GTP $\gamma$ S Y EL SODIO SOBRE LA UNIÓN DE 2-[ <sup>125</sup> I]-MELATONINA. ....	59
2.4.4 RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE LA TENCA.....	60
2.4.5 RITMICIDAD ENDÓGENA EN LA DENSIDAD DE SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN DISTINTAS REGIONES ENCEFÁLICAS DE <i>Tinca tinca</i> . ....	60
2.4.6 EFECTO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ SOBRE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LA RETINA NEURAL Y EL TECHO ÓPTICO DE <i>Tinca tinca</i> .....	61
2.4.6.1 Efecto de diferentes intensidades lumínicas durante la fase luminosa del fotociclo diario sobre la Kd y la Bmax. ....	61
2.4.6.2 Efecto de un pulso de luz de diferentes intensidades en mitad de la escotofase sobre la Kd y la Bmax.....	62
2.4.7. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA UNIÓN DE LA MELATONINA A SU RECEPTOR. ....	62
2.4.7.1. Ensayos de saturación. ....	62
2.4.7.2. Ensayos cinéticos.....	62
2.5. Análisis estadístico de los resultados. ....	63
2.5.1. ANÁLISIS DE SCATCHARD.....	63
2.5.2. ANÁLISIS DE LA Kd, Bmáx, IC <sub>50</sub> Y Ki. ....	63

2.5.3. ANÁLISIS DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS. ....	64
2.5.4. ANÁLISIS SINUSOIDAL. ....	64
2.5.5 ANÁLISIS DE LA VARIANZA Y TEST DE STUDENT-NEWMAN-KEULS DE COMPARACIONES MÚLTIPLES. ....	65
<b>IV. RESULTADOS. ....</b>	<b>66</b>
<b>1. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS SITIOS DE UNIÓN. ....</b>	<b>67</b>
<b>2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE <i>Tinca tinca</i>. ....</b>	<b>67</b>
2.1. Retina neural. ....	67
2.2. Techo óptico. ....	70
2.3. Corazón. ....	72
2.4. Riñón. ....	74
<b>3. EFECTO DEL GTP<math>\gamma</math>S Y EL SODIO SOBRE LA UNIÓN DE 2-[<sup>125</sup>I]-MELATONINA. ....</b>	<b>78</b>
<b>4. RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE LA TENCA. ....</b>	<b>82</b>
4.1. Retina neural. ....	82
4.2. Techo óptico. ....	87
4.3. Corazón. ....	91
4.4. Riñón. ....	94
<b>5. RITMICIDAD ENDÓGENA EN LA DENSIDAD DE SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN ENCÉFALO DE <i>Tinca tinca</i>. ....</b>	<b>99</b>
<b>6. EFECTO DE LA LUZ SOBRE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LA RETINA Y TECHO ÓPTICO DE <i>Tinca tinca</i>. ....</b>	<b>99</b>
6.1. Efecto de diferentes intensidades lumínicas durante la fase luminosa del fotociclo diario sobre la Kd y la Bmax. ....	99
6.2. Efecto de un pulso de luz de diferentes intensidades en mitad de la escotofase sobre la Kd y la Bmax. ....	102
<b>7. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE LA UNIÓN DE LA MELATONINA A SU RECEPTOR EN LA TENCA. ....</b>	<b>104</b>
7.1. Ensayos de saturación. ....	104
7.2. Ensayos cinéticos. ....	108

<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	117
<b>1. DISTRIBUCIÓN Y DENSIDADES RELATIVAS DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE <i>Tinca tinca</i></b> .....	118
<b>2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE <i>Tinca tinca</i></b> .....	123
2.1. Tejidos centrales.....	123
2.2. Tejidos periféricos.....	127
<b>3. RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE LA TENCA</b> ...	133
3.1. Ritmicidad en tejidos centrales .....	133
3.2. Ritmicidad en tejidos periféricos .....	139
3.3 ¿Son endógenos los ritmos de densidad de sitios de unión de melatonina en <i>Tinca tinca</i> ? .....	143
<b>4. EFECTOS DE LA LUZ Y LA TEMPERATURA EN LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LA RETINA Y TECHO ÓPTICO DE <i>Tinca tinca</i></b> .....	145
4.1. Efecto de la luz .....	145
5.2. Efecto de la temperatura.....	148
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	153
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	156

## **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. LA TENCA: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE. BIOLOGÍA. FISIOLOGÍA. USOS.

La tenca, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), es un teleósteo perteneciente al Orden Cipriniformes, Familia *Ciprinidae* y subfamilia *Leuciscinae*. Es una especie originaria de Europa que ha sido posteriormente introducida para su cultivo y pesca deportiva en cursos fluviales de otros continentes (Lukovicz y Proske, 1979). Presenta una amplia distribución, habitando ríos, lagos y estanques de Europa (a excepción de Escocia, Escandinavia central y septentrional, la Península Balcánica meridional y suroccidental y Córcega) y de Asia centroccidental. Puede colonizar estos hábitats desde el nivel del mar hasta 2078 m en los Alpes y 1818 m en los Apeninos.

Su cuerpo es alargado y robusto y el pedúnculo caudal corto y alto, presentando una aleta caudal grande, lo que le confiere una gran agilidad natatoria (Foto 1). La piel es mucosa con escamas cicloides muy pequeñas. La coloración varía desde verdosa a parda, dependiendo del hábitat. Así, el dorso y los flancos pueden ser pardo negruzcos, pardo verdosos o verdosos, con reflejos dorados sobre todo en los flancos. El vientre es amarillento o blanquecino con posibles reflejos rosados, anaranjados o rojizos. Las aletas son de color pardo negruzco, pardo verdoso, y más raramente, pardo con reflejos rosados. Se conocen variedades con librea amarillo dorada y manchas negras o librea grisácea y color habitual, pero con manchas blancas. Sus aletas no presentan radios espinosos. La boca es pequeña, terminal y protráctil, con labios gruesos que presentan un par de barbillones en sus comisuras. Los ojos son pequeños, con el iris rojizo o amarillento. Los ápices de las aletas son redondeados. La aleta dorsal tiene entre 12 y 13 radios (4 indivisos y 3-9 divididos) y la anal entre 9 y 12 (3-4 indivisos y 6-8 divididos). La tenca presenta un claro dimorfismo sexual, siendo las aletas pelvianas de los machos más grandes que las de las hembras y con el primer radio típicamente engrosado y un "callo" característico en el punto de inserción (Foto 2). A partir de los 2 años, cuando los machos miden aproximadamente 12 cm, estas aletas ventrales llegan hasta el ano o lo superan ligeramente.

En Europa central la tenca alcanza la madurez sexual a los 2-3 años en el caso de los machos y a los 2 ó 3-4 años en el caso de la hembras, pero en España las hembras pueden alcanzar la madurez al año (Steffens, 1995). La reproducción de la tenca se produce en aguas con abundante vegetación y a temperaturas de 19-20°C, teniendo lugar en España, de forma general, entre primavera y verano (finales de mayo-finales de julio) (Pinillos *et al.*, 2003), si bien depende de forma importante de la temperatura, pudiéndose



**Fotografía 1.** Ejemplar adulto de tenca (*Tinca tinca*).



**Fotografía 2.** Dimorfismo sexual en la tenca. Aletas pelvianas de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) adultos.

prolongar la reproducción a lo largo del mes de agosto, en veranos frescos. El límite superior de temperatura para la freza es 29 °C y el inferior 19-20 °C (Steffens, 1995). Las hembras ponen unos 200.000 huevos por kilo de peso en varios desoves (en general hay 3-4 puestas en cada estación reproductora), separados unos de otros aproximadamente 2 semanas, a lo largo de todo el período reproductor. El número de huevos depositados en

cada estación reproductora depende de varios factores, entre los que cabe destacar la temperatura del agua (Morawska, 1981), así como el tamaño, la edad y la tasa de crecimiento de las hembras (Brylińska y cols, 1979; Pimpicka, 1981; Kubů y Kouřil, 1985). El tamaño de los huevos depende del tamaño de los progenitores (Brylińska y Długosz, 1978), aunque en general son pequeños (0,8-1 mm de diámetro), verdosos y se depositan en grupos sobre plantas acuáticas o en el fondo del río. Las larvas eclosionan al cabo de 2-8 días y miden 4-5 mm. La mortalidad en el primer año en cultivos extensivos es muy elevada (90%) debido a la gran depredación a la que están sometidos, tanto los huevos como las larvas (Horvath y cols, 1984).

En comparación con otras especies de peces, la tenca tiene un crecimiento lento, tanto en libertad como en cultivo (Von Lukowicz y cols, 1986). Las tasas de crecimiento varían no sólo dependiendo de la temperatura y la alimentación, sino también del genotipo (Steffens, 1995). En general, en el primer verano, no llegan a los 10 g de peso, alcanzando 3-5 g, en promedio. En el segundo verano suelen pesar 30-100 g y entre 200-400 g en el tercer verano (Steffens, 1995). Aunque excepcionalmente puede vivir hasta 20 años y alcanzar 3,5-4 Kg de peso y 70 cm de longitud, es una especie de tamaño medio que suele medir entre 25 y 30 cm y pesar entre 600 g y 2 Kg, y no suele vivir más de 10 años.

Su hábitat característico son los fondos de estanques y charcas de agua dulce con fondos blandos y temperaturas estivales elevadas (por encima de los 19-20°C) y con vegetación abundante, aunque también está presente en algunos ríos de curso lento, agregándose en pequeños grupos generalmente antes de la época de freza. Su dieta es omnívora, consistiendo sobre todo en algas macrófitas, larvas de insectos acuáticos, pequeños moluscos gasterópodos y bivalvos (*Bithynia*, *Valvata* y *Pisidium*). Al comienzo de la alimentación exógena (3-4 días después de la eclosión, dependiendo de la temperatura) las larvas de tenca se nutren de protozoos y pequeños rotíferos (*Brachionus calyciflorus* y *B. angularis*) (Von Lukowicz y cols, 1986), si bien con el uso de *Artemia nauplii* como primera fuente de alimento se obtienen buenos resultados en términos de tasas de crecimiento y supervivencia (Wolnicki y Górný, 1995; Quirós y Alvariño, 2000). Posteriormente se alimentan de rotíferos de mayor tamaño, como *Asplanchna*, y a las 2 semanas de vida (1,1-1,2 cm) de pequeños cladóceros (*Moina rectirostris* y especies relacionadas). Al aumentar de tamaño las tencas se alimentan de ostrácodos, cladóceros y copépodos de mayor tamaño, así como de ácaros acuáticos y especialmente larvas de quironómidos.

La tenca se caracteriza por su alta resistencia a condiciones ambientales adversas, su elevada plasticidad ecológica y su notable resistencia frente a distintas enfermedades.

Tiene una gran tolerancia a calidades del agua bajas y niveles de oxígeno muy reducidos, siendo capaz de soportar períodos de hipoxia prolongados, especialmente a bajas temperaturas. Sin embargo, es una especie que muestra una alta sensibilidad al estrés y, en condiciones de cultivo controladas, a menudo deja de alimentarse como consecuencia de la introducción de perturbaciones exógenas (Fleig y Gottschalk, 2001). En estas condiciones, la tasa de crecimiento de la tenca es muy baja (Wolnicki y Myszkowski, 1998).

El sistema de cultivo conocido como "tradicional" ha sido practicado en centroeuropa desde la Edad Media, y en España desde el siglo XVI. Consiste en la estabulación de individuos de ambos sexos en charcas de poca profundidad y con vegetación. Se obtiene así una mezcla de individuos adultos y juveniles de varios tamaños que deben ser separados manualmente. Los adultos pueden ser utilizados para la venta, mientras que los juveniles se trasladan a otros estanques para continuar su crecimiento. Actualmente este sistema de cría aún se practica en explotaciones ganaderas (charcas extensivas) en Extremadura (la provincia de Cáceres es la mayor productora de tencas de España) y de forma casi testimonial en Castilla y León (Segovia y Salamanca). Dos de las charcas más famosas de España, ubicadas en El Casar de Cáceres (Cáceres) y Brozas (Cáceres), pertenecientes a la Mancomunidad de Municipios "Tajo-Salor", no han modificado sustancialmente su sistema de cría tradicional desde su construcción hace más de tres siglos. La única mejora que se ha introducido consiste en trasladar los alevines producidos el año desde las charcas de reproducción, que son más profundas y con abundante vegetación, a charcas de menor profundidad y sin vegetación. La pesca final se realiza a medida que las charcas se van secando, factor que determina la estacionalidad del mercado, siendo la talla comercial de la tenca entre 80-150 gramos. La cría intensiva de juveniles de tenca bajo condiciones ambientales controladas o semicontroladas puede ser una alternativa importante a la producción tradicional de esta especie. Sin embargo, el lento crecimiento de las tencas alimentadas con pienso comercial determina que los cultivos intensivos aún sean insuficientes (Sierra *et al.*, 1995; Jover *et al.*, 1997; Wolnicki y Myszkowski, 1998), por lo que es conveniente la adición de alimento vivo (por ejemplo *Daphnia*), lo que incrementa, tanto el crecimiento como la tasa de supervivencia de los peces juveniles en comparación con las tencas que reciben únicamente el alimento seco (Quirós y Alvariño, 2000; Wolnicki *et al.*, 2003).

A pesar de tratarse de una especie de creciente interés comercial en Europa central e importante en la pesca deportiva en otras áreas continentales, los conocimientos sobre su biología y los requerimientos para optimizar su producción son todavía muy limitados.

## 2. MELATONINA.

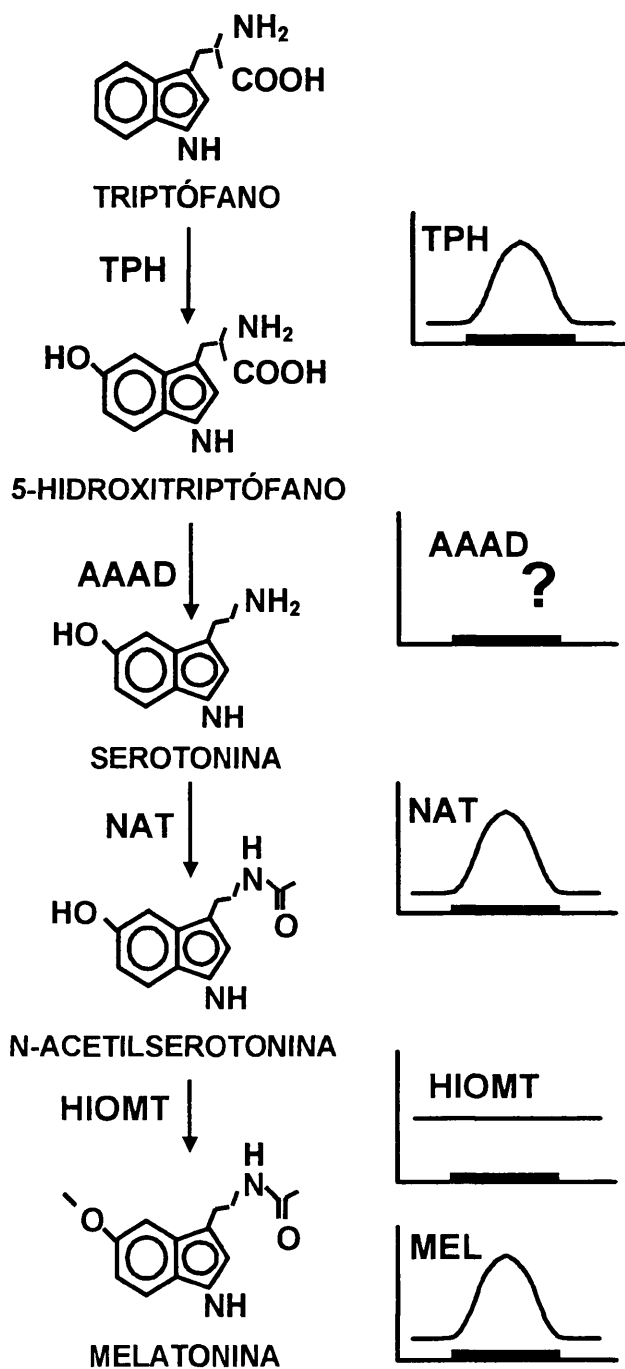
### 2.1. SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN.

La **Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina)** fue identificada por primera vez por Lerner y colaboradores (1959) en extractos de glándula pineal de bóvidos, denominándose melatonina por su capacidad para agregar los melanóforos dérmicos de las larvas de los anuros.

Se sintetiza en el complejo pineal y en la retina de los vertebrados. En ambas estructuras, la síntesis diaria de esta neurohormona sigue un patrón rítmico determinado principalmente por el ciclo luz/oscuridad, con una producción elevada durante la noche y valores mínimos durante el día.

El Esquema 1 ilustra la ruta biosintética de melatonina, demostrada a partir de estudios realizados en la glándula pineal y en la retina. Intervienen cuatro enzimas, de las cuales las dos primeras son comunes a la síntesis de serotonina. Las etapas de la síntesis de la indolamina son:

- **Captación del triptófano** por transporte activo desde el torrente circulatorio (Redburn y Mitchell, 1989).
- **Conversión del triptófano en 5-OHTrp**, reacción catalizada por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH, EC.1.14.16.4), oxidasa que requiere tetrahidrobiopterina como cofactor. Existen variaciones día-noche de esta enzima en la glándula pineal de rata (Ehret *et al.*, 1991; Besancon *et al.*, 1996) y en la retina de *Xenopus laevis* (Cahill y Besharse, 1990; Valenciano, 1998), lo que le podría atribuir un cierto papel regulador en la ruta biosintética de melatonina.
- **Descarboxilación del 5-OH-Triptófano** por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD, EC.4.1.1.28), produciendo serotonina.
- **Acetilación de la serotonina** en su extremo N-terminal por la acción de la serotonina-N-acetiltransferasa, también conocida como arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT, EC.2.3.1.87). Esta etapa se considera limitante de la síntesis de melatonina, habiéndose observado variaciones de la AA-NAT paralelas a las oscilaciones diarias de melatonina.
- **Metilación del grupo hidroxilo** de la posición 5 del anillo indólico, reacción catalizada por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT, EC.2.1.1.4). Esta enzima es exclusiva de los tejidos productores de melatonina, y presenta un ritmo diario de muy baja o nula amplitud en la mayoría de las especies de vertebrados estudiadas.



**Esquema 1.** Ruta de síntesis de melatonina. En las gráficas de la derecha se representa el perfil del ciclo diario de la actividad de las enzimas de la ruta y el contenido en melatonina.

Numerosos estudios demuestran que esta ruta biosintética es común en la retina y en la glándula pineal (Wiechmann, 1986; Besharse *et al.*, 1988). El tipo celular responsable de la síntesis de melatonina en la retina son las células fotorreceptoras, incluyendo conos y bastones, únicas células de la retina en las que se ha detectado inmunorreactividad para la HIOMT (Wiechmann *et al.*, 1985). En aves, se ha localizado mRNA de la HIOMT en células fotorreceptoras (Wiechmann y Craft, 1993), habiéndose comprobado que la actividad AA-NAT se incrementa con manipulaciones que estimulan la proporción de fotorreceptores en cultivo (Iuvone *et al.*, 1990). En la retina de *Xenopus laevis* se ha localizado la enzima TPH por hibridación *in situ* únicamente en los fotorreceptores (Green *et al.*, 1995).

En el complejo pineal la melatonina se sintetiza en una población celular que ha experimentado una notable transformación en la filogenia, son los pinealocitos fotorreceptores de los peces y anfibios, transformados en pinealocitos rudimentarios de los reptiles y aves, hasta diferenciarse en los pinealocitos secretores de melatonina de la glándula pineal de los mamíferos.

La importancia relativa de la retina y de la glándula pineal en la síntesis de melatonina varía dependiendo de las especies. Así, la pinealectomía reduce la melatonina circulante en el pollo (Cogburn *et al.*, 1987; McGoogan y Cassone, 1999), la codorniz (Underwood, 1994) y la rata (Warren *et al.*, 1993). Sin embargo, en otras especies la contribución de la melatonina ocular a la total circulante puede llegar a ser muy importante (Yu *et al.*, 1981b; Underwood *et al.*, 1984; Pang *et al.*, 1987; Delgado y Vivien-Roels, 1989). En *Xenopus laevis* se ha demostrado que la desacetilasa intraocular metaboliza de forma rápida la melatonina producida, por lo que la cantidad de indolamina que llega a liberarse a la circulación sanguínea es muy reducida (Cahill y Besharse, 1989). De forma general podemos afirmar que la melatonina circulante de origen ocular es reducida en los mamíferos, no siendo así en aves o en anfibios, donde la retina representa una fuente mayoritaria de la melatonina plasmática.

Debido a que la melatonina es una molécula muy lipófila, capaz de atravesar fácilmente las membranas plasmáticas, no se almacena en gránulos para su posterior secreción, sino que es liberada a la circulación inmediatamente después de su formación desde los órganos productores (Redburn y Mitchell, 1989). Esta hipótesis está corroborada por el alto coeficiente de permeabilidad de la melatonina, cuyo paso a través del epitelio pigmentado se realiza por difusión simple (Pautler y Hall, 1987).

La melatonina, por otro lado, es metabolizada siguiendo distintas vías, la melatonina periférica es catabolizada principalmente en el hígado, donde sufre una hidroxilación en la posición 6 del anillo indólico, así como una posterior conjugación con grupos sulfato o ácido

glucurónico, aumentando así su solubilidad en un medio acuoso. Estos compuestos se excretan por la orina de forma rápida (Reiter, 1984; Arendt, 1985), estimándose su vida media en el plasma de los mamíferos de unos 20 minutos (Gibbs y Vriend, 1981).

La degradación intraocular e intrapineal de la melatonina ha sido descrita en varias especies de vertebrados (Cahill y Besharse, 1989; Grace *et al.*, 1989; Nowak, 1990). Se lleva a cabo mediante varias etapas sucesivas (Esquema 2) que incluyen una desacetilación de la indolamina mediante la acción de la arilacilamidasa (aril-acilamina amidohidrolasa, E.C. 2.5.2.13) rindiendo 5-metoxitriptamina, sustrato de la monoamina oxidasa (MAO), que cataliza una desaminación oxidativa de esta molécula. El producto resultante (5-metoxindolacetaldehído) puede sufrir alternativamente una oxidación o una reducción, originándose ácido 5-metoxindolacético o 5-metoxitriptofol, respectivamente, metabolitos finales de la degradación intraocular de la melatonina.

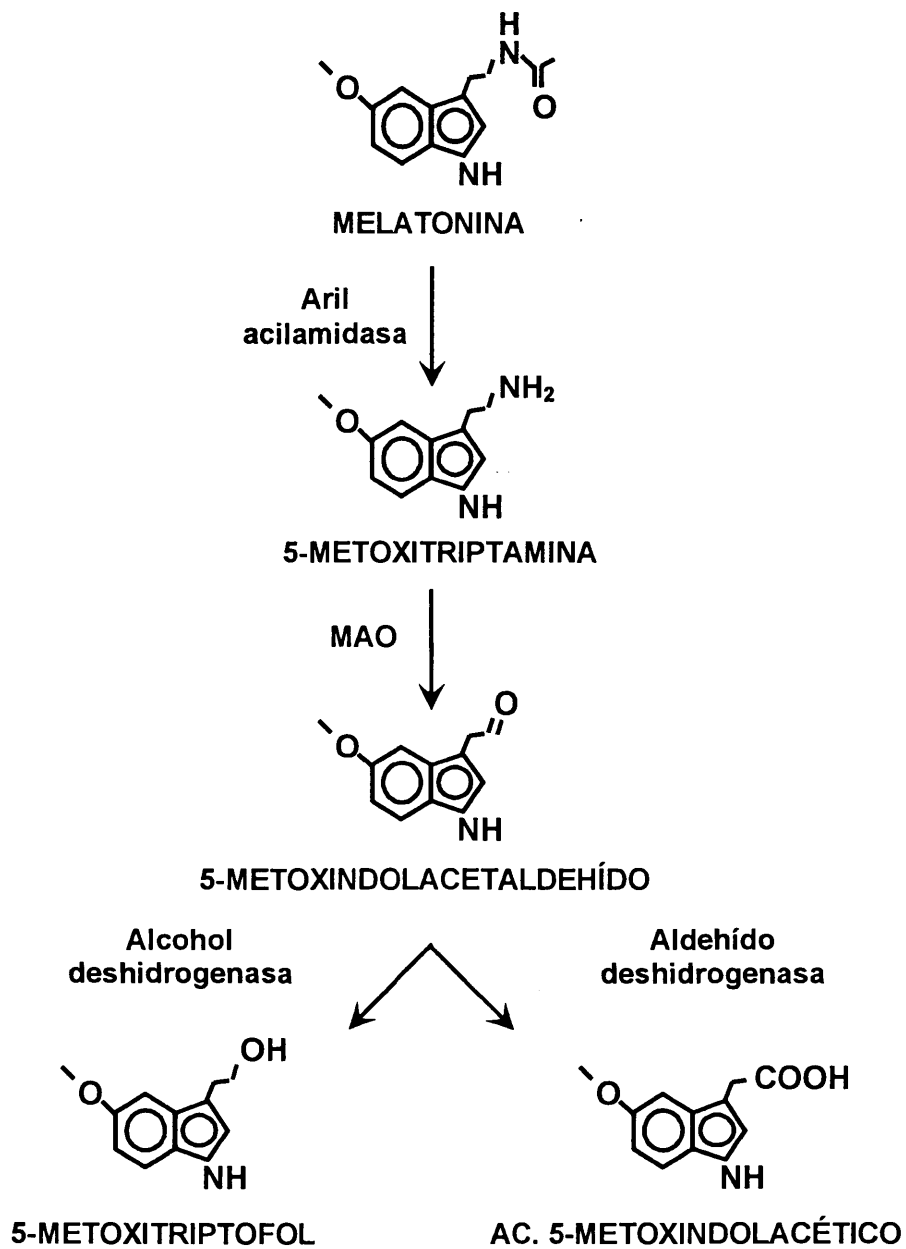
## **2.2. REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA.**

### **2.2.1. EFECTO DE LA LUZ.**

El fotoperíodo es el principal factor regulador de la síntesis rítmica diaria de melatonina. Numerosos estudios indican que el incremento nocturno, tanto de actividad AA-NAT como de la propia indolamina, se debe a la exposición a la oscuridad en el fotociclo diario, siendo el número de horas de oscuridad determinante en la duración del incremento nocturno de melatonina. Estudios *in vitro* realizados por Falcón y colaboradores (2001) demuestran en la glándula pineal de los peces, que la luz es la señal que produce el descenso de la actividad AA-NAT, probablemente mediante la activación de mecanismos de degradación de la enzima, que parecen estar muy conservados en la filogenia.

En la glándula pineal de algunos vertebrados, entre los que se encuentran algunas especies de peces, como *Lampetra japonica* (Samejima *et al.*, 2000), *Esox lucius* (Coon *et al.*, 1998) y *Carassius auratus* (Iigo *et al.*, 1991), se ha comprobado la existencia de un oscilador intrapineal capaz de generar ritmos endógenos de secreción de melatonina, que mantienen su ritmicidad en condiciones de oscuridad constante. Esta ritmicidad endógena no existe en la pineal de especies muy próximas, como por ejemplo *Oncorhynchus mykiss* (Coon *et al.*, 1998) y *Salmo salar* (Randall *et al.*, 1995), en las que el ritmo diario de melatonina no es endógeno, sino que la oscilación está determinada por la exposición al ciclo luz/oscuridad.

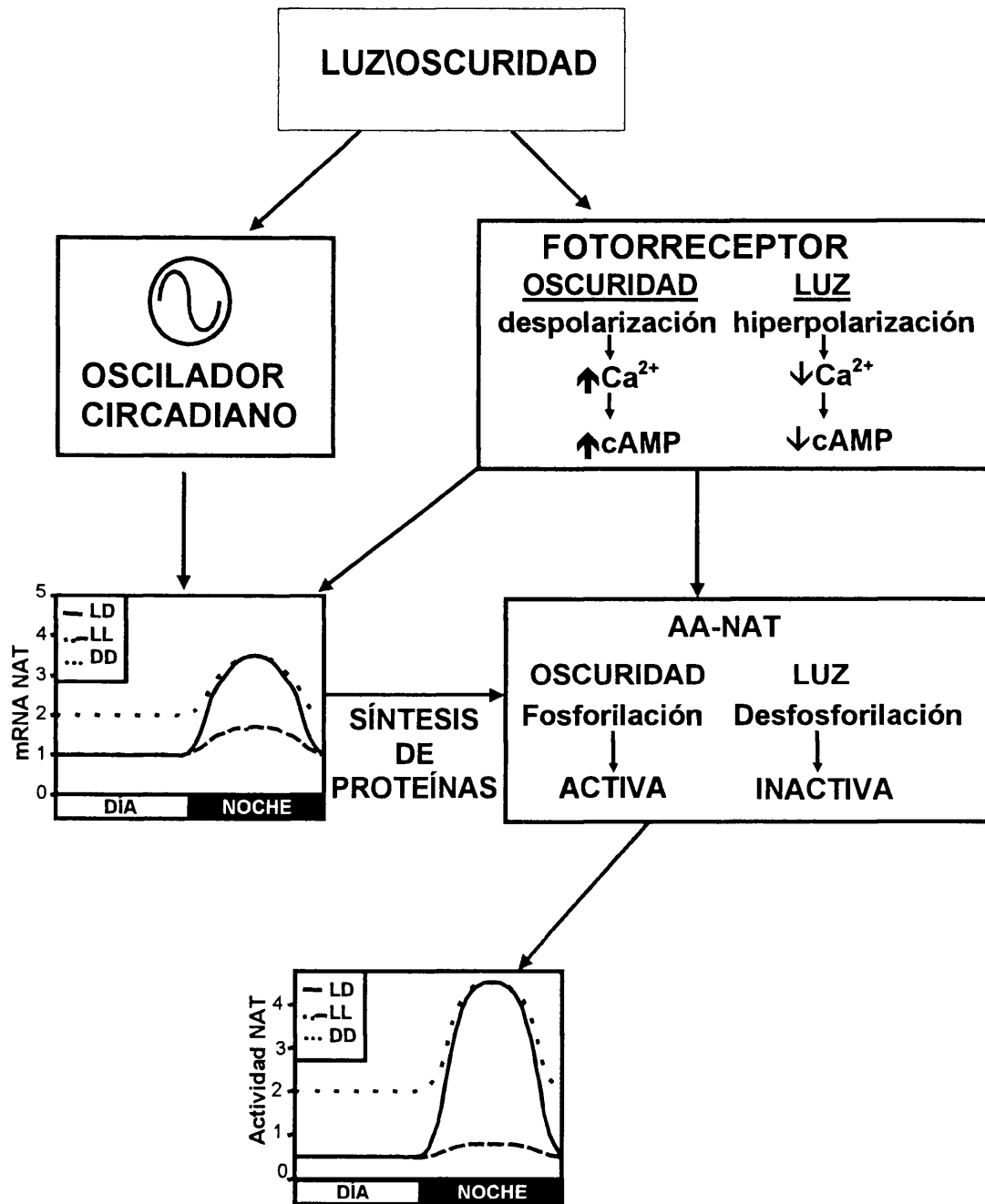




Esquema 2. Metabolismo intraocular e intrapineal de la melatonina en los vertebrados.

La regulación por la luz de la síntesis de melatonina ha sido estudiada en profundidad en la retina de pollo, donde se ha propuesto el modelo que se resume en el Esquema 3 (Iuvone y Alonso-Gómez, 1997). Según este modelo, la luz actuaría sobre el ritmo diario de dos modos, bien por supresión aguda de la actividad AA-NAT, o bien por ajuste del reloj endógeno (Cahill *et al.*, 1991). Los fotorreceptores se encuentran despolarizados en oscuridad y se hiperpolarizan como respuesta a la luz. Niveles elevados de potasio en el medio de cultivo despolarizan el receptor mimetizando el efecto de la oscuridad y estimulan la actividad AA-NAT por un mecanismo dependiente de calcio (Avendano *et al.*, 1990). En este sentido, concentraciones despolarizantes de potasio provocan la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (Gleason *et al.*, 1992), lo que se traduce en un incremento sostenido de la concentración de calcio en el segmento interno del fotorreceptor. La elevación del contenido de calcio tiene como consecuencia la activación de una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina (Alonso-Gómez e Iuvone, 1995a; Iuvone y Alonso-Gómez, 1995), que a su vez incrementa los niveles de AMPc, el cual, a través de la proteína kinasa A (PKA) induce fenómenos de fosforilación que estimulan la actividad AA-NAT mediante un mecanismo postranscripcional (Alonso-Gómez e Iuvone, 1995b). Por tanto, la luz, al hiperpolarizar el fotorreceptor, es la encargada de finalizar la señal, provocando el consecuente cierre de los canales de calcio. Algunos autores apuntan a una posible implicación de la actividad TPH en la regulación por la luz de la síntesis de melatonina (Cahill y Besharse, 1990; Valenciano, 1998).

En los peces se dispone de mucha menos información que en las aves, con respecto a la regulación de la síntesis de melatonina ocular producida por la luz. Se sabe que en algunas especies de peces, como en el pez cebra (*Danio rerio*, Cahill, 1996), o en el lábrido *Halichoeres tenuispinnis* (Iigo *et al.*, 2003a), la retina, al igual que la pineal, también presenta osciladores circadianos, si bien esto no indica que el "reloj maestro" se localice en este tejido, habiéndose demostrado la expresión de los genes reloj en el cerebro (*Oncorhynchus mykiss*, Mazurais *et al.*, 2000). Por el contrario, en otras especies de teleósteos, como la tenca (Guijarro, 2004) y la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*, Coon *et al.*, 1998), no existe dicha ritmicidad endógena en la síntesis de melatonina y actividad AA-NAT, anulándose la ritmicidad día/noche cuando los peces se someten a condiciones de oscuridad constante. De forma excepcional se han descrito ritmos invertidos en la producción diaria ocular de melatonina en la lubina (*Dicentrarchus labrax*), cuya retina sintetiza cantidades elevadas de melatonina durante el día y muy bajas durante la noche (Iigo *et al.*, 1997a; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997; Bayarri *et al.*, 2003).



**Esquema 3.** Regulación de la actividad AA-NAT por la luz. Tanto el oscilador circadiano como la iluminación ambiental están regulando los niveles finales de mRNA y actividad AA-NAT presentes en la retina. LD: fotoperíodo 12L:12D; LL: iluminación constante; DD: oscuridad constante. Basado en Iuvone y Alonso-Gómez (1997).

### 2.2.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA.

La temperatura es un factor de importancia clave en la regulación de la síntesis de melatonina, especialmente en los vertebrados poiquiloterms, que son capaces de modificar diversas funciones fisiológicas, adaptándose a los cambios de temperatura ambiental. Estudios pioneros realizados por Vivien-Roels y colaboradores demostraron el papel clave de la temperatura en la síntesis de melatonina en la pineal de reptiles, dependiendo de dicho factor ambiental, la amplitud del pico nocturno de melatonina circulante (Vivien-Roels *et al.*, 1979). En la regulación ambiental de la producción de melatonina existe un control dual por parte del fotoperíodo y de la temperatura: la extensión de la fase oscura del fotociclo diario determina la duración de los elevados niveles nocturnos de la indolamina, mientras que la amplitud del pico nocturno depende de la temperatura. Este patrón de regulación, propuesto inicialmente para los reptiles, se ha corroborado posteriormente en otros grupos de poiquiloterms, como los anfibios (Delgado y Vivien-Roels, 1989) en los que existe una evidente correlación entre la temperatura ambiental y el incremento nocturno de melatonina, llegando a anular el ritmo diario de indolamina ocular a las temperaturas bajas propias del invierno, tanto en ranas expuestas a condiciones ambientales naturales (Delgado *et al.*, 1993), como en condiciones de cultivo *in vitro* de copas ópticas (Valenciano *et al.*, 1997).

Esta regulación térmica de la síntesis de melatonina en poiquiloterms muestra una notable conservación filogenética, habiéndose observado respuestas similares en la pineal de varias especies de peces como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*, Thibault *et al.*, 1993), el lucio (*Esox lucius*, Falcón *et al.*, 1996a) y la lamprea (*Lampetra japonica*, Samejima *et al.*, 2000). En la tenca, datos recientes de nuestro equipo de investigación confirman, para la melatonina ocular, el patrón de regulación propuesto: a temperaturas bajas desaparece el ritmo día/noche en el contenido ocular de melatonina, tanto en condiciones naturales como en experimentos de aclimatación en el laboratorio (Gujarro, 2004). Además, esta acción reguladora de la temperatura se establece sobre la amplitud del ritmo de la actividad AA-NAT, que se anula a baja temperatura, desapareciendo el ritmo día/noche de actividad enzimática, si bien se mantienen niveles elevados de la enzima a lo largo de las 24 h, que no se traducen en una mayor producción de melatonina. Estos resultados, coinciden con los descritos para otras especies de poiquiloterms, como *Rana perezi* (Delgado *et al.*, 1993), en la que se ha demostrado que la enzima AA-NAT ocular muestra una elevada sensibilidad térmica (Alonso-Gómez *et al.*, 1992b) y, aunque la reducción de la temperatura produce un incremento en la cantidad de enzima ocular, también conlleva una pérdida significativa de su eficacia catalítica, justificando la falta de

correlación entre altos niveles de actividad AA-NAT y una reducida producción de melatonina a temperatura baja, tanto en la rana (Delgado *et al.*, 1993), como en la tenca (Guijarro, 2004). Esta interesante estrategia se interpreta como una adaptación característica de la ectotermia dirigida a conseguir una compensación frente a la falta de regulación térmica en estos animales, y permite utilizar a la melatonina como señal capaz de transducir, no sólo la información luminosa, sino también la información térmica ambiental para sincronizar los cambios estacionales con distintas funciones periódicas en estos vertebrados (Delgado *et al.*, 2004).

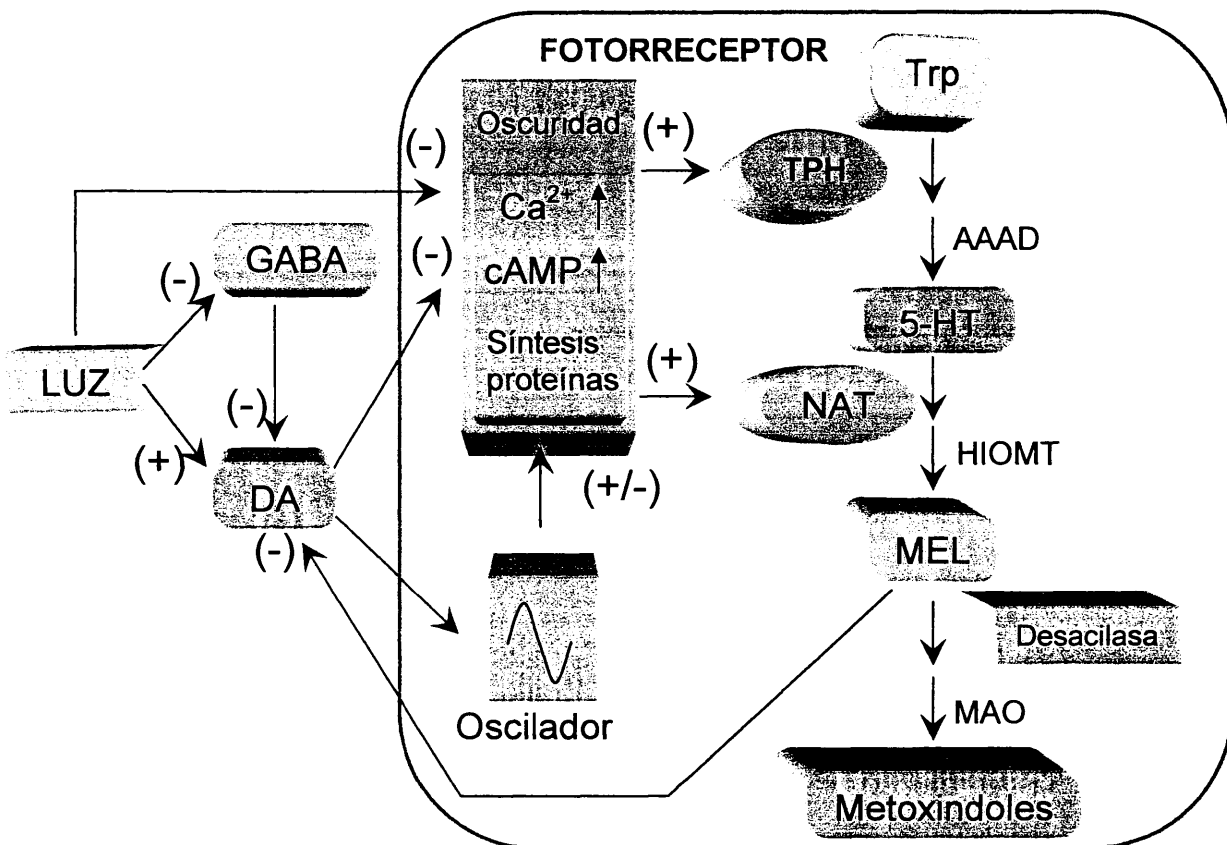
### 2.3. REGULACIÓN ENDÓGENA.

La regulación endógena de la síntesis de melatonina es claramente distinta en la glándula pineal y en la retina. En la glándula pineal la regulación es bien conocida, y de tipo adrenérgica. Mediante el empleo de agonistas y antagonistas adrenérgicos selectivos se ha demostrado que la activación de los receptores  $\beta$  y  $\alpha_1$  presentes en los pinealocitos produce un incremento de la síntesis de melatonina en la pineal de los mamíferos (Moujir *et al.*, 1992; Rubio *et al.*, 1993). En las aves, el subtipo de receptor adrenérgico implicado es el  $\alpha_2$ , que muestra un carácter inhibitorio de la síntesis de la indolamina (Takahasi *et al.*, 1991). En ambos casos, el neurotransmisor implicado es la noradrenalina, que alcanza a la glándula pineal procedente de la inervación simpática postganglionar desde el ganglio cervical superior. Las fibras preganglionares aferentes a dicho ganglio tienen su origen en el núcleo supraquiasmático, donde se establece el relevo de la información procedente de la retina neural que viaja a través del tracto retinohipotalámico.

En la retina de todos los vertebrados investigados la dopamina es una molécula clave implicada en la regulación de la sensibilidad a la luz. Se ha demostrado que la luz estimula tanto la síntesis (a través de la activación de la tirosina hidroxilasa) como la liberación de dopamina (Parkinson y Rando, 1983; Cahill *et al.*, 1991), por lo que esta catecolamina presenta un ritmo diario con valores elevados durante la fase luminosa del fotociclo diario y muy bajos durante la noche. La existencia de este ritmo diario de dopamina invertido al ritmo de melatonina sugirió un reparto de las funciones intraoculares de ambos mensajeros, de modo que la dopamina sería la encargada de regular la adaptación del ojo a la luz, y la melatonina de las funciones relativas a la adaptación a la oscuridad. Numerosos estudios apoyan esta propuesta, analizando principalmente los cambios producidos en los movimientos fotomecánicos de los fotorreceptores oculares en los vertebrados no mamíferos, como respuesta adaptativa a las modificaciones en la intensidad lumínica (Deary y Burnside, 1986; McCormack y Burnside, 1992; Stenkamp *et al.*, 1994).

Con respecto a la regulación endógena de la síntesis de melatonina, los perfiles invertidos de ambos ritmos (dopamina y melatonina) plantearon la existencia de una posible interacción inhibitoria entre ambos mensajeros. En efecto, la DA inhibe, al igual que la luz, la actividad AA-NAT y la liberación de melatonina ocular, acción mediada por receptores de la familia D<sub>2</sub> (Alonso-Gómez *et al.*, 2000). Esta acción inhibitoria de la dopamina está mediada en copas ópticas de *Xenopus laevis* a través de una proteína G y cierre de canales de calcio tipo L, disminuyendo la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la consecuente reducción del contenido de AMPc, que es el responsable último de la inhibición de actividad AA-NAT (Cahill y Besharse, 1991). De forma complementaria, la melatonina en la retina suprime la liberación de dopamina inducida por la luz, pudiendo representar uno de los mecanismos utilizados por la melatonina para desencadenar la adaptación de los fotorreceptores a la oscuridad (Dubocovich, 1983). Estudios recientes demuestran que en la retina del carpín la liberación de dopamina es endógena, conservándose su liberación rítmica en retinas mantenidas en oscuridad constante. La adición de melatonina de forma continua al medio de cultivo anula dicha ritmicidad, encontrándose valores de dopamina basales nocturnos, sin embargo el antagonista de melatonina, luzindol, aunque también anula el ritmo de liberación de dopamina, su efecto se traduce en altos niveles diurnos de la catecolamina (Ribelayga *et al.*, 2004). Estos resultados indicarían la existencia de un reloj circadiano en la retina del carpín, responsable de la liberación rítmica de dopamina y en cuyo funcionamiento parece estar implicada la activación de los receptores de melatonina.

En este planteamiento de regulación endógena de la síntesis de melatonina ocular debemos incluir al GABA, neurotransmisor que estimula la actividad AA-NAT a través de la modulación de la liberación de dopamina, al menos en parte. En presencia de IBMX, el GABA y sus agonistas incrementan la actividad AA-NAT durante la fase luminosa del fotociclo diario. La picrotoxina, antagonista GABA<sub>A</sub>, inhibe el incremento nocturno de la actividad AA-NAT, posiblemente a través de la estimulación de la liberación de dopamina por las neuronas amacrinas dopaminérgicas (Cahill y Besharse, 1991). Gillespie y colaboradores (1997), utilizando agonistas y antagonistas selectivos, han obtenido resultados que confirman el papel del receptor GABA<sub>A</sub> e implican también al GABA<sub>B</sub>. El esquema 4 presenta un resumen del modelo actualmente aceptado de la regulación endógena de la síntesis de melatonina ocular.



**Esquema 4.** Modelo de regulación endógena de la síntesis de melatonina retiniana (modificado de Iuvone y Alonso-Gómez, 1998).

## 2.4. ACCIONES DE LA MELATONINA.

La primera función descrita para la melatonina fue su capacidad para inducir agregación de gránulos de melanina en torno a la zona perinuclear de los melanóforos dérmicos de los anfibios, produciendo un aclaramiento de la larva (Lerner *et al.*, 1958; Lerner y Case, 1960). Desde entonces un elevado número de estudios han demostrado que la melatonina está implicada en el ajuste temporal de múltiples funciones que presentan un patrón rítmico, tratándose de una molécula capaz de encarrilar relojes biológicos en los vertebrados (Redman *et al.*, 1983; Cassone *et al.*, 1986). Una prueba inequívoca de esta función encarriladora de ritmicidad la encontramos en el efecto atenuador de los ritmos diarios en condiciones de curso libre producido por la pinealectomía, efecto que es revertido si se administra melatonina de forma rítmica (Cassone *et al.*, 1993).

De este modo, a la melatonina se le han atribuido una gran variedad de acciones neuroendocrinas, implicándola en la regulación de los ritmos reproductores en numerosas especies de vertebrados (Bittman, 1993; Gunduz y Stetson, 1994; Mayer *et al.*, 1997; Amano *et al.*, 2003a; Pévet, 2003; Tan *et al.*, 2003), como elemento clave en la regulación de la temperatura corporal en mamíferos (Song y Bartness, 2001) y en la hibernación (Bilbo y Nelson, 2002), en la función tiroidea (Gancedo *et al.*, 1996, 1997; Csemmus y Mess, 2003), en el comportamiento alimentario (Pinillos *et al.*, 2001, Guijarro, 2004), en el control del desarrollo larvario y metamórfico en los anfibios (Delgado *et al.*, 1987; Wright, 2002), en la regulación de los ciclos de actividad locomotora en vertebrados (Reiter, 1991; Zachmann *et al.*, 1992; Iigo *et al.*, 2003a) y del ciclo sueño-vigilia en humanos (Refinetti, 2000).

Además de las funciones neuroendocrinas de la melatonina, en algunas especies se han descrito ciertas acciones locales o paracrinas. Como hemos comentado anteriormente la melatonina ocular está implicada en varios mecanismos conducentes a la adaptación del ojo a la oscuridad. De este modo, produce elongación de los conos y contracción de los bastones (Pierce y Besharse, 1985, 1987), agregación de melanosomas en el epitelio pigmentado de la retina (Pang y Yeu, 1979), recambio de discos en los segmentos externos de los bastones y su fagocitosis (Besharse y Dunis, 1983), inhibe la liberación de dopamina (Dubocovich, 1983) y provoca cambios en la sensibilidad de las células horizontales a la luz (Dubocovich, 1983; Wiechmann *et al.*, 1988; McCormack y Burnside, 1992). Todo ello dirigido a favorecer la visión escotópica o nocturna.

Varios autores coinciden en que probablemente la primera función de la melatonina en la filogenia pudo ser su acción local sobre la fotorrecepción ocular y pineal, mientras que las funciones endocrinas sistémicas aparecerían posteriormente (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1993). En todo caso, hay acuerdo general en que el ritmo diario de melatonina actúa como código endocrino transductor del ciclo ambiental luz/oscuridad, proporcionando información que es utilizada por los organismos para su organización temporal, tanto circadiana como estacional (Pévet, 1998).

Además de estas funciones, existen ciertas acciones de la melatonina descubiertas posteriormente y que no parecen estar mediadas por receptores específicos (Nava *et al.*, 1997; Behan *et al.*, 1999). Entre estas acciones, una de las más investigadas ha sido su función antioxidante, descrita en todos los grupos animales estudiados, desde organismos unicelulares, como el dinoflagelado *Gonyaulax polyedra* (Antolin *et al.*, 1997), hasta humanos (Herrera *et al.*, 2001; Reiter y Tan, 2002; Reiter *et al.*, 2000; 2002). La melatonina es una molécula con una extraordinaria capacidad aceptora de radicales libres y, por tanto, un excelente antioxidante de amplio espectro en el organismo, implicado en la protección



celular frente al ataque oxidativo producido por los radicales libres (Tan *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 2000). El luzindol, antagonista general de los receptores de melatonina, es incapaz de bloquear los efectos antioxidantes de la indolamina (Nava *et al.*, 1997; Behan *et al.*, 1999), lo que indica que esta acción antioxidante de la melatonina se ejerce independientemente de la activación de sus receptores de membrana. Basándose en estos estudios y en la presencia de la molécula en organismos unicelulares muy primitivos, algunos autores proponen que, desde un punto de vista evolutivo, la acción inicial de la melatonina habría sido la de proteger a los organismos frente al estrés oxidativo, especialmente en las proximidades de los lugares que muestran una producción elevada de radicales libres (Hardeland *et al.*, 1995). Además de esta acción antioxidante directa de la melatonina *per se*, se ha descrito que la indolamina estimula la inducción de enzimas antioxidantes, generando un efecto adicional que contribuye a amplificar la acción antioxidante global ejercida por el indol (Tan *et al.*, 2003).

En los últimos años y en la actualidad, en base a esta extraordinaria capacidad antioxidante de la melatonina, unida a su función sincronizadora de ritmos biológicos, y a su aparente inocuidad, se están realizando esfuerzos importantes dirigidos a investigar en profundidad su potencial uso terapéutico en humanos.

### 3. RECEPTORES DE MELATONINA.

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN.

Los primeros indicios de la existencia de receptores de melatonina surgen a partir de los resultados de McCord y Allen (1917) cuando demuestran el palidecimiento de la piel de los renacuajos de *Rana pipiens* producido por los extractos de glándula pineal ovina. Este bioensayo se utilizó cincuenta años más tarde con el fin de caracterizar y purificar la melatonina a partir de extractos de glándula pineal, lo que condujo al descubrimiento de su estructura molecular (Lerner *et al.*, 1959). La propiedad de la melatonina de agregar los gránulos de pigmento en los melanóforos dérmicos de anfibios fue empleada para proponer la presencia de receptores de melatonina, establecer la primera relación estructura-actividad de los análogos de la indolamina, así como para demostrar, mediante cultivos de melanóforos de *Xenopus laevis*, que la activación de los receptores de melatonina por su ligando provoca un descenso en la formación de AMPc mediante el acoplamiento a proteínas G sensibles a la toxina pertussis (White *et al.*, 1987).

La demostración de la existencia de sitios de unión específica de [<sup>3</sup>H]-Melatonina en el cerebro ovino fue seguida del descubrimiento de la respuesta funcional a la activación de los receptores de melatonina en tejido neuronal de mamíferos, concretamente en la retina

del conejo (Dubocovich, 1983, 1985; Dubocovich y Takahashi, 1987). Este descubrimiento, unido al desarrollo de la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel como radioligando de elevada afinidad (Dubocovich y Takahashi, 1987) ha permitido la localización así como la caracterización farmacológica de los receptores de melatonina en numerosos tejidos centrales y periféricos y en numerosas especies de vertebrados, incluida la especie humana.

Inicialmente se identificaron dos tipos distintos de sitios de unión para melatonina, los de alta afinidad (Kd = 20-200 pM) y baja capacidad (Dubocovich *et al.*, 1997), y los de baja afinidad (Kd en el orden nM), pero de alta capacidad. Entre otras características diferenciales destaca que la cinética de asociación-disociación es lenta para los primeros (60 minutos) y rápida para los segundos (1-2 minutos) (Nosjean *et al.*, 2000), los de alta afinidad muestran regulación por GTP y cationes, y los de baja afinidad no. La distribución de estos subtipos de receptores también es diferente, los de elevada afinidad tienen una distribución predominantemente central, los segundos son receptores mayoritariamente periféricos.

Los receptores de melatonina de elevada afinidad son receptores transmembrana pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Morgan *et al.*, 1989a; Rivkees *et al.*, 1989a; Laitinen y Saavedra, 1990a y b) y contienen, por tanto, en su estructura siete dominios transmembrana unidos entre sí por una serie de puentes, tanto intra- como extracelulares (Esquema 5).

Los primeros estudios farmacológicos pusieron de manifiesto que entre los receptores de elevada afinidad sólo se podía distinguir un único subtipo de receptor de melatonina, denominado ML-1 por Dubocovich (1988, 1995), o MEL<sub>1</sub> por Reppert y colaboradores (Reppert *et al.*, 1995a, 1996a). El orden de afinidades descrito para varias indolaminas en este subtipo de receptor fue el siguiente:

2-iodomelatonina ≥ 6-cloromelatonina > melatonina > 6-hidroximelatonina > 6-metoximelatonina > N-acetilriptamina > 5-metoxitriptamina >> 5-hidroxitriptamina (Dubocovich, 1988; Sugden y Chong, 1991).

Posteriormente, mediante el empleo de antagonistas de la melatonina, como el luzindol o el 4-fenil-2-cloroacetamidotetralina, se pudo comprobar que existía otro subtipo de receptores (denominados Mel 1b, y posteriormente MT<sub>2</sub>) con afinidad por dichos ligandos superior a la que muestran otros subtipos (denominados Mel 1a -más tarde MT<sub>1</sub>- y Mel1c), que a su vez resultan farmacológicamente indistinguibles (Dubocovich *et al.*, 1997). Así se realizó la primera clasificación, propuesta por Reppert y colaboradores (1995a), que

distinguía tres subtipos, denominados Mel1a, Mel1b y Mel1c, que posteriormente han pasado a nombrarse MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> y Mel1c, respectivamente.

Los receptores de baja afinidad fueron descritos por primera vez en membranas plasmáticas procedentes del cerebro de hámster, donde muestran una afinidad para numerosos ligandos en el intervalo nanomolar (Dubocovich, 1995), y se les denominó MT<sub>3</sub> ó ML-2. La N-acetilserotonina (NAS), precursor de la melatonina, así como el 5-metoxycarbonilamino-N-acetilriptamina (5-MCA-NAT), muestran selectividad por estos sitios de unión de melatonina (Molinari *et al.*, 1996). El orden de afinidades de este subtipo de receptores es:

2-iodomelatonina > 6-cloromelatonina > prazosin ≥ N-acetilserotonina ≥ 5-MCA-NAT ≥ melatonina >> serotonina (Dubocovich, 1995; Molinari *et al.*, 1996).

A continuación se incluye un resumen con la clasificación actual, que distingue entre receptores de elevada (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> y Mel1c) y baja afinidad (MT<sub>3</sub>) por la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel.

ALTA AFINIDAD		BAJA AFINIDAD	
DENOM. ANTERIOR	DENOM. ACTUAL	DENOM. ANTERIOR	DENOM. ACTUAL
Mel 1a	MT <sub>1</sub>	Mel 2, ML2	MT <sub>3</sub>
Mel 1b	MT <sub>2</sub>		
Mel 1c	Mel 1c		

Las técnicas de Biología Molecular han permitido la clonación de los receptores de melatonina, lo que ha supuesto un gran avance en su conocimiento. Inicialmente se aislaron los cDNA de receptores de melatonina a partir de preparaciones de melanóforos dérmicos de *Xenopus* (Ebisawa *et al.*, 1994). Dicho cDNA codifica para una proteína de 420 aminoácidos que contiene 7 segmentos hidrofóbicos, que claramente constituye la región transmembrana. El peso molecular estimado es 47424 Da. La mayor similitud encontrada con otros receptores conocidos ronda el 25% con los receptores de opioides y de somatostatina.



**Esquema 5.** Receptor de melatonina del subtipo MT<sub>1</sub> en *Gallus domesticus* (Tomado de: [www.cmbi.kun.nl/7tm/seq/vis/ML1A\\_CHICK/ML1A\\_CHICK.html](http://www.cmbi.kun.nl/7tm/seq/vis/ML1A_CHICK/ML1A_CHICK.html)).

El primer receptor de melatonina clonado fue el subtipo Mel1c de melanóforos dérmicos de *Xenopus* (Ebisawa *et al.*, 1994). Este descubrimiento abrió las puertas para la clonación de otros receptores de melatonina en diferentes especies de vertebrados. Hasta la fecha han sido clonados, además del Mel 1c, el receptor MT<sub>1</sub> del cerebro de mamíferos (Reppert *et al.*, 1996a, Roca *et al.*, 1996; Weaber y Reppert, 1996; Gauer *et al.*, 1998), aves (Reppert *et al.*, 1995a) y peces (Mazurais *et al.*, 1999; Gaildrat y Falcón, 1999) y el MT<sub>2</sub>, presente mayoritariamente en la retina de los mamíferos (Reppert *et al.*, 1995b; Reppert, 1997), si bien también se ha descrito en peces, concretamente en la hipófisis del lucio (Gaildrat y Falcón, 1999). La homología de las secuencias de aminoácidos de estos dos subgrupos ronda el 60%, que los diferencia claramente, ya que entre miembros de un mismo subtipo suele superarse el 80% de homología. Esta distinción entre estos dos subtipos podría corresponderse con una diferente funcionalidad.

La diversidad de respuestas producidas por la melatonina y mediadas por el subtipo MT<sub>1</sub>, podría deberse al hecho de que estos receptores se encuentran distribuidos en una gran variedad de tejidos. Además, se ha demostrado que este subtipo de receptores pueden estar acoplados a una amplia variedad de proteínas G, entre las que se incluyen las

$G_{i\alpha_2}$ ,  $G_{i\alpha_3}$  y  $G_{\alpha_q}$  (Brydon *et al.*, 1999; Witt-Enderby *et al.*, 2001),  $G_{i\alpha_s}$ ,  $G_{i\alpha_z}$  y  $G_{i\alpha_{16}}$  (Ho *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2002), lo que justificaría la diversidad de respuestas que genera su activación en el organismo.

En relación con los receptores del subtipo  $MT_2$ , hasta la fecha se sabe que estos receptores están implicados en la modulación de ciertos ritmos circadianos (Dubocovich *et al.*, 1998a), mecanismos de vasodilatación (Doolen *et al.*, 1998), procesos inflamatorios, la microcirculación (Lotufo *et al.*, 2001), así como en la regulación de la fisiología retiniana (Dubocovich *et al.*, 1997). En base a estudios de distribución que han detectado este subtipo  $MT_2$  en la retina de mamíferos, se cree que este receptor podría mediar los efectos intraoculares de la melatonina.

La presencia de receptores  $MT_1$  en la mayoría de los tejidos cerebrales de los mamíferos, incluyendo la *pars tuberalis* hipofisaria y el núcleo supraquiasmático hipotalámico, sugiere que este subtipo de receptor estaría mediando los efectos circadianos y estacionales de la melatonina en estos vertebrados. Esta propuesta se fundamenta en los resultados obtenidos en hamsters siberianos (*Phodopus sungorus*) portadores de dos mutaciones en el gen  $MT_2$ , que impiden la expresión de un receptor  $MT_2$  funcional (Weaver *et al.*, 1996), y en los que se no se ven alterados los bien conocidos efectos diarios y estacionales de la melatonina en esta especie (Goldman *et al.*, 1984; Weaver *et al.*, 1996). El descubrimiento mediante hibridación *in situ* de la presencia de mRNA del  $MT_1$ , pero no del  $MT_2$ , en el núcleo supraquiasmático de humanos refuerza esta hipótesis (Weaver y Reppert, 1996). Por todas estas razones, hace unos años la Unión Internacional de Farmacología (NC-IUPHAR) renombró a los receptores Mel1a y Mel1b como  $MT_1$  y  $MT_2$  (Dubocovich *et al.*, 1998b).

Finalmente, el subtipo Mel1c, el menos conocido, se ha descrito en los melanóforos, el cerebro y la retina de peces, anfibios y aves (Reppert *et al.*, 1995a, 1996a y b), pero hasta la fecha no se tienen indicios de su existencia en los mamíferos.

En los peces se han podido clonar, total o parcialmente, receptores de melatonina en diferentes especies, el pez cebra (*Brachidanio rerio*, Gaildrat y Falcón, 1999), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*, Mazurais *et al.*, 1999) y el lucio (Gaildrat y Falcón, 2000; Gaildrat *et al.*, 2002). Los receptores de melatonina del pez cebra se denominan Z1.4 y Z1.7 (tipo  $MT_1$ ), Z2.6 (tipo  $MT_2$ ) y Z2.3 (Mel1c), por homología con los descritos por Reppert y colaboradores (1995a), mientras que en la trucha arcoiris los fragmentos aislados son homólogos a los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  (Mazurais *et al.*, 1999). El equipo dirigido por el Dr. Falcón ha clonado en el cerebro del lucio (*Esox lucius*) dos fragmentos del receptor de Mel con secuencias parciales correspondientes a los receptores del pez cebra y de la trucha,

son el P1.4 y el P2.6, que corresponden a los Z1.4/RT1.4 y Z2.6/RT2.6, respectivamente. La caracterización molecular del cDNA completo del P2.6 indica que codifica para una proteína con una homología del 80% con el subtipo de receptores Mel 1b del pez cebra, trucha arcoiris, *Xenopus* y pollo (Reppert, 1997), y de un 61% respecto al MT<sub>2</sub> de humanos, y cuyo mRNA se expresa mayoritariamente en el techo óptico y en menor medida en la retina y en la hipófisis. El hecho de presentar diferentes homologías con los receptores MT<sub>2</sub> de vertebrados no mamíferos y de humanos podría llevar a sugerir la existencia de un subtipo diferente de receptores (Gaildrat *et al.*, 2002), lo que obligaría a realizar una nueva revisión de la nomenclatura por la NC-IUPHAR, que recoja y aúne toda la información disponible hasta la fecha. Mientras tanto, la nomenclatura actual admite, como hemos mencionado anteriormente, tres subtipos de receptores, MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> y Mel1c, aparte de los sitios de unión de baja afinidad, denominados MT<sub>3</sub>.

Por otro lado, hay que tener muy presente que la melatonina es una molécula pequeña, muy lipófila y, por tanto, capaz de actuar independientemente de sus receptores de membrana, desarrollando acciones citosólicas a través del complejo calcio-CaM como diana (Bartianelli y Pochet, 1994), o nucleares, a través de la regulación directa de la expresión génica (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1994). Estudios recientes apuntan a que estas acciones intracelulares estarían mediando los efectos antioxidantes de la melatonina (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1995; Reiter *et al.*, 1997; Coto-Montés *et al.*, 2003).

### 3.2. DISTRIBUCIÓN.

A pesar de que el patrón de distribución de los receptores de melatonina varía en la filogenia de forma específica, algunos patrones de distribución permanecen constantes. En muchas especies de mamíferos los receptores de melatonina de elevada afinidad se encuentran específicamente distribuidos en la *pars tuberalis* hipofisaria, y en el núcleo supraquiasmático hipotalámico (Vanecek, 1988a; Williams y Morgan, 1988; Weaber *et al.*, 1989). Además de estas localizaciones principales, se ha encontrado unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el área medial preóptica, hipotálamo anterior, *pars distalis* de la hipófisis anterior, núcleos paraventricular y talámico anteroventral, hipocampo, corteza cerebral y cerebelar, área postrema y retina (Vanecek, 1988a; Williams y Morgan, 1988; Duncan *et al.*, 1988; Vanecek y Jansky, 1989; Weaber *et al.*, 1989; Williams, 1989; Williams *et al.*, 1989; Bittman y Weaber, 1990; Siuciak *et al.*, 1990; Weaber y Reppert, 1990; Blazinsky y Dubocovich, 1991; Stankov *et al.*, 1991; Deveson *et al.*, 1992; Helliwell y Williams, 1992; Lindroos *et al.*, 1993; Neu y Niles, 1997; Li y Witt-Enderby, 2000; Masana y Dubocovich, 2001; Scher *et al.*, 2002; Von Gall *et al.*, 2002).

En humanos se han detectado sitios de unión para 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en diferentes regiones encefálicas, concretamente en el núcleo supraquiasmático, la zona externa de la capa molecular del cerebelo, en el cerebro medio, el puente, el córtex cerebral (Reppert *et al.*, 1988; Yuan *et al.*, 1991) y la retina (Scher *et al.*, 2002).

Teniendo presente el papel clave desempeñado por la melatonina en la regulación de los ritmos reproductores en ciertos mamíferos estacionales, se han realizado importantes esfuerzos para localizar receptores de melatonina en la hipófisis de estas especies, sin embargo, y a pesar de que la melatonina inhibe la liberación de LH y FSH inducida por GnRH (Martin *et al.*, 1982; Vanecek y Klein, 1992a), no se han obtenido evidencias directas de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]Melatonina en las células gonadotropas adenohipofisarias.

Aparte del sistema nervioso central, en los mamíferos se han descrito sitios de unión saturables de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en diferentes tejidos periféricos, como las arterias del círculo de Willis y la arteria caudal de la rata (Erçahin *et al.*, 2002) el útero de rata (Zhao *et al.*, 2002), el bazo de numerosas especies de mamíferos (Niles, 1989; Viswanathan *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1991) y el tracto gastrointestinal (Poon *et al.*, 1997). Receptores del tipo MT<sub>2</sub> se han descrito en el riñón, el ovario, en la circulación coronaria así como en varias líneas celulares tumorales (Li y Witt-Enderby, 2000; Masana y Dubocovich, 2001; Von Gall *et al.*, 2002). Curiosamente, el subtipo MT<sub>3</sub> se expresa en tejidos tan dispares como el hígado, el riñón, el corazón, el tejido adiposo pardo, el músculo esquelético, el pulmón, el intestino, el testículo y el bazo de diferentes especies de mamíferos, como el hámster, el ratón, el perro y el mono (Nosjean *et al.*, 2001).

Entre los vertebrados no mamíferos también se ha descrito una distribución abundante de receptores de melatonina. En las aves se han realizado numerosos estudios de localización de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en los tejidos centrales, describiéndose la presencia de receptores en la retina (Dubocovich y Takahashi, 1987), en la médula espinal (Wan y Pang, 1993) y el cerebro del pollo (*Gallus gallus*, Rivkees *et al.*, 1989b ; Brooks y Casone, 1992) y de la codorniz (Cozzi *et al.*, 1993), así como en la glándula adrenal del pato (*Anas platyrhynchos*, Pang *et al.*, 1994a).

En los reptiles, se han descrito sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el cerebro y la retina de varias especies (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1994), así como en áreas visuales encefálicas de la tortuga *Chrysemys picta* (Larson-Prior *et al.*, 1996).

En los anfibios, la presencia de sitios centrales de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel se ha demostrado en la retina de varias especies de anuros (*Rana pipiens*, Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1991; *Xenopus*, Wiechmann y Smith, 2001; *Rana perezi*, Isorna *et al.*, 2004) y en diferentes áreas encefálicas de *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004).

En los peces se han publicado varios estudios en relación con la distribución de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel, principalmente en homogeneizados de cerebro de distintas especies, en el carpín (*Carassius auratus*, Martinoli *et al.*, 1991; Iigo *et al.*, 1994a), en el lucio (*Esox lucius*, Gaildrat *et al.*, 1998), en varias especies de salmónidos (*Salmo salar*, Ekström y Vanecek, 1992; *Oncorhynchus mykiss*, Davies *et al.*, 1994; Pang *et al.*, 1994b, Mazurais *et al.*, 1999; *Oncorhynchus masou*, Amano *et al.*, 2003a, 2003b), la dorada (*Sparus aurata*, Falcón *et al.*, 1996b), la lubina (*Dicentrarchus labrax*, Bayarri *et al.*, 2004a). Sólo en algún caso se ha investigado con técnicas autorradiográficas la distribución de los sitios de unión de melatonina en áreas encefálicas concretas, como por ejemplo en *Salmo salar* (Ekström y Vanecek, 1992), en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*, Davies *et al.*, 1994; Mazurais *et al.*, 1999) y en la lamprea (*Petromyzon marinus*, Verdanakis *et al.*, 1998). En el encéfalo del pez gato (*Silurus asotus*, Iigo *et al.*, 1997b), y en un estudio muy reciente en la lubina, realizado en colaboración con nuestro equipo de investigación (Bayarri *et al.*, 2004b) mediante técnicas de radioligando se han caracterizado dichos sitios de unión en las áreas encefálicas concretas, encontrando en ambos casos una mayor densidad de los sitios de unión en áreas cerebrales implicadas en el procesado de señales visuales.

Los estudios de distribución de receptores de melatonina en tejidos periféricos de los vertebrados no mamíferos son más escasos, habiéndose descrito en las aves la presencia de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel de elevada afinidad en el bazo (Pang y Pang, 1992) y el riñón del pollo (Song *et al.*, 1996a), en el ciego intestinal (Poon *et al.*, 2002) y el corazón de la codorniz (Pang *et al.*, 1996), así como en el tracto gastrointestinal de varias especies de aves (*Anas platyrhynchos*, *Gallus domesticus*, *Columbia livia* y *Coturnix japonica*, Poon *et al.*, 1997).

Los melanóforos dérmicos de los anfibios poseen receptores de melatonina, descritos a partir del conocido efecto agregador de la melanina producido por la melatonina en estas células. De hecho, la clonación del receptor Mel 1c se ha conseguido a partir de líneas celulares inmortalizadas derivadas de cultivos primarios de melanóforos dérmicos de *Xenopus* (Ebisawa *et al.*, 1994).

La localización de posibles sitios de unión de melatonina en tejidos periféricos de los peces no ha sido estudiada hasta la fecha. Únicamente existe un trabajo realizado por Pang y colaboradores en el que estudian afinidades de sitios de unión de 2-I-Mel en el corazón de 3 especies de salmónidos (Pang *et al.*, 1994c).

Desconocemos en muchos casos la identidad del tipo celular concreto donde se localizan los receptores de melatonina en los distintos tejidos, en buena medida debido a la gran dificultad metodológica que entraña la combinación simultánea de, por ejemplo, los

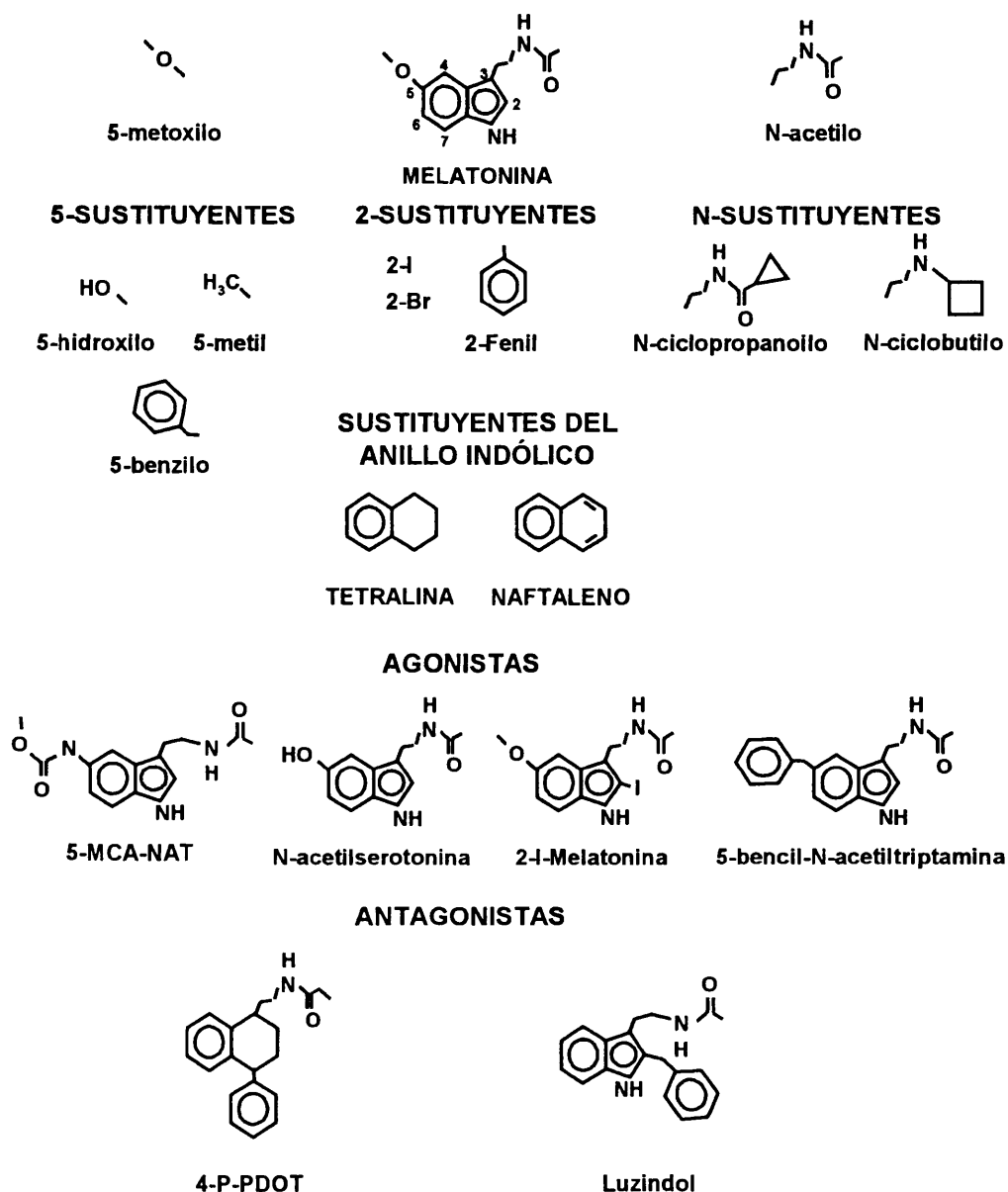


ensayos autorradiográficos de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel con hibridación *in situ* o inmunocitoquímica en las mismas células. Otra dificultad añadida es el hecho de que la densidad de receptores en células individuales suele ser muy baja, lo que dificulta considerablemente la localización de dichos receptores a nivel celular. No obstante, se han realizado importantes esfuerzos para determinar el tipo de células que responden a la indolamina, por ejemplo en el núcleo supraquiasmático de los mamíferos, que presenta una elevada densidad de receptores para melatonina. Así, los resultados obtenidos en el hámster sirio indican que los receptores de melatonina no están presentes en las células que reciben inervación directa del nervio óptico, situadas en la parte ventrolateral del núcleo, sino que podrían localizarse más bien en células vasopresinérgicas dorsomediales (Maywood *et al.*, 1995). En la retina, también se ha podido detectar unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la capa plexiforme interna en mamíferos (Blazinsky y Dubocovich, 1991), aves (Laitinen y Saavedra, 1990b), reptiles (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1994) y anfibios (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1991), capa que incluye conexiones sinápticas clave, por ejemplo entre células bipolares, amacrinas y ganglionares. Por tanto los receptores de melatonina en el sistema nervioso parecen localizarse principalmente en neuronas, habiéndose comprobado que la melatonina inhibe el incremento de AMPc inducido por el forskolín en cultivo de fotorreceptores y neuronas sin glia de la retina del embrión de pollo (Iuvone y Gan, 1994).

### 3.3. INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR.

#### 3.3.1. ESTRUCTURA DE LOS LIGANDOS MELATONINÉRGICOS.

Con objeto de profundizar en el conocimiento de la unión de los ligandos a su receptor y poder diseñar nuevos fármacos que presenten una mayor especificidad para cada uno de los subtipos de receptores, que ayude a un mejor reconocimiento de los mismos, se han realizado estudios con diferentes ligandos que han puesto de manifiesto la importancia de los grupos 5-metoxilo y N-acetilo (Esquema 6), ya que su ausencia provoca un descenso drástico de la afinidad en los subtipos de receptores de elevada afinidad por la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> y Mel1c). Por un lado se ha comprobado que la supresión del grupo 5-metoxilo provoca un descenso menos acusado de la afinidad en el subtipo MT<sub>2</sub> que en los subtipos MT<sub>1</sub> y Mel1c (Sugden *et al.*, 1997). Para determinar si otros grupos podrían sustituir al radical metoxilo en la posición 5-, se han probado análogos con diferentes sustituyentes, como el 5-hidroxilo, el 5-metilo y el 5-benziloxilo (Esquema 6), comprobando



**Esquema 6.** Estructura de la melatonina, de los grupos 5-metoxilo, N-acetilo, algunos de los sustituyentes del anillo indólico, así como de algunos agonistas y antagonistas de los receptores de melatonina.

que, tanto en los receptores  $MT_1$  como en los  $MT_2$ , el grupo 5-metoxilo es el que muestra una mayor potencia de unión, seguido del 5-benziloxilo, 5-metilo y 5-hidroxi, si bien la potencia de unión de cada uno de estos grupos es superior en el subtipo  $MT_2$  respecto al  $MT_1$ . Por esta razón se diseñó el 5-benziloxil-N-acetiltriptamina (Pickering *et al.*, 1996), agonista selectivo en los melanoóforos, y que puede ser considerado como el primer

agonista selectivo de los receptores de melatonina (Esquema 6), presentando una mayor afinidad por los receptores MT<sub>2</sub> que por los MT<sub>1</sub>, si bien en ambos casos la afinidad por este ligando es menor que la obtenida para la 2-I-Mel.

Por otro lado, parece que el incremento de la longitud del grupo N-acetilo hasta en 2 átomos de carbono no produce cambios significativos de la afinidad en cada uno de los receptores, aunque incrementos superiores a este número (4 ó 5 carbonos) son capaces de provocar descensos en la afinidad. Así mismo, la sustitución de este grupo por grupos cíclicos (N-ciclopropionilo y N-ciclobutilo, Esquema 6) también conduce a una pérdida notable de la afinidad de la unión (Garrat *et al.*, 1995). Además, la adición en la posición 2 de grupos de elevado peso molecular (I, Cl, Br o Phe) incrementa la afinidad en ambos subtipos de receptores, MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>.

En contraste, el núcleo indol no parece ser necesario para que se produzca la unión ya que los derivados en los que se sustituye este núcleo por grupos naftaleno o tetralina que lleven grupos metoxi y N-acetilo en las posiciones apropiadas, presentan una potencia de unión idéntica a los análogos con el grupo indol (Yous *et al.*, 1992), lo que pone de manifiesto que el anillo indólico serviría únicamente para mantener los grupos funcionales en la posición y orientación adecuadas para su unión al receptor (Sugden, 1994a y b).

### 3.3.2. RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN.

La capacidad de la melatonina para unirse, activar y modular sus propios receptores depende en gran medida de la interacción de la indolamina con aminoácidos y/o dominios específicos de la molécula del receptor. En este sentido, se han realizado en los últimos años estudios dirigidos a caracterizar los aminoácidos o dominios que intervienen en la unión de la melatonina a su receptor, pudiendo ser únicos para cada subtipo de receptor.

Navajas y colaboradores (1996) propusieron un hipotético sitio de unión de melatonina según el cual una valina y una histidina serían las responsables del reconocimiento del grupo 5-metoxilo de la melatonina, mientras que una serina y una alanina son básicas para la unión del grupo funcional N-acetilo. Posteriormente se han realizado estudios de mutagénesis en los receptores MT<sub>1</sub> para poder ratificar este modelo hipotético de receptor. Así, la sustitución de la valina en posición 208 en el receptor Mel1a ovino por alanina, se traduce en un descenso de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel (Conway *et al.*, 1997), manteniéndose la funcionalidad de los mutantes. Estos datos sugieren que las mutaciones afectan sólo a la unión, otorgando a la valina 208 un papel importante en la unión del ligando al receptor.

El papel de la histidina en la unión de la melatonina aún resulta más interesante, ya que su sustitución en la posición 211 por fenilalanina o leucina en receptores Mel1a ovinos también disminuye significativamente la capacidad de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a este receptor en comparación con el receptor intacto (Conway *et al.*, 1997). El empleo de N-[2-(1-naftil)etil]acetamida (NEA) y NAS en la posición 211 en estos mutantes, muestra que los análogos de melatonina que carecen bien del grupo metilo o metoxilo, o bien de un grupo funcional en la posición 5, se unen con igual o mayor potencia que al receptor intacto, sugiriendo la existencia de una interacción directa entre la histidina de la posición 211 y la posición 5 (grupo metoxilo) de la melatonina (Conway *et al.*, 1997). Los análisis realizados con los mutantes muestran que no son capaces de inhibir la producción de AMPc, como lo hace la melatonina en el receptor intacto (Conway *et al.*, 1997). Este dato pone de manifiesto que el residuo de histidina, además de su papel en la unión ligando-receptor, también desempeña un papel clave en la activación del propio receptor (Conway *et al.*, 1997). Estudios posteriores en los que sustituyen este aminoácido en receptores humanos del tipo MT<sub>1</sub> han revelado que la histidina no es la responsable de la activación del receptor, sino que es el tamaño del aminoácido presente en esa posición, el que determina dicha activación (Kokkola *et al.*, 1998). Por otro lado, el papel de la serina 280 y de la alanina 284 en la unión del grupo acetilo todavía no ha sido estudiado en profundidad, conociéndose únicamente que la sustitución conjunta en ambas posiciones inactiva al receptor (Kokkola *et al.*, 1998), aunque este resultado podría deberse al gran tamaño del sustituyente empleado (fenilalanina).

Otros aminoácidos también se han implicado en la unión de la melatonina a su receptor, en base a las secuencias de los receptores MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> y péptidos relacionados. En este sentido parece que los segmentos transmembrana 3, 6 y 7 están implicados en la unión de la melatonina. Recientemente se ha comprobado que la cisteína desempeña un papel importante en la modulación de la unión de los agonistas de elevada afinidad a los receptores MT<sub>2</sub> (Mseeh *et al.*, 2002) y su sustitución en las posiciones 113 y 190 por alanina conlleva la pérdida de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel al receptor. Parece que es importante la presencia de un puente disulfuro para el mantenimiento de la estructura del sitio de unión de la melatonina en este subtipo de receptores (Mseeh *et al.*, 2002).

Los estudios de simulación permiten la comparación entre receptores. Así por ejemplo, la comparación entre receptores MT<sub>1</sub> de elevada afinidad y receptores relacionados (H9, histidina en posición 9) revela también diferencias interesantes entre ambos. La sustitución de la glicina en posición 266 por la treonina, presente en los receptores H9, genera un mutante que une 2-[<sup>125</sup>I]-Mel con menor potencia que el receptor

intacto, sugiriéndose que el dominio 6 transmembrana es crítico para la unión con elevada afinidad (Gubitz y Reppert, 2000). En consecuencia, las modificaciones moleculares en este dominio que incluyan a la glicina en la posición 266 tienen como consecuencia incompatibilidades estéricas en el sitio de unión de la melatonina, imposibilitándose la interacción (Gubitz y Reppert, 2000). Además, se ha visto mediante esta técnica de simulación que, tanto el dominio 4 como el dominio 6 transmembrana en receptores relacionados con el MT<sub>1</sub> humano, necesitan ser reemplazados por el correspondiente dominio intacto para que se produzca la unión de elevada afinidad de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel (Conway *et al.*, 2000).

### 3.4. REGULACIÓN.

#### 3.4.1. VARIACIONES DIARIAS.

Se han realizado numerosos estudios en los mamíferos con el fin de investigar el posible control ejercido por el ciclo luz/oscuridad sobre los receptores de melatonina, existiendo mucha menos información en el resto de los vertebrados. Variaciones diarias en la densidad de receptores de melatonina se han descrito en regiones encefálicas de mamíferos, mostrando, en la mayoría de los casos, un incremento de la densidad de receptores durante la fase luminosa del fotociclo diario, seguido de un descenso de la densidad de sitios de unión durante la fase oscura. Esta respuesta se ha observado para los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la *pars tuberalis* y en la *pars distalis* hipofisaria y en el núcleo supraquiasmático de la rata (Laitinen *et al.*, 1989; Vanecek *et al.*, 1990; Gauer *et al.*, 1993a, 1994a), siendo la densidad de sitios de unión antes del inicio de la oscuridad entre un 50 y un 70% más elevada que al inicio de la fase luminosa (Vanecek *et al.*, 1990; Gauer *et al.*, 1994a). Se ha propuesto que la menor densidad de receptores de melatonina durante la noche podría deberse a una regulación a la baja producida por el incremento de la síntesis de melatonina endógena en esta fase del fotociclo diario. Pruebas a favor de esta hipótesis se han obtenido en la *pars tuberalis* de la rata (Gauer *et al.*, 1994a), la oveja (Barret *et al.*, 1996) y el hámster (Schuster *et al.*, 2001), especies en las que el descenso en la densidad de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel observado en la transición oscuridad/luz no se produce en animales pinealectomizados. Dicho efecto inhibitorio de la melatonina sobre sus propios receptores parece establecerse a nivel de la expresión génica del receptor, tanto en la *pars tuberalis* ovina (Barret *et al.*, 1996), como en la *pars tuberalis* del hámster sirio y el hámster siberiano (Schuster *et al.*, 2001).

Sin embargo, esta autorregulación por la propia melatonina de la densidad de receptores no se ha podido demostrar en otras áreas cerebrales que también muestran una

elevada densidad de sitios de unión y donde el control parece mostrar una mayor complejidad. Así, la regulación de los ritmos diarios de receptores en el núcleo supraquiasmático de ciertos mamíferos parece depender del propio ciclo luz/oscuridad, que actúa como señal esencial para mantener un nivel de expresión basal del mRNA del receptor, que posteriormente podría ser diana de un mecanismo de retroalimentación negativa producida por las altas concentraciones nocturnas de melatonina circulante (Schuster *et al.*, 2001). Pruebas a favor de esta propuesta se han encontrado en el núcleo supraquiasmático de la rata, donde la pinealectomía no modifica la reducción nocturna de la densidad de receptores de melatonina, y sin embargo la exposición a una hora de iluminación es capaz de revertir dicho descenso (Gauer *et al.*, 1994a). También se propone una hipótesis similar de regulación circadiana de los sitios de unión de melatonina por el ciclo luz/oscuridad en un estudio muy reciente realizado en glándula mamaria de ratones, en el que se muestran variaciones día/noche en la afinidad de la unión de 2-I-Mel en preparaciones de núcleos celulares, con afinidad elevada durante la fase oscura y, muy baja a mitad de la fase luminosa (Coto-Montés *et al.*, 2003).

Esta ritmicidad diaria en la densidad de receptores de melatonina en los mamíferos no va acompañada, en la mayoría de los casos, de cambios diarios significativos en la afinidad (Kd) de la melatonina por su receptor (Laitinen *et al.*, 1989; Pikkety y Pelletier, 1993).

En el cerebro de varias especies de aves también se han descrito incrementos en la densidad de receptores de melatonina durante la fotofase del ciclo diario, y descensos durante la fase oscura (*Gallus gallus*, Yuan y Pang, 1990a; Brooks y Cassone, 1992; *Columba*, Yuan y Pang, 1991; *Coturnix*, Yuan y Pang, 1990b, Yuan *et al.*, 1990), sin que se produzcan variaciones en la afinidad de los receptores a lo largo del ciclo diario completo. Este ritmo diario de densidad de receptores parece estar regulado por la propia melatonina endógena (Yuan y Pang, 1992).

En los peces, se han realizado algunos estudios sobre variaciones diarias en los receptores de melatonina en cerebro completo, encontrándose diferencias notables dependiendo de las especies. Conviene indicar que la mayoría de los estudios no evalúan los cambios muestreando a lo largo de un ciclo completo de 24 horas, sino que se limitan a analizar diferencias a medio día y media noche, diseño que impide encontrar posibles variaciones existentes entre otros puntos del ciclo diario. Hecha esta salvedad, en relación con los cambios diarios en la densidad de receptores en homogeneizados de cerebro completo, encontramos dos tipos de resultados. Por un lado los estudios realizados en salmónidos, en los que no se observan diferencias significativas en los receptores de

melatonina entre medio día y media noche (*Salmo salar*, Ekström y Vanecek, 1992; Pang *et al.*, 1994b; *Oncorhynchus mykiss*, Davies *et al.*, 1994; *Salvelinus fontinalis*, Pang *et al.*, 1994b) si bien en un estudio reciente en el salmón masu si se aprecian tales diferencias en la unión máxima (Bmax) (Amano *et al.*, 2003b). Por otro lado, una situación bien diferente es la que ocurre en otras especies, como el lucio (*Esox lucius*), en el que la capacidad de unión en el cerebro aumenta a lo largo de la fotofase, hasta llegar a un máximo al comienzo de la escotofase, descendiendo la Bmax a partir de este momento hasta un valor mínimo durante la transición oscuridad/luz (Gaildrat *et al.*, 1998), y el carpín (*Carasiuss auratus*), en el que se han descrito ritmos diarios significativos en la densidad de receptores de melatonina con los valores más elevados durante la fotofase y los mínimos al final de la fase oscura del fotociclo diario (Iigo *et al.*, 1994b, 2003b). En la lubina, al igual que en los salmónidos, no parecen existir diferencias significativas ni en la afinidad ni en la densidad de receptores a lo largo del ciclo luz/oscuridad en homogeneizados de cerebro completo (Bayarri *et al.*, 2004a). Sin embargo, en esta misma especie, la retina neural sí muestra diferencias diarias en la capacidad de unión de los sitios de unión de melatonina (Bayarri *et al.*, 2004b).

El patrón diario general de densidad de receptores de melatonina invertido respecto al ritmo endógeno de melatonina circulante sugiere también para los peces, como se ha propuesto en los mamíferos, un mecanismo autorregulador inhibitorio de la melatonina sobre sus propios receptores. Pruebas a favor de esta hipótesis se han presentado en un estudio realizado en el carpín, en el que tanto la pinealectomía como la exposición a la luz continua anulan dicho ritmo diario (Iigo *et al.*, 1995), pero no ha sido corroborado para esta misma especie en un estudio posterior en el que las variaciones día/noche de densidad se mantienen en animales expuestos a condiciones de oscuridad continua (Iigo *et al.*, 2003b). En la retina de la lubina las densidades más elevadas, paradójicamente, se han medido durante la noche, sin embargo este resultado también apoya la hipótesis de una regulación inhibitoria de la propia melatonina sobre sus receptores, ya que en esta especie, y de forma excepcional dentro de los vertebrados, la síntesis de melatonina ocular se produce durante el día (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997). En el caso del lucio, las variaciones diarias en la densidad de receptores en el cerebro parecen estar reguladas por un reloj circadiano, ya que no se ven alteradas en condiciones de curso libre (peces mantenidos en DD o en LL) (Gaildrat *et al.*, 1998).

En relación con los cambios en la afinidad, en general los estudios realizados en los peces no muestran variación diaria de dicho parámetro (Davies *et al.*, 1994; Iigo *et al.*, 1994, 2003; Amano *et al.*, 2003b). Únicamente en el lucio (Gaildrat *et al.*, 1998) y en el siluro

(*Silurus asotus*, Iigo *et al.*, 1997b) la afinidad de los receptores muestra cambios día/noche, aunque estos cambios de  $K_d$  son de pequeña magnitud en comparación con los observados en los niveles circulantes de melatonina en dichas especies, por lo que su significado fisiológico es muy discutido. En la retina de la lubina (*D. labrax*) la afinidad también experimenta cambios diarios, siendo máxima durante la escotofase y mínima durante la fotofase (Bayarri *et al.*, 2004b). Ya hemos mencionado que en esta especie el ritmo de síntesis de melatonina ocular está invertido, de modo que las bajas densidades y baja afinidad por la melatonina cuando los niveles de esta son máximos (durante la fotofase) apuntan a una acción desensibilizadora por parte de la indolamina, sin descartarse, como hemos mencionado anteriormente, la presencia de un oscilador que controle los ritmos de expresión de los receptores de melatonina independientemente de los niveles de dicha hormona (Bayarri *et al.*, 2004b).

### 3.4.2. CAMBIOS ESTACIONALES.

Se han descrito cambios estacionales en la unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la *pars tuberalis* de diferentes especies de mamíferos. La densidad de receptores de melatonina en la *pars tuberalis* del hámster europeo (*Cricetus cricetus*) aclimatado a condiciones naturales, es superior en primavera y verano, reduciéndose en invierno de forma significativa. Estos cambios son independientes de los niveles circulantes de testosterona (Skene *et al.*, 1992), por lo que el grado de madurez sexual no influye aparentemente en la regulación de la densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la *pars tuberalis* hipofisaria en esta especie. Lo mismo sucede en otras especies de mamíferos, como en el visón (*Mustela vison*) (Messenger *et al.*, 1997) y el erizo (*Erinaceus europaeus*). Además, en esta última, se ha comprobado que el núcleo supraquiasmático carece de regulación estacional en la densidad de receptores de melatonina (Gauer *et al.*, 1993c).

El hecho de que en todas estas especies el descenso de la densidad de sitios de unión observado en la *pars tuberalis* se correlacione con los períodos de inactividad sexual y con la hibernación, sugiere que las acciones del fotoperíodo regulando funciones estacionales como la hipotermia y la reproducción podrían estar mediadas, al menos en parte, por los cambios en la densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la *pars tuberalis*, no existiendo dicha regulación en el núcleo supraquiasmático, al menos en el erizo (Gauer *et al.*, 1993a).

Apenas existen datos en relación con cambios estacionales de los receptores de melatonina en vertebrados no mamíferos. Únicamente hay publicado un estudio en relación con cambios en función de la madurez sexual realizado por Amano y colaboradores (2003a)



en el salmón masu (*Oncorhynchus masou*). En dicho trabajo se muestran variaciones significativas en la densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el cerebro completo en función de la madurez sexual de los peces, los machos precoces presentan densidades superiores a las encontradas en las hembras inmaduras, pero las densidades cuando los machos finalizan la freza vuelven a igualarse.

### 3.4.3. CAMBIOS EN LA ONTOGENIA.

Se han descrito cambios notables en la densidad de receptores de la *pars distalis* adenohipofisaria de la rata durante la ontogenia (Vanecek, 1988b) y con la edad (Laitinen *et al.*, 1992). Tras el nacimiento se produce un descenso notable de la densidad, sin estar aún aclarados ni los factores que inducen este descenso ni su significado fisiológico. Se ha interpretado que la reducción postnatal de los receptores de melatonina puede estar relacionada con los menores requerimientos de termorregulación que demandan los individuos jóvenes respecto de los neonatos. No todas las regiones encefálicas modifican su densidad de receptores de melatonina con la edad. Así, y a diferencia de lo que sucede en la *pars distalis*, las densidades de receptores en la *pars tuberalis*, en el núcleo supraquiasmático y en el área postrema de la rata no se modifican durante el desarrollo ontogénico (Laitinen *et al.*, 1992). Una situación similar ocurre en el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), en el que la densidad de receptores de melatonina disminuye en la *pars distalis* hipofisaria a lo largo del desarrollo postnatal, sin que se produzcan cambios de densidad en la *pars tuberalis* (Vanecek y Kosar, 1994). Sin embargo, y al contrario de lo que sucede en la rata, la densidad de receptores en el núcleo supraquiasmático del hámster sirio disminuye tras el nacimiento (Duncan y Davis, 1993), coincidiendo este descenso con la desaparición del efecto encarrilador de la melatonina producido el día 6 postnatal (Grosse *et al.*, 1996).

En vertebrados poiquiloterms la información disponible acerca de modificaciones en los receptores de melatonina en función de la edad es muy limitada. Recientemente nuestro equipo de investigación ha cuantificado los sitios de unión de melatonina en preparaciones de membranas de copas ópticas y encéfalos completos a lo largo del desarrollo ontogénico del anfibio anuro más común de la Península Ibérica, la *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2003). La densidad de receptores en ambos tejidos es muy baja en premetamorfosis (estado 24), pero incrementa de forma progresiva hasta ser 10 veces superior en el estado 40, a partir del cual disminuye ligeramente en estados posteriores hasta alcanzar el clímax metamórfico. Además, dichos receptores ya son funcionales en estos estados larvarios, como lo sugiere la reducción de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por el

análogo no hidrolizable del GTP, el GTP $\gamma$ S (Isorna *et al.*, 2004a). Apoyando esta funcionalidad temprana del sistema hormonal de melatonina en los anfibios existen datos que demuestran una expresión rítmica de actividad AA-NAT desde fases muy tempranas del desarrollo (a partir del estado 25) en varias especies de anfibios anuros (Alonso-Gómez *et al.*, 1994).

Existe un estudio en peces en el que se describen diferencias en la densidad de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel debidas a la edad. Los ejemplares juveniles de dorada (*Sparus aurata*) tienen densidades significativamente menores que los adultos (Falcón *et al.*, 1996b).

#### **4. MODELOS *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE LA MELATONINA.**

En base a los estudios realizados en numerosos tejidos, podemos afirmar que los efectos de la melatonina muestran unas características comunes, como es el hecho de que están mediados por receptores de elevada afinidad que se encuentran acoplados a proteínas G, siendo el intervalo de concentraciones efectivas entre 10<sup>-11</sup> y 10<sup>-8</sup> M, muy similar a la afinidad de la unión de melatonina a sus receptores. Las vías de señalización intracelular de la melatonina implican a segundos mensajeros intracelulares, el AMPc (Carlson *et al.*, 1989; Morgan *et al.*, 1989b; Vanecek y Vollrath, 1989), el GMPc, el [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, el diacilglicerol, la proteína quinasa C o el ácido araquidónico (Vanecek y Klein, 1992a y b; Vanecek y Vollrath, 1989, 1990; McArthur *et al.*, 1997).

Puesto que se han identificado tres subtipos diferentes de receptores de melatonina codificados por tres genes distintos cabe esperar la existencia de diferentes vías de transducción utilizadas por esta señal neuroendocrina (Reppert *et al.*, 1996b), pudiendo acoplarse a distintos efectores a través de diferentes proteínas G. Un ejemplo lo encontramos en el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la acumulación de AMPc inducido por forskolin, tanto a través de proteínas G sensibles como no sensibles a la toxina pertúsica, en la *pars tuberalis* ovina (Morgan *et al.*, 1990), habiéndose descrito cinco proteínas G diferentes pertenecientes a la familia G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> sensibles a la toxina pertúsica, acopladas a seis sistemas de efectores diferentes (adenilato ciclasa, fosfolipasa C, canales de potasio, canales de calcio, canales de cationes sensibles a amilorida y canales de potasio sensibles al ATP) (Birnbaumer *et al.*, 1990). En el caso de la fosfolipasa C, los receptores de melatonina de tipo ML1 pueden activar las cascadas de transducción de la señal de la melatonina mediante dos vías: a través de la estimulación por la subunidad  $\alpha$  activada (Brydon *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 2002), o bien, mediante la

estimulación de la fosfolipasa C por el dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G (Godson y Reppert, 1997; Gubitzy y Reppert, 2000). La estimulación de esta vía conduce en último término a la activación de la proteína kinasa C (Witt-Enderby *et al.*, 2001).

Diferentes modelos tisulares se han utilizado en el estudio de la transducción de la señal de la melatonina:

#### a) MELANÓFOROS DÉRMICOS DE ANFIBIOS.

Los melanóforos dérmicos de anfibios constituyeron el primer sistema *in vitro* empleado para el estudio de los efectos de los indoles producidos por la glándula pineal. Lerner y colaboradores (1958 y 1959) desarrollaron el modelo de la piel de rana aislada para bioensayos de la sustancia producida por la glándula pineal, y finalmente consiguieron aislar la melatonina y caracterizar su estructura. Novales y colaboradores (1963) desarrollaron un modelo alternativo mediante el uso de melanóforos migrados a partir de explantes de tubo neural de anfibios y cultivos de crestas neurales. Posteriormente se han utilizado los cultivos de células aisladas de la aleta caudal de larvas de *Xenopus*, así como cultivos de melanóforos aislados (Seldenrijk *et al.*, 1979; Fukuzawa y Ide, 1983). En estos modelos, la melatonina induce la agregación de los gránulos de pigmento (melanina) en torno al núcleo (Lerner *et al.*, 1959 y 1960; Case y Wright, 1960; Ebisawa *et al.*, 1994), ejerciendo un potente efecto aclarador de la piel en estas especies. El aumento del AMPc intracelular es un estímulo suficiente para que se produzca la dispersión de los gránulos de pigmento, mientras que su descenso provoca la agregación de los mismos (Sammak *et al.*, 1992). La melatonina inhibe el aumento de AMPc inducido por MSH, con inhibidores de la fosfodiesterasa o con forskolin, revirtiendo el oscurecimiento de la piel inducido por estos agentes (White *et al.*, 1987; Daniolos *et al.*, 1990). Este efecto se ha comprobado en diferentes tejidos y especies, no descartándose la implicación del calcio y otros mensajeros intracelulares en este proceso. El hecho de que el efecto de la melatonina sea bloqueado por la adición de la toxina pertúsica, demuestra que los receptores de melatonina implicados en esta acción están acoplados a proteínas G sensibles a la toxina (White *et al.*, 1987; Sugden, 1991). Por otro lado, este efecto de la indolamina sobre la pigmentación es transitorio, se produce únicamente durante los primeros 20-30 minutos de tratamiento, transcurridos los cuales los melanóforos pierden sensibilidad a la melatonina y al cabo de 1-3 horas se produce de nuevo la dispersión (Rollag y Lynch, 1993).

## b) RETINA.

Dubocovich (1983) utilizó por primera vez este modelo para estudiar los efectos de la melatonina, describiendo la inhibición que ejercen el indol y sus derivados sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina. La liberación espontánea de dopamina es muy baja, pero se estimula fácilmente por despolarización, requiriendo la presencia de calcio en el medio extracelular (Dubocovich, 1983; Dubocovich y Hensler, 1986). La melatonina carece de efecto sobre la liberación espontánea de dopamina, pero es un inhibidor muy potente de la liberación inducida de dopamina, mostrando una IC<sub>50</sub> en el intervalo de 10<sup>-11</sup> M (Dubocovich, 1983). Se ha demostrado que la indolamina inhibe tanto el incremento de AMPc estimulado por dopamina o forskolin en cultivos de fotorreceptores procedentes de retinas embrionarias de pollo (Iuvone y Gan, 1994, 1995), como su acumulación inducida por forskolin en preparaciones de iris-cuerpo ciliar ocular del conejo (Osborne y Chidlow, 1994) y en el epitelio pigmentado retiniano humano y de rata (Nash y Osborne, 1995). Estos efectos se impiden con un pretratamiento con toxina pertúsica, lo que demuestra que esta acción de la melatonina se realiza a través de receptores acoplados a proteínas G sensibles a dicha toxina. Estos mismos receptores acoplados a proteínas G sensibles a toxina pertúsica median la acción reguladora de la melatonina sobre la liberación rítmica diaria de dopamina en cultivos de retina del carpín (Ribelayga *et al.*, 2004).

El efecto regulador de la melatonina sobre la liberación de dopamina es clave en la fisiología de la visión. Como ya hemos comentado anteriormente, la dopamina ocular es liberada durante la adaptación a la luz, actuando como mediador de numerosos procesos de la visión fotópica (Djamgoz y Wagner, 1992). La inhibición de su liberación por melatonina estaría desencadenando la adaptación de las funciones oculares a la oscuridad. Así por ejemplo, en *C. auratus*, se ha comprobado que el efecto modulador de los movimientos de conos y bastones en las células horizontales producido por la melatonina endógena se realiza a través de receptores de la subfamilia D<sub>2</sub> dopaminérgicos, ya que la adición del antagonista de estos receptores impide dicho efecto de la melatonina (Ribelayga *et al.*, 2004).

## c) PARS TUBERALIS.

Este modelo es muy reciente y se empezó a utilizar a partir del hallazgo en los mamíferos de una elevada densidad de unión de iodomelatonina en la *pars tuberalis* hipofisaria. La *pars tuberalis* forma parte de la adenohipófisis, adyacente a la eminencia media hipotalámica y se compone principalmente de dos tipos celulares, células granulares, ricas en vesículas electrodensas y similares a las células de la *pars distalis*, y células

neurosecretoras que presentan escasas vesículas o carecen de ellas (Morgan *et al.*, 1991), existiendo diferencias notables en la *pars tuberalis* de las diferentes especies de mamíferos. Así, por ejemplo, el 15% de las células de la *pars tuberalis* son gonadotropas en la oveja (Tillet *et al.*, 1990), mientras sólo el 5% son positivas a LH/FSH en la rata (Gross, 1984).

Se ha sugerido que la *pars tuberalis* en los mamíferos puede estar implicada en la regulación de funciones estacionales como la reproducción (Wittkowski *et al.*, 1988), siendo la diana de la melatonina en la regulación estacional de la liberación de prolactina, a pesar de que no sea responsable de la involución gonadal regulada por gonadotropinas (Lincoln y Clarke, 1995; Maywood y Hastings, 1995).

La melatonina inhibe, a través de mecanismos dependientes de AMPc, la liberación de distintas proteínas sintetizadas en la *pars tuberalis* ovina (Morgan *et al.*, 1992), y es capaz de controlar la expresión génica de determinados factores de transcripción en esta misma región cerebral (McNulty *et al.*, 1994, 1996).

#### d) NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.

El núcleo supraquiasmático es un modelo muy interesante para los estudios de la transducción de la melatonina como señal, ya que presenta una elevada concentración de receptores de melatonina a lo largo del ciclo vital, desempeñando un papel clave en el sistema circadiano de los vertebrados. El núcleo supraquiasmático mantiene su ritmicidad circadiana en cultivo, conservando sus ritmos de actividad eléctrica y metabólica durante días e incluso semanas no sólo en cultivos de explantes de dicho núcleo, sino también en neuronas dispersas del mismo (Shibata *et al.*, 1992a y b; Welsh *et al.*, 1995). La melatonina ejerce un claro efecto regulador de dicha ritmicidad (Shibata *et al.*, 1989; Stehle *et al.*, 1989).

Las preparaciones de neuronas procedentes del núcleo supraquiasmático de rata y de hámster exhiben un ritmo de potenciales de acción espontáneos, con frecuencia máxima hacia la mitad del día subjetivo y mínima durante toda la noche (Mason *et al.*, 1987). La melatonina reduce dicha frecuencia de forma rápida y reversible (Shibata *et al.*, 1989; Stehle *et al.*, 1989; Mason y Rusak, 1990), efecto mediado por receptores acoplados a proteínas G sensibles a la toxina pertúsica (McArthur *et al.*, 1997). Puesto que la frecuencia de actividad eléctrica espontánea se reduce en cultivos libres de calcio (Shibata y Moore, 1987), los descensos en la concentración intracelular del mismo podrían estar implicados en el mecanismo de acción de la melatonina sobre la tasa de descarga de las neuronas del núcleo supraquiasmático. Además de este efecto inhibitorio agudo, la melatonina también provoca cambios de fase en los ritmos de actividad eléctrica en cultivos de núcleo

supraquiasmático de rata y hámster sirio cuando se administra durante las ventanas temporales de sensibilidad a la indolamina (Starkey *et al.*, 1995; Weaber *et al.*, 1996; McArthur *et al.*, 1997).

Se han identificado dos regiones diferenciadas en el núcleo supraquiasmático: la ventrolateral, que recibe conexiones directas desde la retina a través del tracto retinohipotalámico y que contiene predominantemente neuronas productoras de VIP; y la dorsomedial, que contiene células vasopresinérgicas (Moore, 1973; 1983; Cassone *et al.*, 1988b). La unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el núcleo supraquiasmático del hámster se produce predominantemente en la mitad rostral del núcleo y se extiende a lo largo de la zona mediolateral del mismo (Maywood *et al.*, 1995). Por su parte, en su región caudal, la unión de iodomelatonina es más débil y restringida a la división media del mismo. La distribución de la unión de iodomelatonina está estrechamente relacionada con la expresión del mRNA de la vasopresina. Con todos estos datos se puede suponer que los receptores de melatonina no se encuentran en las células retinorreceptoras del núcleo, sino que podrían encontrarse en las vasopresinérgicas que se han propuesto como candidatas a oscilador endógeno.

El núcleo supraquiasmático de los peces, aunque recibe aferencias de la retina, no parece representar un marcapasos central, como sucede en los mamíferos. Utilizando técnicas de hibridación *in situ* y autorradiografía no se ha podido detectar expresión génica del receptor de melatonina ni sitios de unión a 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en dicho núcleo de la trucha (Mazurais *et al.*, 1999).

#### e) ARTERIA CAUDAL.

La melatonina induce contracción dosis-dependiente en segmentos de la arteria caudal distal, por lo que estos segmentos aislados pueden constituir un modelo útil para investigar receptores de melatonina. En ratas jóvenes las acciones vasoconstrictoras de la melatonina pueden estar desempeñando un papel importante en los procesos de termorregulación, ya que la melatonina produce una fuerte vasoconstricción directa en ratas de 4-5 semanas de edad, pero no en arterias procedentes de ratas adultas, si bien en presencia de un cierto tono inducido por fenilefrina sí produce una pequeña respuesta vasoconstrictora en algunos vasos (Laitinen *et al.*, 1992). Esta dependencia del efecto en función de la edad se corresponde con la pérdida de sitios de unión de melatonina a lo largo del desarrollo postnatal observada en las arterias caudal y cerebral anterior (Laitinen *et al.*, 1992).

#### f) LÍNEAS CELULARES TRANSFECTADAS.

La clonación de los receptores de melatonina ha permitido el estudio de las vías de transducción de la melatonina en células transfectadas con los genes de los receptores de la indolamina. En la línea celular NIH 3T3, que expresa de forma estable los receptores humanos, MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, se ha podido demostrar que el receptor de melatonina se encuentra acoplado a proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> e inducen la inhibición de la adenilato ciclasa (Reppert *et al.*, 1995b; Godson y Reppert, 1997). En estas mismas líneas celulares se ha determinado que el receptor MT<sub>1</sub> es capaz de activar además otros sistemas de segundos mensajeros, como la hidrólisis de los fosfoinosítidos potenciando la acumulación de inositol trifosfato inducida por prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), así como la liberación de araquidonato inducida por PGF<sub>2α</sub> o por ionomicina, siendo ambos efectos sensibles a la toxina pertúsica (Godson y Reppert, 1997).

Este modelo resulta idóneo al permitir la obtención de una población homogénea de células que expresan receptores de melatonina, lo que no sucede con células naturales. No obstante, hay algunos inconvenientes, como es la posibilidad de que receptores sobreexpresados puedan acoplarse con otros efectores distintos de los que se dan en condiciones fisiológicas. Otra desventaja puede deberse a que las células transfectadas sólo tienen la maquinaria de la línea celular empleada y, en consecuencia, podría perderse algún mecanismo de transducción importante para la función de la melatonina. Por tanto, los resultados obtenidos mediante el empleo de esta técnica deben interpretarse con cuidado. Como alternativa a las líneas celulares transfectadas, se han utilizado ovocitos de *Xenopus* inyectados con el mRNA de distintos subtipos de receptores.

## **II. OBJETIVOS**



La melatonina es una neurohormona utilizada por los vertebrados como mensajero transductor de información ambiental, que interviene en la sincronización de numerosas funciones rítmicas diarias y estacionales. La mayoría de las funciones rítmicas en las que participa la melatonina están mediadas por receptores de membrana específicos para esta indolamina, si bien el conocimiento que tenemos en la actualidad de estos receptores procede de estudios realizados principalmente en los mamíferos, existiendo muy pocos datos en vertebrados ectotermos. En los últimos años, nuestro equipo de investigación ha centrado su actividad en el estudio de distintos aspectos de la regulación ambiental y endógena de la producción de melatonina, tanto en peces como en anfibios.

Una de las especies que, en los últimos años, venimos utilizando en nuestro grupo de investigación de la Universidad Complutense es la tenca (*Tinca tinca*), ciprínido de interés comercial en acuicultura, y de la que nuestro equipo posee una abundante información sobre varios aspectos básicos de su fisiología. La tenca es un teleosteo nocturno que muestra una marcada ritmicidad diaria y estacional, que le configura como un modelo idóneo para el estudio del papel de la melatonina como sincronizador de funciones rítmicas en los peces, y del que no existe información previa en este tema. Por tanto, el objetivo global de la presente Tesis Doctoral ha sido la localización y caracterización de los receptores de melatonina en esta especie, mediante ensayos de radioligando, utilizando como herramienta un ligando de elevada afinidad y especificidad, la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel.

El primer objetivo concreto que nos planteamos, y con el fin de identificar los tejidos diana para la melatonina en esta especie, fue la localización de posibles sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel, y su cuantificación, tanto en tejidos centrales como periféricos.

Una vez conocida la distribución de los sitios de unión de melatonina en la tenca, a continuación nos propusimos realizar la caracterización bioquímica de la unión del radioligando mediante ensayos de saturación, estudios cinéticos y análisis farmacológicos en retina neural y techo óptico, como prototipos de dianas centrales para la melatonina, y en el corazón y el riñón, como modelos más apropiados de dianas periféricas.

Teniendo en cuenta el marcado perfil rítmico diario y estacional que muestra la melatonina en la práctica totalidad de las especies investigadas, el siguiente objetivo a desarrollar fue investigar la evolución temporal de los receptores de melatonina. En concreto, estudiamos los ritmos diarios y estacionales de la densidad de sitios de unión, con el fin de averiguar si existe una posible correlación con la producción rítmica de esta indolamina en esta especie. Realizamos ensayos de unión a lo largo de ciclos completos de 24 horas en cada una de las estaciones del año, y analizamos los ritmos día-noche de la

densidad de los receptores de melatonina, y la variación de su afinidad en diferentes tejidos centrales y periféricos de la tenca. Dicha ritmicidad diaria podría estar determinada por un oscilador endógeno, o por el contrario depender simplemente de las condiciones rítmicas ambientales. Para distinguir cual de estas dos posibilidades tiene lugar en la tenca, realizamos ensayos de unión en animales sometidos a condiciones de oscuridad constante durante varios ciclos diarios, evaluando la respuesta de los receptores.

Conociendo el papel clave desempeñado por factores ambientales en el control de los ritmos de melatonina, nos propusimos estudiar la posible regulación del ritmo diario de receptores de melatonina en la tenca por parte de dos factores exógenos principales, la luz y la temperatura, para lo cual abordamos varios diseños experimentales en la retina neural y en el techo óptico, áreas implicadas en la percepción e integración de la señal fotosensorial, respectivamente.

Por un lado nos planteamos determinar si la intensidad lumínica recibida por los animales es capaz de provocar cambios tanto de densidad, como de afinidad de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. Para ello, en primer lugar, realizamos ensayos de unión en animales expuestos a dos intensidades luminosas distintas durante la fotofase. En segundo lugar, estudiamos el efecto agudo de un pulso de luz de distintas intensidades y de sólo una hora de duración aplicado en mitad de la escotofase, a fin de averiguar en qué medida es capaz de modular la densidad y afinidad de los receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la retina neural y el techo óptico.

Por otro, estudiamos el papel de la temperatura del ensayo sobre el mecanismo de unión del radioligando a su receptor. Para lo cual, a partir de una única preparación de membranas de retina neural, techo óptico y riñón, se llevaron a cabo ensayos de saturación y cinéticos a tres temperaturas distintas: 15, 25 y 30°C. La sensibilidad térmica de las constantes de asociación y disociación así obtenidas se estimó a partir de los coeficientes de temperatura  $Q_{10}$ .

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. MATERIALES.

### 1.1. Productos.

#### a) Reactivos.

- Ácido clorhídrico (0317, Merck)
- Albúmina sérica bovina (A-7030, Sigma)
- Cloruro magnésico (M-9272, Sigma)
- EGTA (E-4378, Sigma)
- Etanol (0003, Scharlau)
- Hidróxido sódico (6498, Merck)
- Pararosanilina (P-7632, Sigma)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (251567, Panreac)
- Sulfato cúprico (52367, Probus)
- Sulfato sódico (131716, Panreac)
- Tartrato sódico-potásico (8087, Merck)
- Trizma base (T-1503, Sigma)

#### b) Fármacos.

- N-acetil-5-hidroxitriptamina (A-1824, Sigma)
- N-acetil-5-metoxitriptamina (M-5250, Sigma)
- 6-cloromelatonina (C-0331, Sigma)
- 2-fenilmelatonina (0680, Tocris)
- 5-hidroxitriptamina (H-7752, Sigma)
- 2-iodomelatonina (I-1899, Sigma)
- Luzindol (L-2407, Sigma)
- Metanosulfonato de tricaína (MS-222) (A-5040, Sigma)
- 5-metoxicarbonilamino-N-acetilriptamina (GR 135531) (0896, Tocris)
- 5-metoxi-N-ciclopropanoilriptamina (0766, Tocris)
- 5'-O-(3-tiotrifosfato) de guanosina (G-8634, Sigma)
- 4-fenil-2-propionamidotetralina (1034, Tocris)

#### c) Radioligandos.

- 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina (Amersham International, Buckinghamshire, UK)

## 1.2. Instrumental.

- Agitador multitubos (Corning, modelo 4010)
- Balanzas de precisión (Sartorius 1405 y Sauter 404)
- Baño de órganos termostatzado (Unitronic, modelo 320 OR)
- Bomba de aspiración A-35 (Eyela, Tokio Rikakikai, Japón)
- Cámara fotográfica (Canon, modelo EOS 300)
- Campana extractora
- Centrífuga refrigerada (Sorvall Instruments, modelo RC5C)
- Congelador a -25°C (Liebherr) y -80°C (Forma Scientific 823)
- Contador gamma (Perkin Elmer Lifesciences, modelo Wallac Wizard 1470)
- Dispensador de comida 24 h (Modelo "clockwork", Corelsa)
- Espectrofotómetro (Spectronic 1201, Milton Roy)
- Filtros de fibra de vidrio (cat. Nº APFCO2500, Millipore)
- Guillotina
- Homogeneizadores tipo potter
- Lupas binoculares
- Material de disección
- Microcentrífuga (Heraeus, modelo Biofuge 13)
- pHmetro (Crison, modelo GLP 21)
- Pipetas automáticas (Gilson y Biohit)
- Sistema de filtración (Millipore, modelo 1225)
- Sonicador (Dr. Hielscher GmbH UP-50H, Biogen Científica)

## 1.3. Material biológico: obtención y mantenimiento.

Los animales utilizados para la realización del trabajo experimental son de la especie *Tinca tinca* (tenca), perteneciente al Orden *Cipriniformes*, Familia *Ciprinidae* y a la Subfamilia *Leuciscinae*.

Los ejemplares de *T. tinca* fueron suministrados por la piscifactoría "Ipscón" (Salamanca) y por el Centro Nacional de Ciprinicultura "Vegas del Guadiana" (Badajoz). Los animales, machos y hembras adultos de 15-20 centímetros de longitud y 80-150 gramos de peso corporal, se mantuvieron en las instalaciones habilitadas para el mantenimiento de peces en el campo de prácticas de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) de la Universidad Politécnica de Madrid, en tanques de 5 m<sup>3</sup>, dotados de sistemas de aireación y renovación continua de agua. Los peces estuvieron expuestos a condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura.

La alimentación se realizó a base de pienso granulado para peces (Dibaq, Diprotec). La comida (1% del peso corporal/día) se administraba ininterrumpidamente durante las 24 h del día mediante un comedero que libera al agua de forma continua cantidades homogéneas de pienso, lo que permite el fácil acceso de los animales al alimento según sus necesidades. Este dispositivo era puesto en funcionamiento una vez al día, ya que el mecanismo de liberación de comida funciona hasta un máximo de 24 h, tras las cuales debe de ponerse nuevamente en funcionamiento.

Los animales se aclimataron a estas condiciones generales durante al menos tres semanas antes de ser utilizados en cada uno de los experimentos. En algunos diseños experimentales se modificaron estas condiciones, en cuyo caso se especificará en cada experimento concreto.

## **2. MÉTODOS.**

### **2.1. Obtención de muestras.**

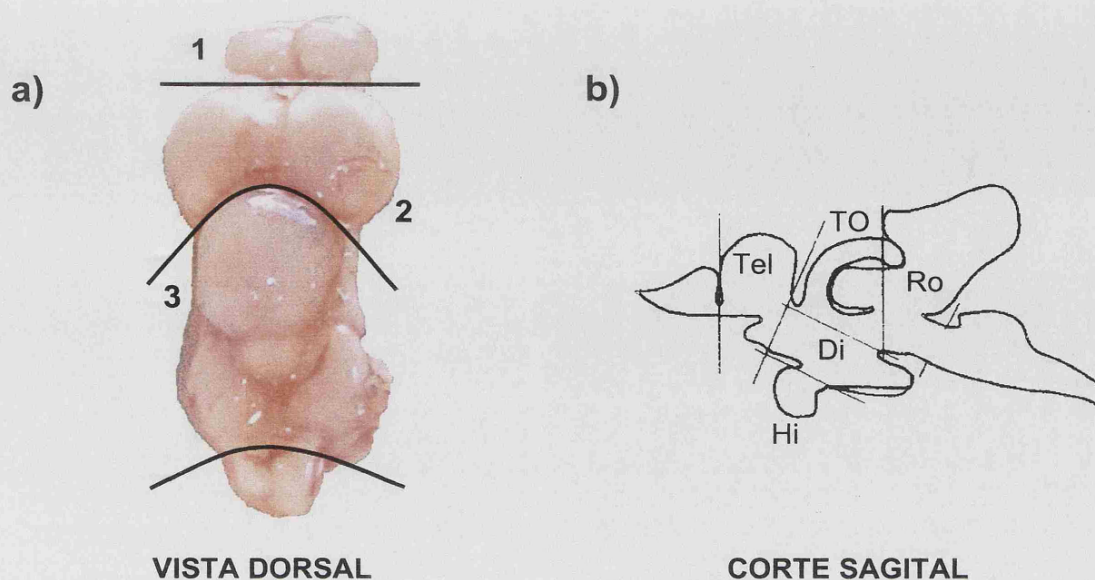
Los animales fueron decapitados por detrás del opérculo, procediéndose inmediatamente después a la extracción de los diferentes tejidos centrales y periféricos.

#### **2.1.1. ENCÉFALO.**

Mediante unas tijeras de disección se realizan dos cortes longitudinales hacia la parte anterior de la cabeza, desde cada uno de los dos forámenes de los que dispone el cráneo de estos animales. De este modo se levanta la parte dorsal del cráneo, pudiéndose acceder de forma directa al encéfalo. Mediante la ayuda de una lupa binocular se separan las distintas regiones encefálicas siguiendo las líneas indicadas en la Fotografía 3.

#### **2.1.2. DISECCIÓN DEL TEJIDO OCULAR.**

Con ayuda de unas tijeras curvas de cirujía, se extraen los globos oculares con la menor cantidad de tejido extraocular externo posible y se sumergen en el tampón de ensayo (véase el apartado 2.2). Posteriormente y bajo la lupa binocular se limpia de forma individual cada globo ocular del resto de tejido extraocular. Para la separación de los diferentes tejidos oculares, se realiza una incisión circular a nivel de la *ora serrata* (Esquema 7) mediante la ayuda de unas tijeras de iridectomía, lo que nos permite retirar la córnea y el iris, que son inmediatamente separados. De la copa óptica restante, a continuación, se extraen el cristalino y el humor vítreo, quedando visible la retina neural y el epitelio pigmentado, que se separan con ayuda de unas pinzas finas. Se congelan en seco



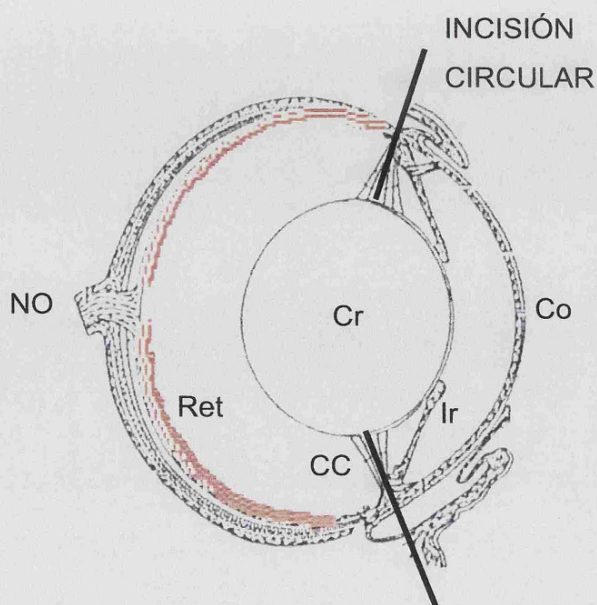
**Fotografía 3. a)** Líneas de corte para la separación de tejidos encefálicos en *T. tinca*. 1. Telencéfalo; 2. Techo óptico; 3. Rombencéfalo. **b)** Corte del encéfalo de un teleosteo Bayarri *et al.*, 2004a): Di: Diencefalo; Hi: Hipófisis; Tel: Telencéfalo; TO: Techo óptico; Ro: Rombencéfalo.

en CO<sub>2</sub> sólido el iris, la retina neural y el epitelio pigmentado y se conservan a -80°C hasta su procesamiento posterior.

### 2.1.3. TEJIDOS PERIFÉRICOS.

Para la obtención de los órganos periféricos, se realiza una incisión longitudinal a lo largo de la línea media ventral del pez, accediendo de este modo al abdomen. Se extraen de forma separada los riñones, el corazón, el tubo digestivo completo, que se divide en tres segmentos, anterior, medio y posterior, las gónadas, el bazo, el hígado, y una muestra de músculo esquelético de la zona dorsal. Las branquias y las muestras de piel se extraen directamente de la cabeza del animal.

Todos los tejidos se congelan inmediatamente en seco en CO<sub>2</sub> sólido en tubos eppendorf de polipropileno de 1,5 ml, conservándose a -80°C hasta la posterior valoración de sitios de unión de melatonina.



**Esquema 7.** Diagrama de un corte sagital del globo ocular. CC: Cuerpo ciliar; Co: Córnea; Cr: Cristalino; Ir: Iris; NO: Nervio óptico; Ret: Retina.

## 2.2. Preparación de las membranas biológicas.

Para la preparación de las membranas biológicas (Esquema 8), los tejidos son sonicados en el tampón de ensayo (pH 7,4) cuya composición es la siguiente:

- Trizma base	50 mM
- Cloruro magnésico	5 mM
- EGTA	1 mM

El pH se ajusta a 7,4 mediante la adición de HCl 12 N.

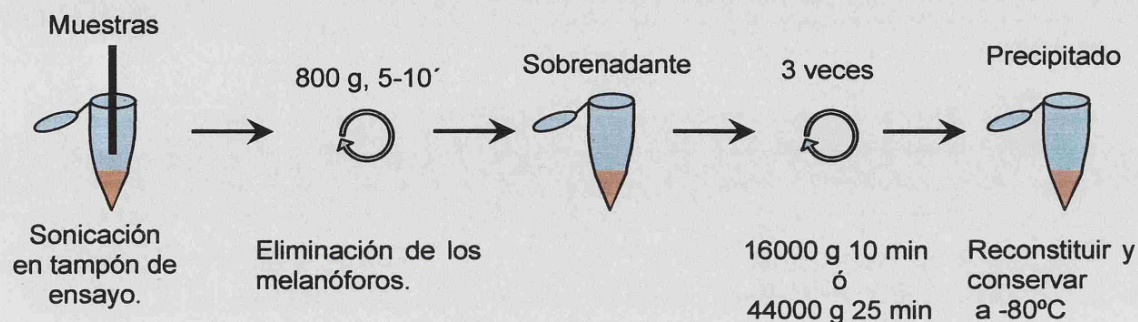
Los volúmenes en los que se homogeneiza cada tejido son:

- Retina neural, iris y distintas regiones encefálicas e hipófisis: 400  $\mu$ l de tampón de ensayo.
- Riñón, branquias, tubo digestivo, corazón, hígado, bazo, testículo, ovario, músculo y piel: 800  $\mu$ l de tampón de ensayo.

Tras conseguir la homogeneización del tejido mediante sonicación (a 4°C y al 50% de la salida a 25 w), se realiza una centrifugación a baja velocidad (800 g) durante 10 minutos, con el fin de precipitar el elevado contenido de gránulos de pigmento que



presentan estos tejidos y que interfieren en el ensayo aumentando la unión inespecífica (Isorna *et al.*, 2004a).



**Esquema 8.** Procedimiento general para la preparación de la solución de membranas plasmáticas a partir de diferentes tejidos de *Tinca tinca*.

El sobrenadante es de nuevo centrifugado, la velocidad de centrifugación y el tiempo difiere dependiendo de los tejidos:

- Retina, iris, hipófisis y diferentes áreas encefálicas: 16000 g, 10 min.
- Riñón, branquias, tubo digestivo, corazón, hígado, bazo, testículo, ovario, músculo y piel: 44000 g, 25 min.

Tras la centrifugación, se eliminan los sobrenadantes y los precipitados se vuelven a reconstituir en los siguientes volúmenes de tampón de ensayo:

- Retina, iris y encéfalo: 400  $\mu$ l de tampón.
- Riñón, branquias, tubo digestivo, corazón, hígado, bazo, testículo, ovario, músculo y piel: 1 ml de tampón.

El proceso de lavado se vuelve a repetir dos veces. Tras el último lavado, los precipitados se reconstituyen en diferentes volúmenes de tampón de ensayo, dependiendo del tejido:

- Retina: 200  $\mu$ l/par de retinas.
- Iris: 100  $\mu$ l/10 iris.
- Hipófisis: 100  $\mu$ l/10 hipófisis.
- Distintas regiones encefálicas: 100  $\mu$ l/región.

- Riñón, branquias, tubo digestivo, corazón, hígado, bazo, testículo, ovario, músculo y piel: 200 µl de tampón.

A continuación se reservan las siguientes cantidades de los extractos de membranas para la determinación del contenido de proteínas:

- Retina, iris y regiones encefálicas: 5 µl (contienen aproximadamente 10-25 µg prot).
- Riñón, branquias, tubo digestivo, corazón, hígado, bazo, testículo, ovario, músculo y piel: 7 µl (contienen aproximadamente 50-100 µg prot).

El resto de volúmenes de los extractos se congela a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la posterior cuantificación de los sitios de unión para melatonina.

## 2.3. Técnicas analíticas.

### 2.3.1. PRINCIPIO DE ENSAYO DE RADIOLIGANDO (ERL).

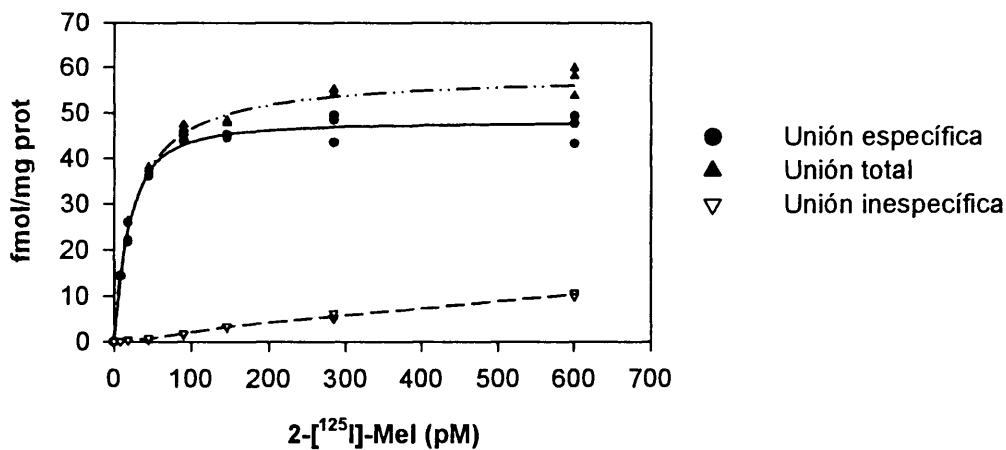
Para que una proteína pueda ser considerada como un receptor de un mensajero químico, debe cumplir una serie de propiedades que vienen determinadas principalmente por la baja concentración de mensajero. Un receptor debe presentar:

- Elevada afinidad por el ligando, es decir, el receptor puede unir el mensajero incluso cuando éste se encuentra a concentraciones muy bajas.
- Elevada especificidad por el ligando, así como una baja tendencia a unirse a otro tipo de moléculas.
- Baja capacidad, es decir, que la cantidad de receptores en el tejido sea baja.
- Finalmente, la distribución del receptor debería corresponderse con los tejidos diana conocidos para el mensajero, así como relacionarse con algún efecto biológico conocido (Gomperts *et al.*, 2002).

Algunos mensajeros extracelulares pueden unirse *in vitro* a ciertas proteínas diferentes de sus receptores específicos, especialmente en homogeneizados de células o tejidos, donde la ruptura de la arquitectura de la célula facilitaría la exposición al ligando de sitios de unión potenciales que en condiciones *in vivo* no se encuentran accesibles para el mismo. Este hecho resulta de vital importancia a la hora de distinguir entre una **unión específica**, que muestra elevada afinidad y baja capacidad de unión (es decir, concentraciones relativamente bajas de ligando similares a las concentraciones endógenas

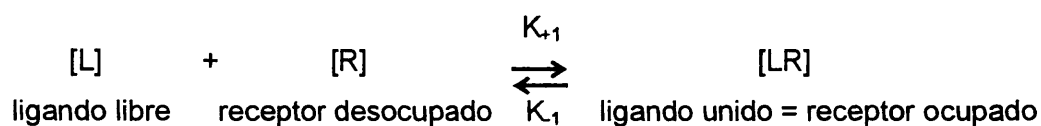
son suficientes para saturar al receptor), y la **unión inespecífica**, con baja afinidad y elevada capacidad de unión. Estos sitios de unión inespecífica no se saturan hasta que son expuestos a concentraciones muy elevadas de ligando, muy superiores a las concentraciones fisiológicas. Para medir la unión específica se dispone en la actualidad de ligandos marcados radiactivamente, gracias a los cuales se puede determinar la capacidad de unión total de una célula o de un tejido. La unión inespecífica se determina tras la adición al tejido del ligando marcado junto con un exceso de ligando no marcado radiactivamente, que desplazará selectivamente al ligando marcado de su unión al receptor específico (Gomperts *et al.*, 2002). La diferencia entre la unión total (tejido con radioligando sólo) y la unión inespecífica (tejido con exceso de ligando no marcado) nos permite estimar la unión específica (Gráfica 1).

El procedimiento gráfico comúnmente utilizado para calcular tanto la afinidad de un receptor por su ligando como la densidad de receptores es el **análisis de Scatchard**, relación empleada por primera vez por G. Scatchard (1949). A pesar de que el método implica ciertas presunciones a la hora del manejo de los datos, proporciona información sobre la afinidad (pendiente de la recta), número de receptores (intersección con el eje y), así como el número de sitios de unión distintos presentes en la muestra (línea recta cuando hay un único sitio de unión, frente a una gráfica curvilínea cuando hay más de uno).



**Gráfica 1.** Determinación de la unión específica e inespecífica de melatonina usando como radioligando 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina. La unión inespecífica no se ve afectada por la cantidad de ligando añadido, ya que los sitios de unión inespecífica presentan una elevada capacidad. La unión inespecífica se determina añadiendo un exceso de melatonina no marcada, con el fin de desplazar la unión específica. La diferencia entre la unión observada sin o con exceso de ligando no marcado, se define como la unión saturable o específica.

Para el análisis de Scatchard, se debe asumir que el ligando se une de forma reversible a su receptor, dando lugar a un equilibrio químico entre la forma libre [L] y el complejo ligando-receptor [LR]:



La velocidad de la asociación del ligando al receptor se define como la **tasa de asociación**,  $K_{+1}$ , mientras que la tendencia a disociarse del complejo ligando-receptor se describe como la **tasa de disociación**,  $K_{-1}$ . En el equilibrio:

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

que puede expresarse como:

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

donde  $K_d$  representa la constante de disociación, siendo la inversa de dicha constante, la constante de asociación:

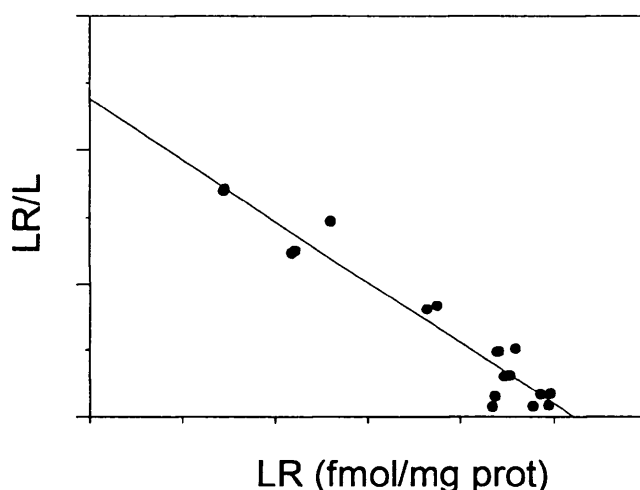
$$K_d = \frac{1}{K_a}$$

Por tanto:

$$K_a = \frac{[LR]}{[L][R]}$$

Si un número fijo de receptores se incuban con concentraciones crecientes de ligando, el número de receptores ocupados también se incrementará hasta que todos los receptores presentes formen complejo con el ligando (100 % de unión ó saturación). En la saturación, el número de moléculas de ligando unidas, se iguala al número de receptores disponibles, por lo que el cociente de ligando unido y ligando libre, se aproxima a cero. Si se representa el cociente unido/libre para cada réplica del ensayo frente a la concentración de ligando unido, la teórica línea recta que resulta intercepta con el eje de ordenadas de la gráfica en un punto que define el número total de receptores o la capacidad máxima del receptor ( $B_{max}$ ). Esta gráfica se conoce como **representación de Scatchard** (Gráfica 2). La pendiente de la línea en la representación de Scatchard es igual al valor negativo de la  $K_a$  ( $-1/K_d$ ). Por tanto, conociendo únicamente el ligando unido y el cociente entre ligando

unido y libre, se puede extrapolar el número de receptores y la constante de asociación de un receptor (Gomperts *et al.*, 2002).



**Gráfica 2.** Representación de Scatchard para la determinación de receptores. LR, ligando unido; L, ligando libre.

En ocasiones las representaciones de Scatchard no rinden una línea recta sino más bien una línea curva cóncava. La explicación más común es que existen en la muestra varios sitios de unión con distinta afinidad. Para estas ocasiones existen métodos matemáticos que permiten cuantificar por separado la cantidad y afinidad de cada uno de estos distintos tipos de sitios de unión.

#### 2.3.1.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DEL ENSAYO.

El ensayo se realiza en un volumen total de 50  $\mu$ l conteniendo el tampón de ensayo (apartado 2.2), la suspensión de membranas plasmáticas, el radioligando (2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina, 2000 Ci/mmol) y melatonina (1  $\mu$ M) en el caso de las réplicas en las que se valora la unión inespecífica y careciendo de ésta en los tubos en los que se va a cuantificar la unión total. Los tiempos de incubación varían dependiendo del tejido empleado así como del tipo de ensayo a realizar, ya sea de saturación, cinético o farmacológico, cuyas condiciones se indican con detalle en cada apartado correspondiente de la presente Memoria. Transcurrido el tiempo de incubación se detiene la reacción mediante la adición de tampón de ensayo (750  $\mu$ l) a 4°C e inmediatamente se realiza la separación de la fracción libre del radioligando de la unida al receptor mediante un procedimiento de filtración (filtros de fibra de vidrio, Millipore APFC). A continuación se lavan nuevamente los filtros con 4 ml de tampón de ensayo a 4°C, se recogen los filtros y se introducen en viales para el recuento de la radiactividad unida a las membranas que quedan retenidas en el filtro.

**2.3.1.2. CURVAS DE SATURACIÓN.**

Con el fin de conocer la afinidad y la capacidad máxima de unión de los receptores presentes en las suspensiones de membranas obtenidas en cada uno de los tejidos empleados en la presente Memoria, así como para para ayudarnos a discernir entre las diferentes familias de receptores se realizan las curvas de saturación, que a su vez nos permiten conocer las concentraciones óptimas de radioligando que deben emplearse en ensayos posteriores. El procedimiento estándar es el siguiente:

- Los ensayos se realizan a 25°C y su duración es de 90 minutos.
- El volumen total en el que se realizan los ensayos es de 50 µl, conteniendo:

- **Retina, iris, epitelio pigmentado y techo óptico:**

	NSB	UNIÓN TOTAL
Tampón de ensayo	20 µl	25 µl
Melatonina (1 µM)	5 µl	-
Tejido	5 µl (5-50 µg prot.)	5 µl (5-50 µg prot.)
Radioligando	20 µl	20 µl

- **Corazón:**

	NSB	UNIÓN TOTAL
Tampón	18 µl	23 µl
Melatonina (1 µM)	5 µl	-
Tejido	7 µl (20-50 µg prot.)	7 µl (20-50 µg prot.)
Radioligando	20 µl	20 µl

- **Riñón:**

	NSB	UNIÓN TOTAL
Tampón	18 µl	23 µl
NAS (10 µM)	5 µl	-
Tejido	7 µl (50-150 µg prot.)	7 µl (50-150 µg prot.)
Radioligando	20 µl	20 µl

- Para cuantificar la unión inespecífica se utilizó la melatonina (1  $\mu\text{M}$ ) en el caso de la retina, techo óptico, iris y corazón, y la N-acetil serotonina (NAS, 10  $\mu\text{M}$ ) en el caso del riñón.
- El intervalo de concentraciones de radioligando (2-[ $^{125}\text{I}$ ]-Mel) utilizadas varía dependiendo del tejido en el que se realiza el ensayo:

Retina neural, techo óptico, iris y corazón	5-300 pM
Riñón	15 pM-1,5 nM

- El resto del ensayo se realiza como se indica en el procedimiento general del ensayo (apartado 2.3.1.1).

### 2.3.1.3. ENSAYOS CINÉTICOS.

Con objeto de determinar las cinéticas de asociación y disociación de la 2-I-Mel a su receptor, se realizan ensayos cinéticos en diferentes tejidos centrales y periféricos de la tenca.

Los ensayos se realizan a distintas temperaturas (4°C, 15°C, 25°C y 30°C), dependiendo del experimento y tejido utilizado, y en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ . El radioligando utilizado es la 2-[ $^{125}\text{I}$ ]-Mel a concentraciones de 150 ó 300 pM, dependiendo de si el ensayo se realiza en retina, techo óptico y corazón o si se lleva a cabo en el riñón, respectivamente. Una vez alcanzado el equilibrio en la cinética de asociación, se añade Mel (1  $\mu\text{M}$ ) o NAS (10  $\mu\text{M}$ ) a concentraciones capaces de desplazar el radioligando unido y de este modo poder caracterizar la disociación del radioligando de su receptor, valorándose a diferentes tiempos tras su adición. Los tiempos en los que se extraían las muestras son los siguientes:

TEJIDO	ASOCIACIÓN (minutos)	DISOCIACIÓN (minutos)
Retina (15°C)	20 - 480	30 - 1450
Retina (25°C)	10 - 240	15 - 540
Retina (30°C)	6 - 240	10 - 500
Techo óptico (15°C)	20 - 480	30 - 1620
Techo óptico (25°C)	10 - 240	15 - 540
Techo óptico (30°C)	6 - 240	10 - 500
Riñón (4°C)	2 - 600 (seg)	3 - 100 (seg)
Riñón (25°C)	10 - 240	15 - 2500

**2.3.1.4. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS.**

Con el fin de caracterizar los receptores de melatonina detectados en la tenca, se procede a la realización de ensayos farmacológicos tanto en tejidos centrales como periféricos.

Los ensayos se realizan a 4°C ó 25°C, según el tejido utilizado, en un volumen total de 50 µl. Se utiliza como radioligando la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a concentraciones de 150 pM en el caso de la retina, techo óptico y el corazón, y en el caso del riñón 300 pM. La unión inespecífica se valora mediante la adición de melatonina (1 µM) en los ensayos con retina, techo óptico y corazón, o NAS (10 µM), en el caso del riñón. Los fármacos empleados así como las concentraciones respectivas son las siguientes:

FÁRMACO	INTERVALO DE CONCENTRACIONES
NAS	30 nM - 30 µM
6-cloromelatonina	100 pM - 30 nM
2-fenilmelatonina	3 pM - 1 nM
2-iodomelatonina	3 pM - 30 µM
Lucindol	30 nM - 10 µM
Melatonina	300 pM - 100 µM
5-metoxicarbonilamino-N-acetilriptamina	300 pM - 30 µM
5-metoxi-N-ciclopropanoilriptamina	100 pM - 30 nM
4P-PDOT	10 nM - 10 µM
Guanosina-5'-O-(3-tiotrifosfato)	30 nM - 100 µM

Para cada concentración, se realiza la determinación por triplicado.

**2.3.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.**

Se utiliza el método descrito por Lowry y colaboradores (1951), que describimos brevemente a continuación.

**a) Reactivos.**

- Tartrato Na-K (2%): 2 g en 100 ml de H<sub>2</sub>O.
- CuSO<sub>4</sub> (1%): 1 g en 100 ml de H<sub>2</sub>O.
- Solución B: NaOH (1 g) + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 g) en 250 ml de H<sub>2</sub>O.
- Solución C: 1 ml CuSO<sub>4</sub> (1%) + 1 ml Tartrato (2%) en 100 ml de solución B.



**b) Procesado de las muestras.**

- **Retina, iris, epitelio pigmentado, telencéfalo, diencéfalo, techo óptico y rombencéfalo:**

- Sonicar el extracto de membranas obtenido según se describe en el apartado 2.2, en 100  $\mu$ l de tampón de ensayo.
- Pipetear 5  $\mu$ l del homogeneizado para el ensayo.

- **Tejidos periféricos:**

- Sonicar el extracto de membranas (apartado 2.2) en 200  $\mu$ l de tampón de ensayo.
- Pipetear 7  $\mu$ l del homogeneizado para el ensayo.

**c) Procedimiento.**

- Añadir 1,25 ml de la solución C al extracto de membranas obtenido según el procedimiento descrito en el apartado 2.2.
- Agitar e incubar 15 minutos a 30°C.
- Añadir 0,125 ml de reactivo Folin:H<sub>2</sub>O (1:1).
- Agitar e incubar 30 minutos a 30°C.
- Lectura de la absorbancia a 750 nm.
- Patrón de seroalbúmina bovina (BSA) en el intervalo 5-100  $\mu$ g.

**2.4. Diseños experimentales.****2.4.1 DISTRIBUCIÓN Y DENSIDADES RELATIVAS DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE 2-[<sup>125</sup>I]-MEL EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE *Tinca tinca*.**

Tencas adultas de aproximadamente 50 g de peso corporal, aclimatadas durante 30 días a condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura (11L:14D y 14°C) se sacrificaron en mitad de la fase luminosa del fotociclo diario.

Con el fin de conocer la distribución de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la tenca, así como para poder investigar qué tejidos ofrecen las condiciones más adecuadas para su estudio en profundidad, se procedió a hacer una valoración de la densidad de los sitios de unión en diferentes tejidos centrales y periféricos de esta especie. En la copa óptica se valoró la densidad de receptores en el iris, la retina neural y el epitelio pigmentado. Dentro del encéfalo, analizamos telencéfalo, diencéfalo, techo óptico y rombencéfalo. También se valoró la densidad de sitios de unión en tejidos periféricos como el corazón, riñón, branquias, hígado, músculo dorsal, tubo digestivo (anterior, medio y posterior), piel y gónadas.

El procedimiento seguido para la extracción de las muestras se ha detallado en los apartados 2.1.1; 2.1.2 y 2.1.3, y para la cuantificación de los sitios de unión de melatonina se siguió el procedimiento general (apartado 2.3.1.1).

#### **2.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE 2-[<sup>125</sup>I]-MEL EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE *Tinca tinca*.**

Para la caracterización de los sitios de unión de melatonina seleccionamos dos tejidos centrales y dos periféricos. Entre los tejidos centrales elegimos la retina neural y el techo óptico, mientras que entre los tejidos periféricos seleccionamos el corazón y el riñón.

A partir de homogeneizados de membranas (apartado 2.2) de cada uno de estos tejidos, realizamos ensayos de saturación (apartado 2.3.1.2), cinéticos (apartado 2.3.1.3) y farmacológicos (apartado 2.3.1.4).

#### **2.4.3. EFECTO DEL GTP $\gamma$ S Y EL SODIO SOBRE LA UNIÓN DE 2-[<sup>125</sup>I]-MELATONINA.**

Con el fin de conocer si los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la tenca se encuentran acoplados a proteínas G, se realizaron ensayos de inhibición con un análogo no hidrolizable del GTP, concretamente guanosin 5'-O-(3-tio trifosfato) (GTP $\gamma$ S), compuesto que impide que la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G retorne a su estado inactivo, con lo que los receptores acoplados a proteínas G permanecerán activados de forma permanente. Las curvas de inhibición con cantidades crecientes de GTP $\gamma$ S nos permitirán determinar si los receptores de melatonina en los distintos tejidos de la tenca pertenecen a esta familia de receptores acoplados a proteínas G.

Por otro lado, se ha descrito un efecto inhibitorio que tanto el GTP $\gamma$ S como el ión Na<sup>+</sup> ejercen de forma independiente sobre la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a su receptor. Con el objeto de averiguar si la inhibición de la unión es debida a cambios en la afinidad del receptor por el ligando o bien a alteraciones en la capacidad de unión, realizamos dos curvas de competición, una con GTP $\gamma$ S (100  $\mu$ M) y otra con Na<sup>+</sup> (500 mM) frente a la 2-I-Mel en el riñón, o bien con GTP $\gamma$ S (30  $\mu$ M) o Na<sup>+</sup> (250 mM) frente a la propia Mel en la retina neural y el corazón. Los ensayos se realizan en un volumen total de 50  $\mu$ l a 4°C en el riñón y a 25°C en la retina neural y el corazón. Las concentraciones de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel utilizadas fueron 300 pM en el riñón, y 150 pM en la retina neural y el corazón. Para valorar la unión inespecífica se utilizó NAS (10  $\mu$ M) en el riñón y melatonina (1  $\mu$ M) en la retina neural y el corazón.

#### **2.4.4 RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE LA TENCA.**

Por convenio, en el análisis de los ritmos biológicos se utiliza una nomenclatura temporal específica, indicando en primer lugar el número de horas de exposición a la luz seguido de la letra L (*light*), y separado con dos puntos (:) el número de horas de oscuridad seguido de la letra D (*dark*) (ej: 12L:12D). El tiempo subjetivo correspondiente al comienzo de la luz se considera como tiempo circadiano 0, CT (*circadian time*) = 0, de modo que en un fotoperíodo 12L:12D, el tiempo subjetivo correspondiente al comienzo de la oscuridad sería CT = 12. En muchos casos el tiempo circadiano depende de un ajuste previo a un *Zeitgeber*, el momento de la última transición de la oscuridad a luz está definido como tiempo *Zeitgeber* 0 (ZT = 0).

Setenta y dos ejemplares adultos ( $15,5 \pm 0,5$  cm de longitud y  $90,5 \pm 0,5$  g de peso corporal) de tenca fueron sacrificados cada tres horas ( $n = 8$ / grupo) a lo largo de un ciclo completo de 24 horas en cada una de las estaciones del año (primavera 8-5-03; verano 19-8-02; otoño 7-11-02; e invierno 5-2-03). Se extrajo el techo óptico como prototipo de tejido encefálico, así como la retina neural, el iris y el epitelio pigmentado, y de los tejidos periféricos, el estudio se realizó en el corazón y el riñón. Durante la fase luminosa del fotociclo diario las muestras fueron obtenidas bajo iluminación natural, mientras que durante la escotofase, se procedió a la extracción de tejidos utilizando luz roja de baja intensidad. Todos los tejidos extraídos fueron inmediatamente congelados en tubos eppendorf de 1,5 ml, y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la posterior valoración de los sitios de unión de melatonina.

Con el fin de poder determinar la posible existencia de ritmos diarios, así como posibles diferencias en dicha ritmicidad debidas al sexo, se midió la densidad de receptores en cada uno de los tejidos de forma individual.

Así mismo, con el fin de valorar diferencias debidas al sexo en las oscilaciones día/noche de la afinidad ( $K_d$ ) y la capacidad de unión ( $B_{max}$ ), se realizaron homogeneizados de membranas de machos y hembras por separado, obtenidas en mitad de la fase diurna (14:00 h) y en mitad de la fase nocturna (2:00 h) del fotociclo diario en cada una de las estaciones del año. En todos los homogeneizados se realizaron ensayos de saturación.

#### **2.4.5 RITMICIDAD ENDÓGENA EN LA DENSIDAD DE SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN DISTINTAS REGIONES ENCEFÁLICAS DE *Tinca tinca*.**

Con el fin de determinar si los cambios día/noche que se producen en la densidad de receptores de melatonina están controlados por un oscilador endógeno, tencas ( $n = 56$ )

de  $13,2 \pm 0,2$  g de peso corporal fueron aclimatadas en el laboratorio en acuarios de 70 litros, dotados de sistemas de aireación y filtración continua del agua. El fotoperíodo durante el período de aclimatación fue 12L:12D (3:00 inicio de la luz: 15:00 inicio de la oscuridad) y la temperatura del agua fue de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . En estas condiciones se mantuvieron a los animales durante 15 días antes del comienzo del experimento. Tras el período de aclimatación, los peces fueron sometidos a oscuridad constante (condiciones de curso libre), y se sacrificaron a diferentes tiempos a partir del comienzo del experimento (16:30; 19:30; 28:30; 31:30; 40:30; 43:30 y 52:30 horas;  $n=7/\text{grupo}$ ), extrayéndose las copas ópticas, el telencéfalo, el diencéfalo, el techo óptico y el rombencéfalo para la cuantificación de sitios de unión de melatonina. Un grupo de tencas ( $n=7$ ) fue sacrificado a las 7:30 horas ZT en luz como control de referencia de valores en luz. En las distintas regiones encefálicas y la retina se midió de forma individual la densidad de sitios de unión.

#### **2.4.6 EFECTO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ SOBRE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LA RETINA NEURAL Y EL TECHO ÓPTICO DE *Tinca tinca*.**

Esta parte del estudio se realizó gracias a la colaboración del equipo dirigido por el Dr. F.J. Sánchez Vázquez de la Universidad de Murcia, en las instalaciones generosamente ofrecidas por el Centro Nacional de Cípricultura, Vegas del Guadiana (Badajoz).

##### **2.4.6.1. Efecto de diferentes intensidades lumínicas durante la fase luminosa del fotociclo diario sobre la Kd y la Bmax.**

Ejemplares adultos ( $n = 96$ ) de tenca de  $950 \pm 100$  g de peso corporal y  $20,5 \pm 2,5$  cm de longitud fueron divididos en dos grupos de 48 individuos y aclimatados de forma separada a fotoperíodos 12L:12D (8:00 h luz: 20:00 h oscuridad) con dos intensidades de luz diferentes en cada grupo (20 y 1300 lux respectivamente) durante la fase luminosa del fotociclo diario. La aclimatación se llevó a cabo en tanques de 1000 litros de agua, dotados con sistemas de renovación continua, durante 15 días antes del comienzo del experimento. La temperatura del agua fue de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Tras el período de aclimatación, los peces fueron sacrificados cada tres horas a lo largo de un ciclo diario completo, extrayéndose las copas ópticas y techo óptico para la cuantificación de sitios de unión de melatonina. En ambos tejidos se realizaron únicamente las curvas de saturación tanto a mitad del día (14:00 h) como a mitad de la noche (2:00 h), a fin de conocer si existen cambios en la densidad o en la afinidad de los receptores debidos a las diferentes intensidades de luz a las que fueron expuestos los animales durante la fase luminosa del fotociclo diario.

#### **2.4.6.2. Efecto de un pulso de luz de diferentes intensidades en mitad de la escotofase sobre la Kd y la Bmax.**

Treinta y dos tencas de  $950 \pm 100$  g de peso corporal y  $20,5 \pm 2,5$  cm de longitud fueron divididos en cuatro grupos ( $n=8$  individuos/grupo) y aclimatadas de forma separada a fotoperíodos 12L:12D (8:00 h luz: 20:00 h oscuridad) con una intensidad de luz de 1300 lux durante la fase luminosa del fotociclo diario. El mantenimiento de los animales se realizó en las mismas condiciones que en el apartado 2.4.6.1. Tras 2 semanas de aclimatación, cada grupo de peces fue sometido en mitad de la noche a un pulso de luz de una hora de duración y de diferente intensidad (0,3; 1; 3 y 1300 lux en cada uno de los grupos) y fueron inmediatamente sacrificados obteniéndose muestras de retina y techo óptico para la valoración de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. En ambos tejidos se realizaron las correspondientes curvas de saturación.

#### **2.4.7. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA UNIÓN DE LA MELATONINA A SU RECEPTOR.**

##### **2.4.7.1. Ensayos de saturación.**

Con objeto de conocer si la temperatura es capaz por sí misma de provocar cambios en la afinidad (Kd) así como en la densidad (Bmax) de los receptores de melatonina en la tenca, se realizaron las curvas de saturación a diferentes temperaturas (15°C, 25°C y 30°C) en retina neural y techo óptico. Las condiciones de los ensayos son las descritas en el apartado 2.3.1.2.

##### **2.4.7.2. Ensayos cinéticos.**

Los ensayos se realizaron a 4°C, 15°C, 25°C y 30°C en un volumen total de 50 µl. El radioligando utilizado fue la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a concentraciones de 150 pM para los ensayos con retina y techo óptico, y 300 pM para los ensayos realizados con riñón. Para cuantificar la unión inespecífica utilizamos melatonina (1 µM) para la retina y el techo óptico, y NAS (10 µM) para los ensayos en el riñón. Los intervalos de tiempo empleados fueron los mismos que en el apartado 2.3.1.3.

El cálculo del coeficiente de temperatura,  $Q_{10}$ , es el método utilizado con más frecuencia para cuantificar el efecto de la temperatura sobre cualquier proceso biológico (Rome *et al.*, 1992). Se define como la razón obtenida de un parámetro cuando éste se determina a dos temperaturas que difieren en 10°C. Los coeficientes  $Q_{10}$  pueden ser calculados aunque no exista una diferencia exacta de 10°C entre las dos temperaturas, aplicando la corrección de van't Hoff (Hill y Wyse, 1992):

$$Q_{10} = \left( \frac{K_2}{K_1} \right)^{\frac{10}{(T_2 - T_1)}} \quad T_2 > T_1$$

K = parámetro biológico

El coeficiente de temperatura refleja la sensibilidad térmica del parámetro K. Cuando  $Q_{10} = 1$ , el parámetro es independiente de la temperatura. En cambio cuando  $Q_{10} > 1$ , el parámetro aumenta con la temperatura, mientras que cuando el valor de  $Q_{10}$  es inferior a 1, el parámetro disminuye con la temperatura. Si se mantiene constante en un intervalo amplio de temperaturas significa que el parámetro estudiado varía exponencialmente con la temperatura, es decir, incrementos aditivos de la temperatura provocan aumentos multiplicativos del parámetro (Hill y Wyse, 1992).

## 2.5. Análisis estadístico de los resultados.

### 2.5.1. ANÁLISIS DE SCATCHARD.

Para determinar la existencia de un único o de múltiples sitios de unión en membranas procedentes de un mismo tejido, utilizamos representaciones de Scatchard, cuya base teórica ya se ha justificado en el apartado 2.3.1. Para la realización de la representación de Scatchard se realiza un análisis de regresión lineal, que indica si una variable,  $y$ , definida por la función  $y = a + bx$ , depende de una variable independiente,  $x$ , lo que viene dado por el *coeficiente de correlación*,  $r$  (Sokal y Rohlf, 1979).

### 2.5.2. ANÁLISIS DE LA Kd, Bmax, IC<sub>50</sub> Y Ki.

La constante de disociación en el equilibrio (Kd) y la densidad de sitios de unión (Bmax) obtenidas en los estudios de saturación, así como los valores de IC<sub>50</sub> para los diferentes ligandos en los ensayos de competición fueron calculados mediante una regresión no lineal de un modelo logístico de 4 parámetros, gracias a la utilización del programa estadístico ALLFIT (De Lean *et al.*, 1978). El error estándar de las constantes (e.e.) se calcula a partir de los residuos obtenidos del ajuste de mínimos cuadrados.

La constante de inhibición (Ki) se calculó a partir de los valores de IC<sub>50</sub> mediante la ecuación de Cheng y Prusoff (1973). Las diferencias estadísticamente significativas en los valores de Kd, Bmax e IC<sub>50</sub> se determinaron gracias al principio de la suma extra de cuadrados (Draper y Smith, 1966) evaluada mediante el test de la  $F$  de Fisher-Snedecor.

Teniendo en cuenta que este test estadístico es muy proclive a cometer errores de tipo I, se decidió utilizar como grado de significación  $p < 0,01$ , con el fin de disminuir dicho error.

### 2.5.3. ANÁLISIS DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS.

Las tasas de asociación ( $K_{+1}$ ) y disociación ( $K_{-1}$ ) fueron calculadas mediante una regresión no lineal (Duggleby, 1981), asumiendo un aumento exponencial hasta un máximo de pseudo primer orden para la  $K_{+1}$ , así como una caída exponencial de primer orden para la  $K_{-1}$ . La  $K_d$  obtenida a partir de los estudios cinéticos se calculó como el cociente entre ambas constantes ( $K_d = K_{-1}/ K_{+1}$ ).

### 2.5.4. ANÁLISIS SINUSOIDAL.

El ritmo diario en la distribución de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en cada uno de los tejidos estudiados se ajustó a una función cíclica de tipo sinusoidal. Se utilizó el método de Duggleby (1981) para ajustar los datos experimentales al modelo:

$$y = A_0 + A_1 \cos (t \pi/12 - \varphi)$$

donde los parámetros estimados son:

- $A_0$ : Nivel medio o méSOR. Indica la media de los datos ajustados al ritmo sinusoidal.
- $A_1$ : Amplitud sinusoidal. Indica la oscilación de la función sinusoidal a partir del valor  $A_0$ .
- $\varphi$ : Fase. Indica el desplazamiento de la curva sinusoidal respecto al origen. Su valor coincide con el momento del máximo.
- $t$ : Tiempo. Se representa en horas. Debe ser transformado a radianes (multiplicar por  $\pi/12$ ) para introducirlo en el modelo. El periodo de la curva sinusoidal, en nuestro caso, toma el valor de 24 h ( $24 \text{ h} = 2 \pi$  radianes).

Para determinar si el ritmo es significativo se utilizó el cociente ruido/señal como estadístico. Cuando este parámetro fue menor de 0,3 se consideró que la existencia del ritmo es significativa (Halberg y Reinberg, 1976). El coeficiente ruido/señal se calculó como:

$$\frac{\text{Ruido}}{\text{Señal}} = \frac{\text{Error estandar de } A_1}{A_1}$$

### 2.5.5 ANÁLISIS DE LA VARIANZA Y TEST DE STUDENT-NEWMAN-KEULS DE COMPARACIONES MÚLTIPLES.

Para la comparación de varias medias muestrales cuyo criterio de clasificación de las mismas fue único, es decir, cuando existía un único factor o fuente de variación, se utilizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y, en el caso de que éste fuera significativo, se aplicó a continuación el test de Student-Newman-Keuls (S.N.K.) de comparaciones múltiples para determinar los pares de muestras que presentaban diferencias significativas. Los grados de significación considerados para este análisis fueron los siguientes:

N.S.  $p > 0,05$  (no significativo)

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$



## **IV. RESULTADOS**

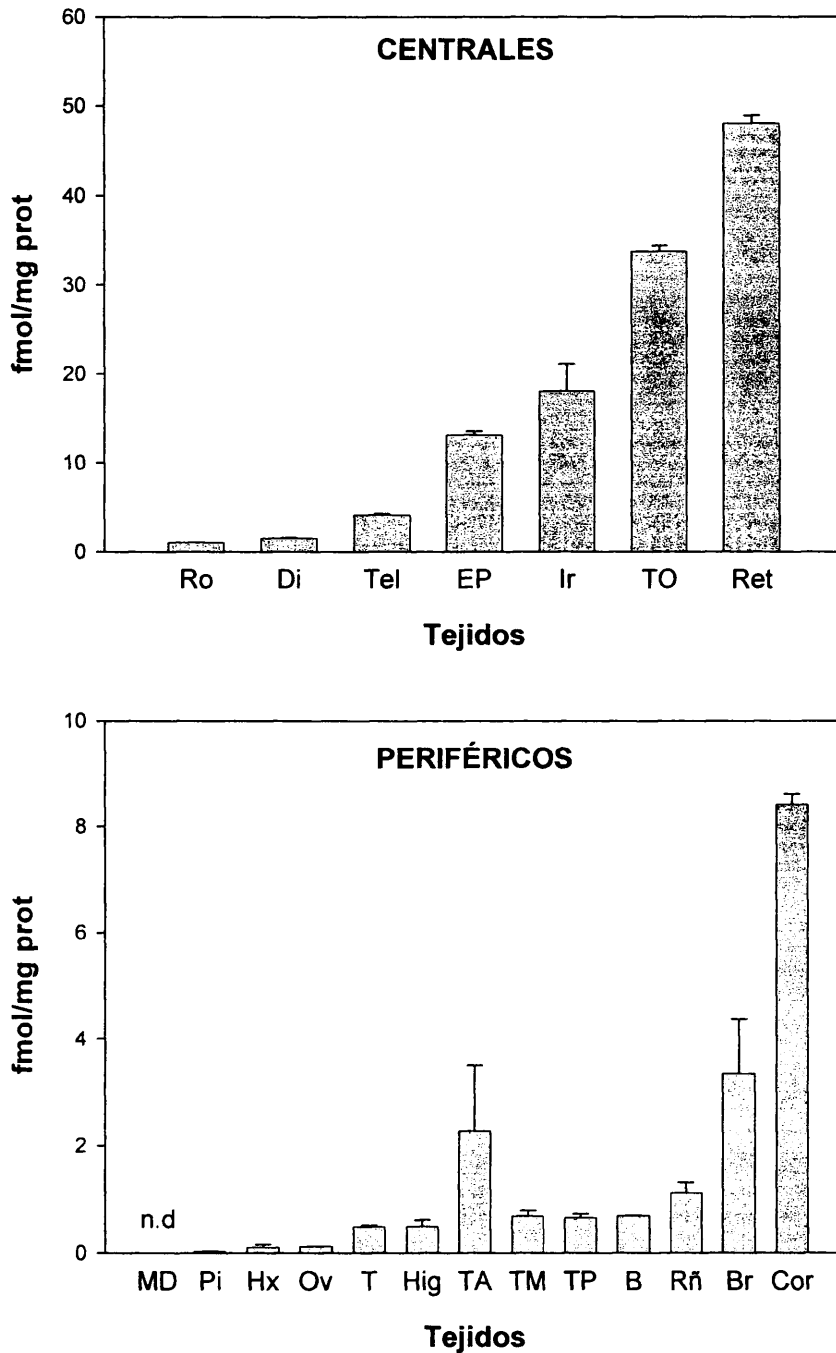
## **1. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS SITIOS DE UNIÓN:**

En la Figura 1 mostramos las densidades de sitios de unión para 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en distintos tejidos centrales (Fig 1a) y periféricos (Fig 1b) de la tenca. En el ojo, la retina neural, el iris y el epitelio pigmentado muestran una alta densidad, si bien en el caso del iris y el epitelio pigmentado, debido a su pequeño tamaño, se requiere una gran cantidad de animales para tener suficiente cantidad de tejido y poder realizar una caracterización completa. Esto no ocurre en el caso de la retina neural, que tiene un tamaño mucho mayor. Esta razón, entre otras, determina que la mayoría de estudios posteriores de esta Memoria se realizan en la retina neural. El rombencéfalo es la región encefálica con menor densidad de sitios de unión, y el techo óptico la que presenta mayor densidad de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel respecto al resto de tejidos encefálicos estudiados. En las condiciones de ensayo empleadas, no se detecta la presencia de sitios de unión en el músculo dorsal, mientras que el ovario y la piel muestran densidades mínimas de sitios de unión. Las branquias, el corazón, el riñón y el intestino anterior, son los tejidos periféricos que presentan una mayor densidad de sitios de unión para el radioligando. Por ello elegimos el riñón y el corazón como prototipo de tejidos periféricos para estudios ulteriores. Sin embargo, la elevada densidad y la baja unión inespecífica encontrada en tejidos oculares y encefálicos nos llevó a caracterizar los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la retina neural y el techo óptico principalmente, que además representan la vía de entrada de la señal fotosensorial y el lugar de integración de la misma, respectivamente. No obstante, en algunos casos concretos, se emplearon otros tejidos encefálicos adicionalmente.

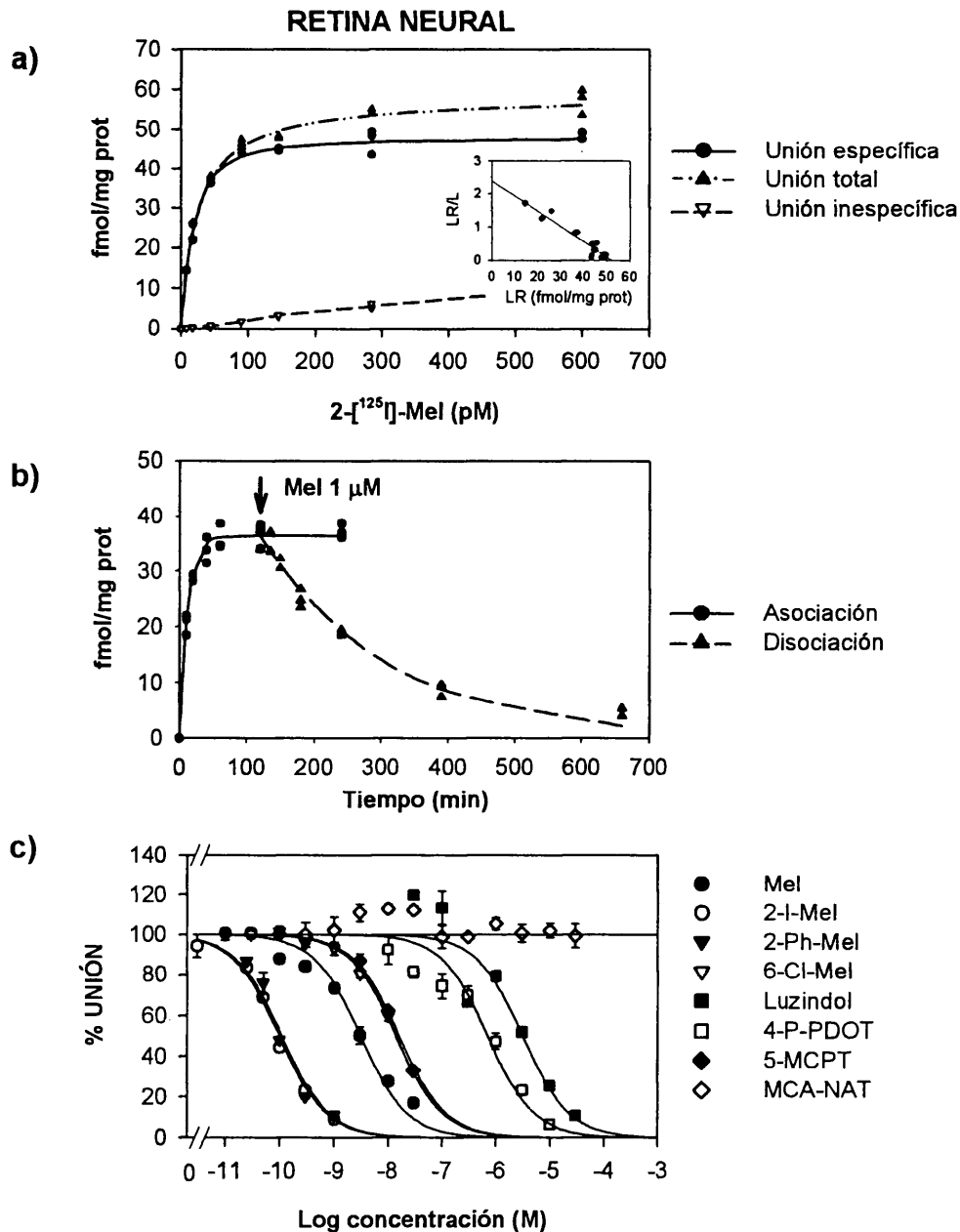
## **2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE *Tinca tinca*.**

### **2.1. Retina neural:**

La unión inespecífica (NSB) de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a una suspensión de membranas de retina neural del teleósteo *Tinca tinca* aumenta de forma lineal con las concentraciones de radioligando utilizadas. La unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel se satura a una concentración de 150 pM. (Figura 2a). La constante de afinidad tiene un valor  $K_d = 17,47 \pm 1,22$  pM, mientras que la densidad máxima de receptores observada es:  $B_{max} = 48,07 \pm 0,89$  fmol/mg prot (Fig. 2a). La linealidad de la representación de Scatchard (gráfica insertada en la Figura 2a) revela la existencia de una única clase de sitios de unión.



**Figura 1.** Densidad de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en diferentes tejidos centrales y periféricos en el teleosteo *T. tinca*. Los datos se representan como la estimación  $\pm$  e.e.m. de valores triplicados. MD: músculo dorsal; Pi: piel; Hx: hipófisis; Ov: ovario; T: testículo; Hig: hígado; TA, TM, TP: tubo digestivo anterior, medio y posterior respectivamente; B: bazo; Rñ: riñón; Br: branquias; Cor: corazón; Ro: rombencéfalo; Di: diencéfalo; Tel: telencéfalo; EP: epitelio pigmentado; Ir: iris; TO: techo óptico; Ret: retina neural. n.d: no detectable.



**Figura 2.** Caracterización de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina en una preparación de membranas celulares procedentes de la retina neural de *T. tinca*. La unión inespecífica se cuantificó por adición de 1  $\mu$ M de melatonina no marcada. **a)** Curva de saturación de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. Dentro de la gráfica aparece la representación de Scatchard de los datos. LR se refiere a la unión específica para cada concentración; LR/L es el cociente entre la unión específica y la concentración de radioligando utilizada. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando. **b)** Cinética de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. La disociación se inicia con la adición de melatonina 1  $\mu$ M. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando. **c)** Desplazamiento de la unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por distintos ligandos. Los datos están expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de la unión específica en ausencia de agonistas o antagonistas.

La cinética de asociación de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a la retina neural de la tenca alcanza el equilibrio tras 60 minutos de incubación a 25°C (Figura 2b). La tasa de asociación es  $K_{+1} = (0,718 \pm 0,045) \times 10^{-3} \text{ pM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . La disociación completa se produce a las 9 horas de la adición de melatonina 1  $\mu\text{M}$ . La tasa de disociación es  $K_{-1} = (5,261 \pm 0,328) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . La constante cinética de disociación calculada a partir del cociente  $K_{-1}/K_{+1}$  es  $K_{d_{\text{cinética}}} = 7,32 \text{ pM}$  (Tabla 1), valor próximo al observado en el estudio de saturación.

Como podemos apreciar en la Figura 2c el desplazamiento de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por diferentes análogos de la melatonina en la retina de la tenca es dependiente de la concentración de fármaco utilizado. Atendiendo a los valores de  $K_i$  observados, los ligandos pueden clasificarse en tres grupos: elevada afinidad (2-I-Mel y 2-Ph-Mel, con valores de  $K_i = 118,40$  y  $132,00 \text{ pM}$ , respectivamente); afinidad intermedia (Mel, 6-Cl-Mel y 5-MCPT, con  $K_i = 3,69$ ;  $16,70$  y  $19,34 \text{ nM}$ ), y de baja afinidad (4-P-PDOT y Luzindol, cuya  $K_i$  fue  $0,96$  y  $1,54 \mu\text{M}$ ). Uno de los fármacos utilizados, el 5-MCA-NAT es incapaz de desplazar a la 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina en el ensayo de competición, a ninguna de las concentraciones empleadas. El orden de potencia de la inhibición de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por los fármacos empleados en este estudio se corresponde con una farmacología típica de receptores del tipo Mel-1 y es el siguiente:

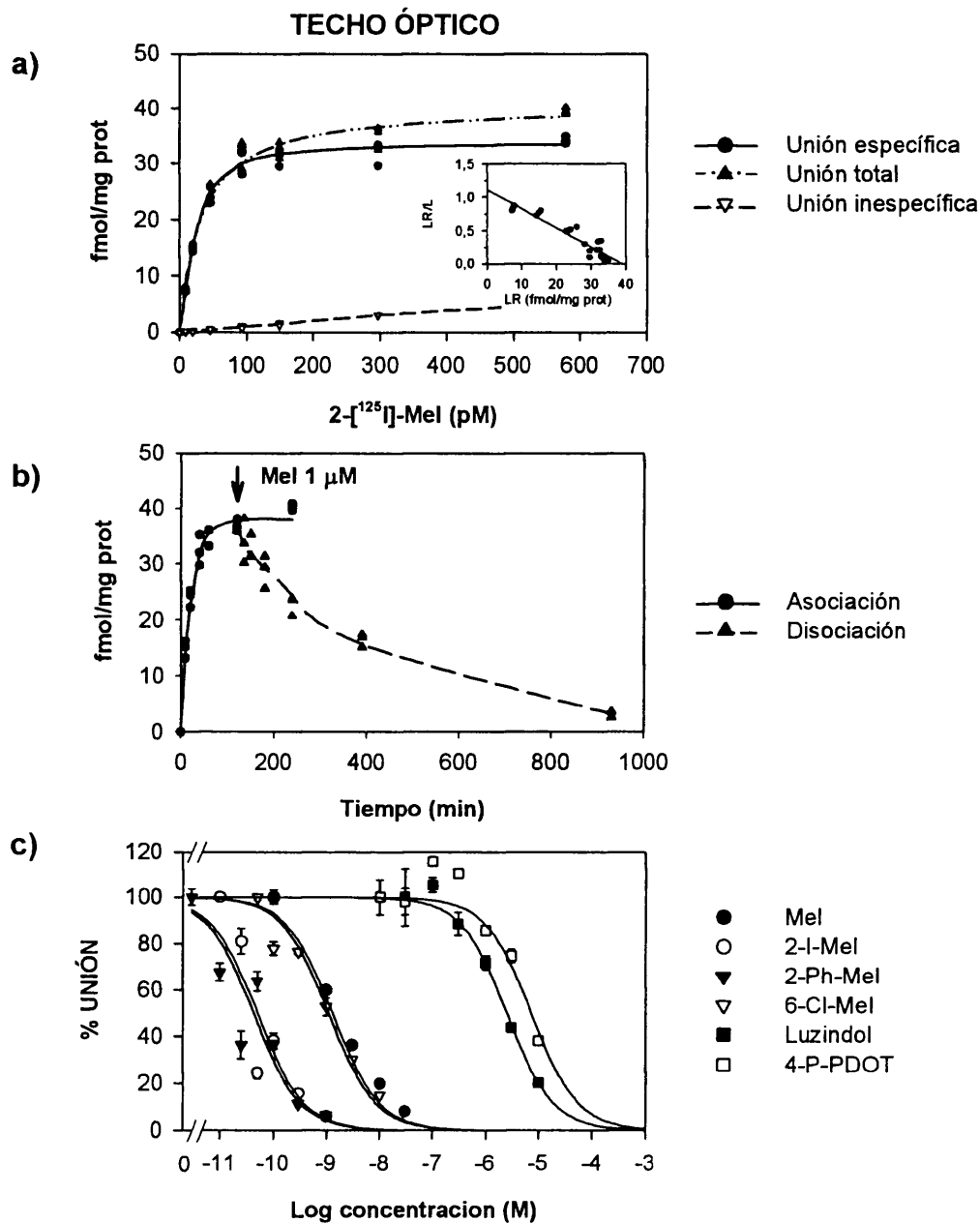
$$2\text{-I-Mel} = 2\text{-Ph-Mel} \gg \text{Mel} > 6\text{-Cl-Mel} = 5\text{-MCPT} \gg 4\text{-P-PDOT} = \text{Luzindol}.$$

## 2.2. Techo óptico:

Como se puede observar en la Figura 3, la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el techo óptico de la tenca muestra una alta afinidad. Al igual que ocurre en la retina neural, la unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel se satura a una concentración de  $150 \text{ pM}$  (Figura 3a). Además, la representación de Scatchard indica la existencia de una única clase de sitios de unión. Los valores de la constante de disociación y densidad de receptores son:  $K_d = 22,31 \pm 1,64 \text{ pM}$  y  $B_{\text{max}} = 33,761 \pm 0,690 \text{ fmol/mg prot}$  (Fig. 3a).

Las cinéticas de asociación de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel al techo óptico de la tenca se han determinado a los mismos intervalos de tiempo que en la retina neural, alcanzándose el equilibrio tras 60 minutos de incubación a 25°C (Figura 3b). La tasa de asociación calculada es  $K_{+1} = (0,363 \pm 0,022) \times 10^{-3} \text{ pM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . La disociación completa se consigue a las 14 horas después de la adición de melatonina 1  $\mu\text{M}$ . El valor de la tasa de disociación obtenida es  $K_{-1} = (2,95 \pm 0,25) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . La constante cinética de disociación, obtenida a partir del cociente entre ambas constantes, es  $K_{d_{\text{cinética}}} = 8,15 \text{ pM}$  (Tabla 1).

El desplazamiento de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por los análogos de la melatonina en el techo óptico de la tenca depende de la concentración empleada de cada uno de ellos (Figura 3c). Atendiendo a los valores de  $K_i$  observados, los ligandos pueden clasificarse en tres grupos:



**Figura 3.** Caracterización de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en una preparación de membranas celulares procedentes del techo óptico de la tenca. La unión inespecífica se cuantifica por adición de 1 μM de melatonina no marcada. **a)** Curva de saturación de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. Dentro de la gráfica aparece la representación de Scatchard de los datos. LR: unión específica para cada concentración; LR/L: cociente entre la unión específica y la concentración de radioligando utilizada. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando. **b)** Cinética de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. La disociación se inicia con la adición de melatonina 1 μM. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando. **c)** Desplazamiento de la unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por distintos ligandos. Los datos están expresados como la media ± e.e.m. de la unión específica en ausencia de agonistas o antagonistas.

elevada afinidad (2-I-Mel y 2-Ph-Mel, con valores de 52,52 y 86,98 pM, respectivamente); afinidad intermedia (6-Cl-Mel y Mel, con  $K_i = 1,27$  y  $1,54$  nM, de forma respectiva), y baja afinidad (Luzindol y 4-P-PDOT, cuyas  $K_i$  fueron 2,61 y 8,31  $\mu$ M, respectivamente). El orden de potencias de inhibición de 2-[ $^{125}$ I]-Mel por los análogos de la melatonina en este tejido es el siguiente:

$$2\text{-I-Mel} = 2\text{-Ph-Mel} \gg 6\text{-Cl-Mel} = \text{Mel} \gg \text{Luzindol} > 4\text{-P-PDOT}.$$

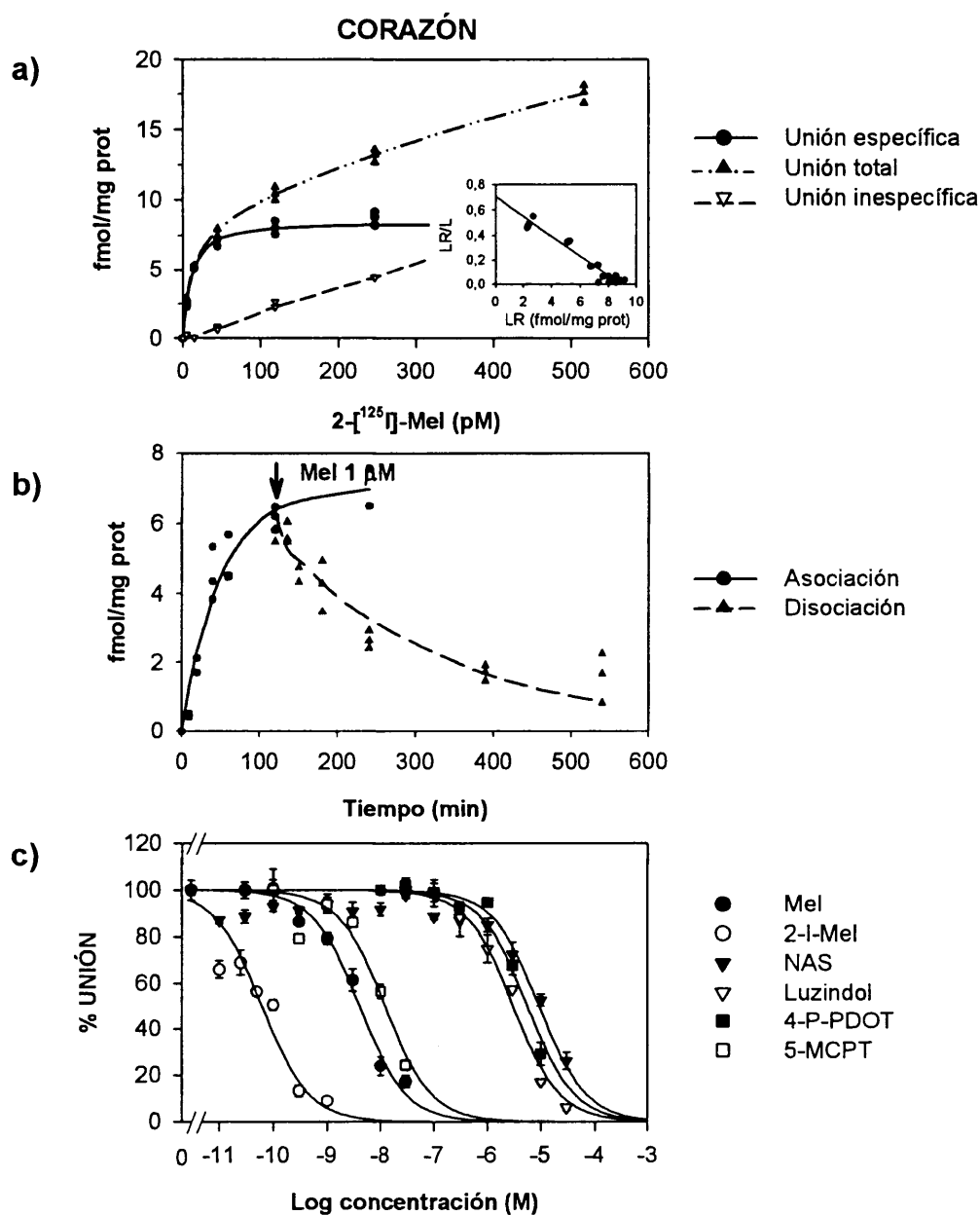
Este orden resulta ligeramente diferente del observado en la retina neural ya que en el techo óptico los órdenes de potencia de luzindol y 4-P-PDOT están invertidos respecto a lo encontrado en la retina neural. Algo similar ocurre también en el caso de la 6-Cl-Mel y la Mel, si bien en este caso los valores de  $K_i$  son muy similares. No obstante, pese a estas pequeñas diferencias, la farmacología observada en este tejido, al igual que en el caso de la retina neural, es característica de la familia de receptores del tipo Mel-1.

### 2.3. Corazón:

La unión de 2-[ $^{125}$ I]-Mel a membranas obtenidas a partir de homogeneizados de corazón de *Tinca tinca* (Figura 4a), muestra una constante de afinidad en el intervalo picomolar, siendo muy similar a lo observado en la retina neural y el techo óptico de esta especie. En cambio la densidad de receptores es mucho menor cuando se compara con los tejidos anteriores. Al igual que ocurre en la retina neural y el techo óptico, la unión específica de 2-[ $^{125}$ I]-Mel también se satura a una concentración de 150 pM. (Figura 4a). La representación de Scatchard incluida en esta figura demuestra la presencia de un único tipo de sitios de unión en los extractos de membranas plasmáticas procedentes del corazón de la tenca. Los valores de la constante de disociación así como de la densidad de receptores son:  $K_d = 10,26 \pm 1,09$  pM y  $B_{max} = 8,41 \pm 0,20$  fmol/mg prot, respectivamente (Fig. 4a).

Debido a la menor densidad de receptores en el corazón, la unión inespecífica representa una mayor proporción de la unión total, esto es especialmente notable a altas concentraciones del radioligando, donde llega a ser el 50%.

La cinética de la asociación de 2-[ $^{125}$ I]-Mel a las membranas del corazón de la tenca se determina a los mismos intervalos de tiempo que en el caso de la retina neural y el techo óptico y, a diferencia de lo que ocurre en dichos tejidos, el equilibrio en la asociación se alcanza más tarde, tras 120 minutos de incubación a 25°C (Figura 4b). El valor de la tasa de asociación es pues menor,  $K_{+1} = (0,126 \pm 0,019) \times 10^{-3}$  pM $^{-1}$  min $^{-1}$ . Siete horas después de la adición de melatonina 1  $\mu$ M se consigue la disociación completa. El valor obtenido de la tasa de disociación es  $K_{-1} = (4,561 \pm 0,556) \times 10^{-3}$  min $^{-1}$ . La constante cinética de disociación es  $K_{d_{cinética}} = 36,3$  pM, valor ligeramente superior al encontrado en la retina

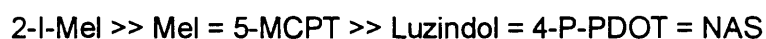


**Figura 4.** Caracterización de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en una preparación de membranas celulares procedentes del corazón de *T. tinca*. La unión inespecífica se valoró mediante adición de 1  $\mu$ M de melatonina no marcada. **a)** Curva de saturación de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. Insertada en la gráfica aparece la representación de Scatchard de los datos, mostrando la existencia de un único subtipo de sitios de unión. LR: unión específica para cada concentración; LR/L: cociente entre la unión específica y la concentración de radioligando utilizada. Cada punto representa valores individuales. **b)** Cinética de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. La disociación se inicia con la adición de melatonina 1  $\mu$ M. Cada punto representa valores individuales. **c)** Desplazamiento de la unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por distintos ligandos. Los datos están expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de la unión específica en ausencia de agonistas o antagonistas.



neural y el techo óptico (Tabla 1) y también mayor que el estimado a partir de la curva de saturación del propio tejido.

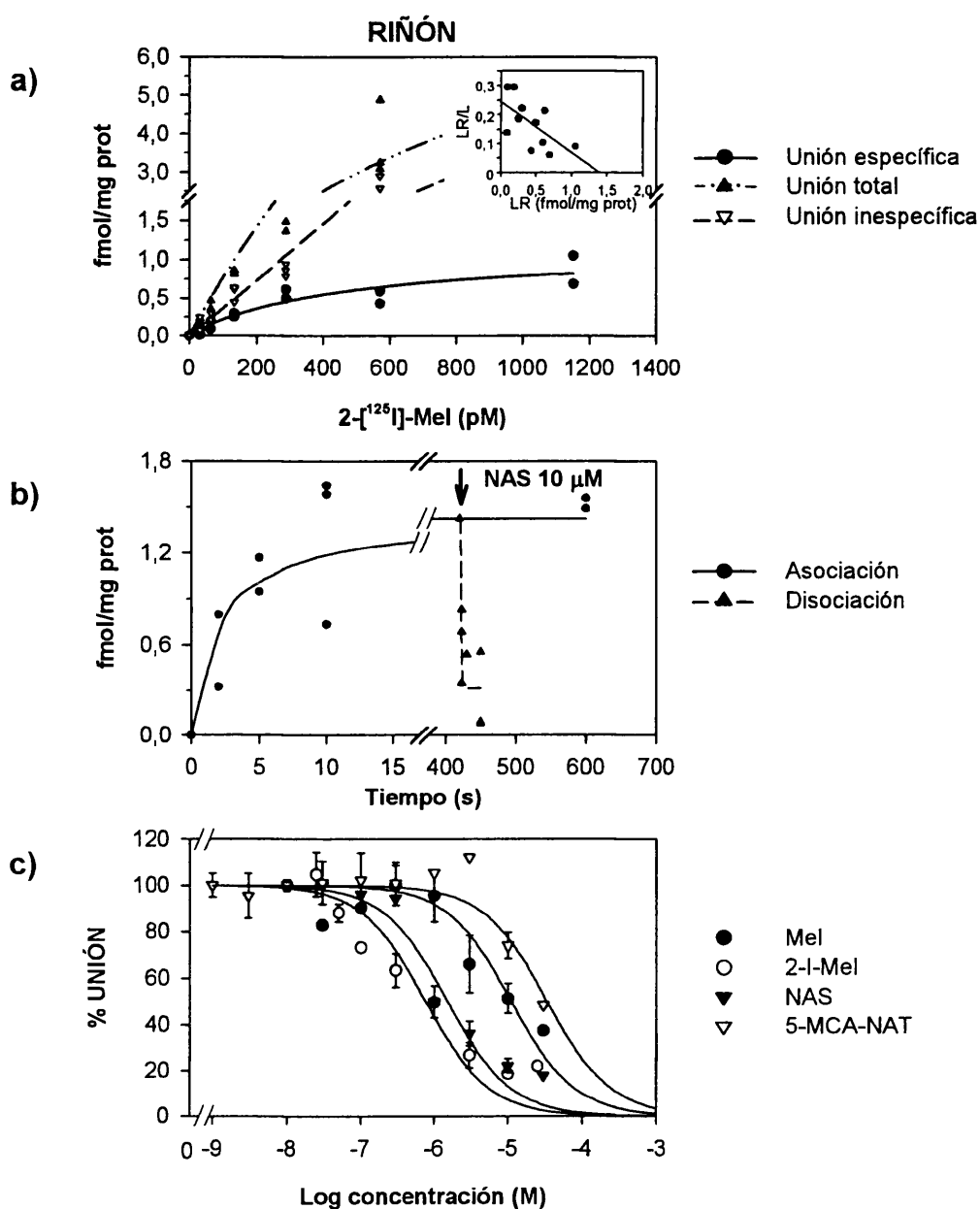
El desplazamiento de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por diferentes análogos en el corazón de la tenca, al igual que en los otros tejidos estudiados, también es dependiente de la concentración utilizada de cada fármaco (Figura 4c). Atendiendo a los valores de  $K_i$  medidos, podemos clasificar a los fármacos en tres grupos: elevada afinidad (2-I-Mel cuya  $K_i = 52,93$  pM); afinidad intermedia (Melatonina y 5-MCPT, con  $K_i = 2,34$  y  $8,96$  nM, respectivamente), y de baja afinidad (Luzindol, 4-P-PDOT y NAS, cuyas  $K_i$  son  $2,31$ ;  $4,29$  y  $7,08$   $\mu$ M, respectivamente). El orden de potencias de inhibición de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por los fármacos empleados en este estudio es similar al observado en las farmacologías descritas en la retina neural y el techo óptico de la tenca y que es típica de receptores del tipo Mel-1:



#### 2.4. Riñón:

En ensayos previos llevados a cabo con membranas de riñón a la temperatura estándar (25°C), encontramos que la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel no es saturable, sino que crece indefinidamente con la concentración del ligando. Reduciendo la temperatura del ensayo, conseguimos una unión saturable. Por esta razón todos los ensayos encaminados a la caracterización de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en los extractos de membrana plasmática procedentes del riñón de la tenca se han realizado a 4°C, temperatura a la que sí se produce la saturación, condición previa para lograr una caracterización completa de estos sitios de unión. Además, para valorar la unión inespecífica se ha empleado NAS (10  $\mu$ M) en lugar de Mel, ya que en ensayos previos observamos que con este fármaco se consigue disminuir significativamente la unión inespecífica respecto a la obtenida utilizando Mel (1  $\mu$ M).

En estas condiciones la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a un extracto de membranas procedente del riñón de la tenca (Figura 5), a 4°C muestra una constante de afinidad del orden picomolar alto ( $K_d = 423,93 \pm 173,51$  pM. Fig. 5a), a diferencia de lo que ocurre en la retina neural, techo óptico y corazón, en los que se obtienen valores de dicha constante entre 10 y 20 pM. La densidad de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel es bastante inferior a la observada en el resto de tejidos estudiados ( $B_{max} = 1,12 \pm 0,20$  fmol/mg prot. Fig. 5a). Además, el intervalo de concentraciones de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel empleado para este ensayo ha sido diferente del utilizado en los anteriores tejidos, siendo saturante una concentración de radioligando de 1,2 nM. Además hay que reseñar que la unión inespecífica es muy superior a la que se aprecia en la retina neural, techo óptico y corazón de la tenca (Figura 5a).



**Figura 5.** Caracterización de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en una preparación de membranas celulares del riñón del teleosteo *Tinca tinca*. La unión inespecífica se valoró mediante adición de 10 μM de NAS no marcada. **a)** Curva de saturación de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. Insertada en la gráfica, la representación de Scatchard de los datos muestra un único tipo de sitios de unión. LR: unión específica para cada concentración; LR/L: cociente entre la unión específica y la concentración de radioligando utilizada. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando. **b)** Cinética de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. La disociación se inicia con la adición de NAS 10 μM. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando. **c)** Desplazamiento de la unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por distintos ligandos. Los datos están expresados como la media ± e.e.m. de la unión específica en ausencia de agonistas o antagonistas.

Mediante la representación de Scatchard insertada en la figura se puede deducir la existencia de un único tipo de sitio de unión en el riñón de la tenca.

La cinética de la asociación de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel al extracto de membranas del riñón de la tenca ha sido determinada a diferentes tiempos que en el resto de los tejidos estudiados, y a distinta temperatura (4°C). De forma muy diferente a lo encontrado en la retina neural, en techo óptico y corazón, la cinética de la asociación es extremadamente rápida, alcanzándose el equilibrio a los 10 segundos del inicio del ensayo (Figura 5b). El valor de la tasa de asociación es:  $K_{+1} = (43,02 \pm 13,32) \times 10^{-3} \text{ pM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , entre 60 y 340 veces mayor que la tasa estimada para los otros tejidos. La disociación completa también es muy rápida, finalizando tan sólo a los 100 segundos de la adición de NAS 10 µM. La tasa de disociación calculada en este tejido es:  $K_{-1} = (4027,86 \pm 1560,96) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , es decir, unas 1000 veces más rápida comparado con los tejidos neurales y el corazón. El cociente entre ambas tasas nos da un valor de la constante cinética de disociación:  $K_{d_{\text{cinética}}} = 93,6 \text{ pM}$  (Tabla 1).

Al igual que mostramos para los otros tejidos estudiados, en el riñón de *T. tinca* el desplazamiento de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel por diferentes análogos de la melatonina depende de la concentración de fármaco empleada (Figura 5c). Además, la temperatura del ensayo también difiere de la del resto de tejidos estudiados, habiéndose realizado el estudio farmacológico a 4°C, si bien en este caso los resultados coinciden si se realiza a 25°C. Los fármacos empleados y los valores de  $K_i$  observados para cada uno de ellos son: 2-I-Mel ( $K_i = 111,30 \text{ nM}$ ), NAS ( $K_i = 317,80 \text{ nM}$ ), Melatonina ( $K_i = 1,25 \text{ µM}$ ) y 5-MCA-NAT ( $K_i = 12,54 \text{ µM}$ ). El orden de potencias de inhibición de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina por los fármacos empleados es el siguiente:



Podemos apreciar claras diferencias entre el riñón y el resto de tejidos empleados. La curva de inhibición de la 2-I-Mel está desplazada muy a la derecha, presentando una constante de inhibición en el intervalo nanomolar, mientras que en el resto de tejidos estudiados se encuentra a nivel picomolar. Lo mismo sucede con la Mel, produciéndose un salto de 3 órdenes de magnitud en su constante de inhibición, de un valor nanomolar a otro micromolar. Además, el 5-MCA-NAT, análogo específico de receptores del subtipo Mel-2, muestra una curva de inhibición de la unión de radioligando en extractos de membrana de riñón de la tenca, resultado que no se produce en el caso de la retina neural, lo que constituye la diferencia más significativa entre ambos tejidos. Con todos estos datos, así como a partir del orden de magnitudes encontrado en la farmacología del riñón de la tenca sugerimos que en este órgano existe una población de receptores que presenta una farmacología característica de los receptores del subtipo Mel-2.

Tabla 1. Parámetros que definen las características de la unión de melatonina en preparaciones de membranas de tejidos centrales y periféricos de *Tinca tinca*.

	RETINA	T. ÓPTICO	CORAZÓN	RIÑÓN
<b>Kd (pM)</b>	17,47 ± 1,22	22,31 ± 1,64	10,26 ± 1,09	423,93 ± 173,51 **
<b>Bmax (fmol/mg prot)</b>	48,07 ± 0,89	33,76 ± 0,69	8,41 ± 0,20	1,12 ± 0,20 **
<b>K<sub>+1</sub> 10<sup>-3</sup>(pM<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>)</b>	0,718 ± 0,045	0,363 ± 0,022	0,126 ± 0,019	43,02 ± 13,32 **
<b>K<sub>-1</sub> 10<sup>-3</sup> (min<sup>-1</sup>)</b>	5,261 ± 0,328	2,95 ± 0,25	4,561 ± 0,556	4027,86 ± 1560,96 **
<b>Kd<sub>cinética</sub> (pM)</b>	7,32	8,15	36,3	93,6
<b>K<sub>i</sub></b>				
<b>2-I-Mel</b>	118,40 pM	52,52 pM	52,93 pM	111,30 nM **
<b>2-Ph-Mel</b>	132,00 pM	86,98 pM	—	—
<b>Mel</b>	3,69 nM	1,55 nM	2,34 nM	1,25 μM **
<b>6-Cl-Mel</b>	16,70 nM	1,27 nM	—	—
<b>5-MCPT</b>	19,30 nM	—	8,96 nM	—
<b>4-P-PDOT</b>	0,96 μM	8,31 μM	4,29 μM	—
<b>Luzindol</b>	1,54 μM	2,61 μM	2,31 μM	—
<b>NAS</b>	—	—	7,08 μM	317,80 nM **
<b>5-MCA-NAT</b>	No inhibe	—	—	12,54 μM

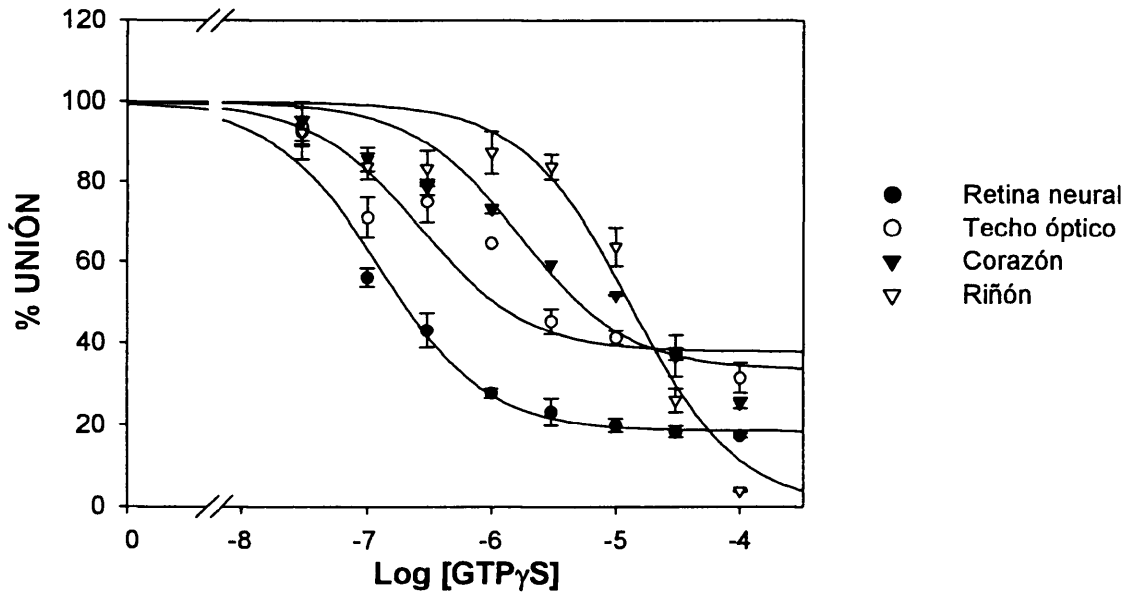
La constante de disociación en el equilibrio (Kd) y densidad de receptores (Bmax) obtenidas en los estudios de saturación se calculan mediante una regresión no lineal de un modelo logístico de 4 parámetros. El error estándar de las constantes (SE) se calcula a partir de los residuos obtenidos del ajuste de mínimos cuadrados. Diferencias estadísticamente significativas se evaluaron según el principio de la suma extra de cuadrados evaluada mediante el test de la *F* de Fisher-Snedecor. Las tasas de asociación (K<sub>+1</sub>) y disociación (K<sub>-1</sub>) fueron calculadas mediante una regresión no lineal, asumiendo un aumento exponencial hasta un máximo de pseudo primer orden para la K<sub>+1</sub>, así como una caída exponencial de primer orden para la K<sub>-1</sub>. La Kd obtenida a partir de los estudios cinéticos se calculó como el cociente entre ambas constantes (Kd = K<sub>-1</sub>/ K<sub>+1</sub>). La constante de inhibición (K<sub>i</sub>) se determinó a partir de los valores de IC<sub>50</sub> mediante la ecuación de Cheng y Prusoff (1973). \*\* p < 0,01 con respecto al resto de tejidos.

En resumen, en la Tabla 1 se presentan los valores de  $K_d$ ,  $B_{max}$ ,  $K_{+1}$ ,  $K_{-1}$  y  $K_{d_{cinética}}$  en cada uno de los tejidos estudiados y los valores de  $K_i$  obtenidos para cada uno de los análogos de la melatonina en todos ellos. Se puede observar claramente cómo los sitios de unión del riñón tienen una menor afinidad por el radioligando ( $K_d$  más elevada) que los del resto de los tejidos estudiados. Del mismo modo, la densidad de receptores es máxima en la retina neural, mientras que el riñón presenta la densidad más baja de todos los tejidos caracterizados. Cuando comparamos las constantes de inhibición para la NAS entre el riñón y el corazón se puede apreciar claramente un gran salto en dicha constante, siendo la afinidad del riñón mucho mayor que en el corazón. En cambio, cuando comparamos la inhibición del 5-MCA-NAT en el riñón y la retina, observamos que dicho fármaco es incapaz de inhibir la unión del radioligando a sus receptores en la retina neural, pero a las mismas concentraciones inhiben la unión en el riñón. Estos resultados, junto a las diferencias estadísticas encontradas entre los valores de  $K_i$  para la melatonina y la 2-I-Mel en el riñón y el resto de tejidos estudiados nos revela la existencia de dos subtipos de receptores de melatonina claramente diferentes en el teleosteo *T. tinca*, uno de localización fundamentalmente central, aunque también se encuentre presente en otros tejidos periféricos, como en el corazón, y otro de localización mayoritariamente periférica, presente en tejidos como en el riñón, las branquias y tubo digestivo anterior y posterior, ya que la NAS desplaza selectivamente la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en estos tejidos periféricos (resultados no mostrados).

### 3. EFFECTO DEL GTP $\gamma$ S Y EL SODIO SOBRE LA UNIÓN DE 2-[<sup>125</sup>I]-MELATONINA.

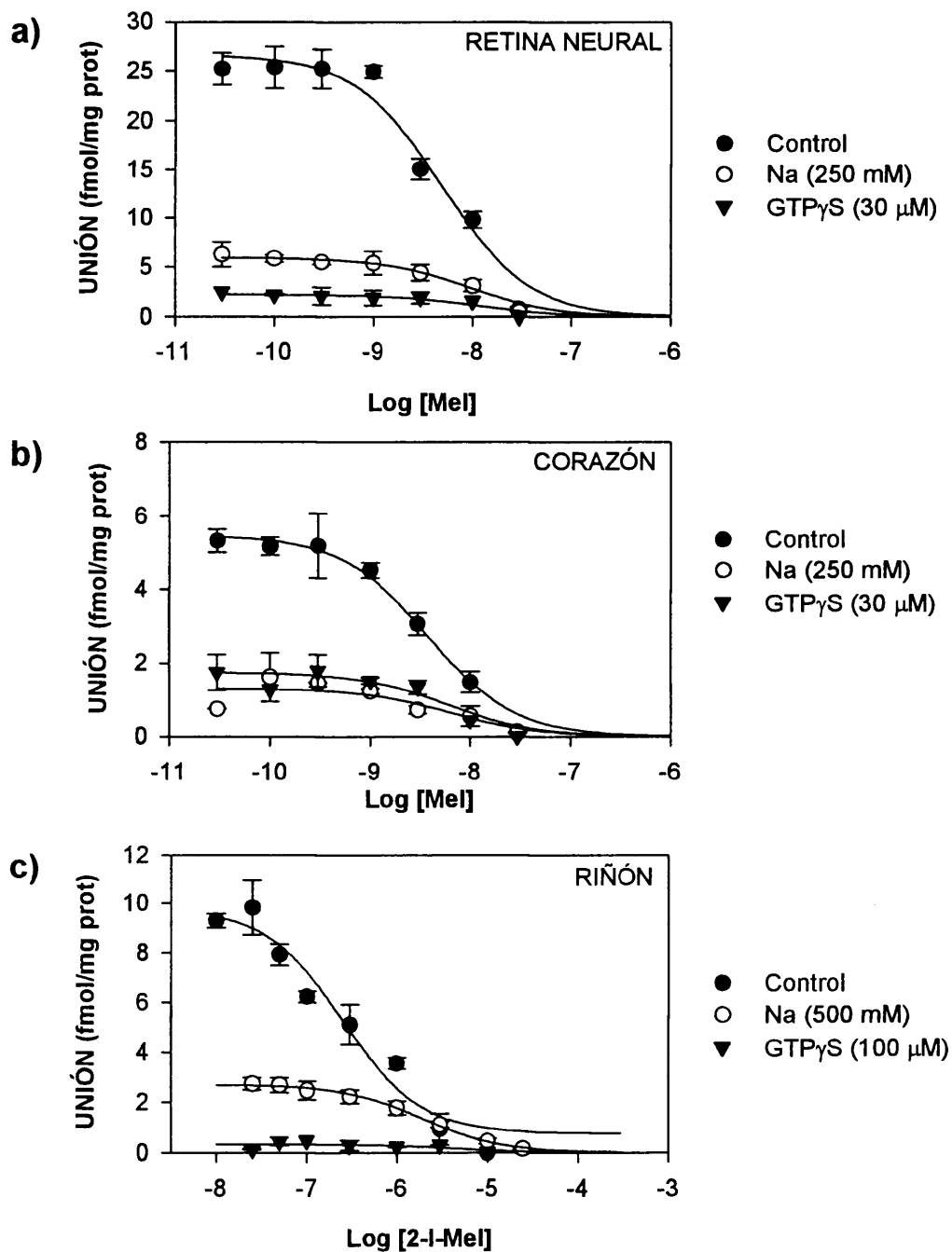
Como se puede observar en la Figura 6, el GTP $\gamma$ S inhibe la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en todos los tejidos estudiados, de manera dependiente de la concentración. Tal y como se puede apreciar en los valores de  $IC_{50}$  de la tabla incluida en la Figura 6, la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel se inhibe a concentraciones más bajas de GTP $\gamma$ S en la retina neural, necesitándose concentraciones superiores, del orden de 10 veces, para obtener el mismo efecto en el techo óptico. La misma diferencia en la potencia de inhibición se produce en el caso del corazón respecto al techo óptico. Finalmente, en el riñón, la concentración necesaria de GTP $\gamma$ S para que se produzca la inhibición de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel es la más elevada de todos los tejidos estudiados. Además, el porcentaje de inhibición de la unión máxima en el riñón también es más elevado que en el resto de tejidos, alcanzándose prácticamente la inhibición completa.

El Na<sup>+</sup> y el GTP $\gamma$ S cuando se añaden de forma separada disminuyen la unión máxima 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la retina neural (Figura 7a), encontrándose valores máximos en torno

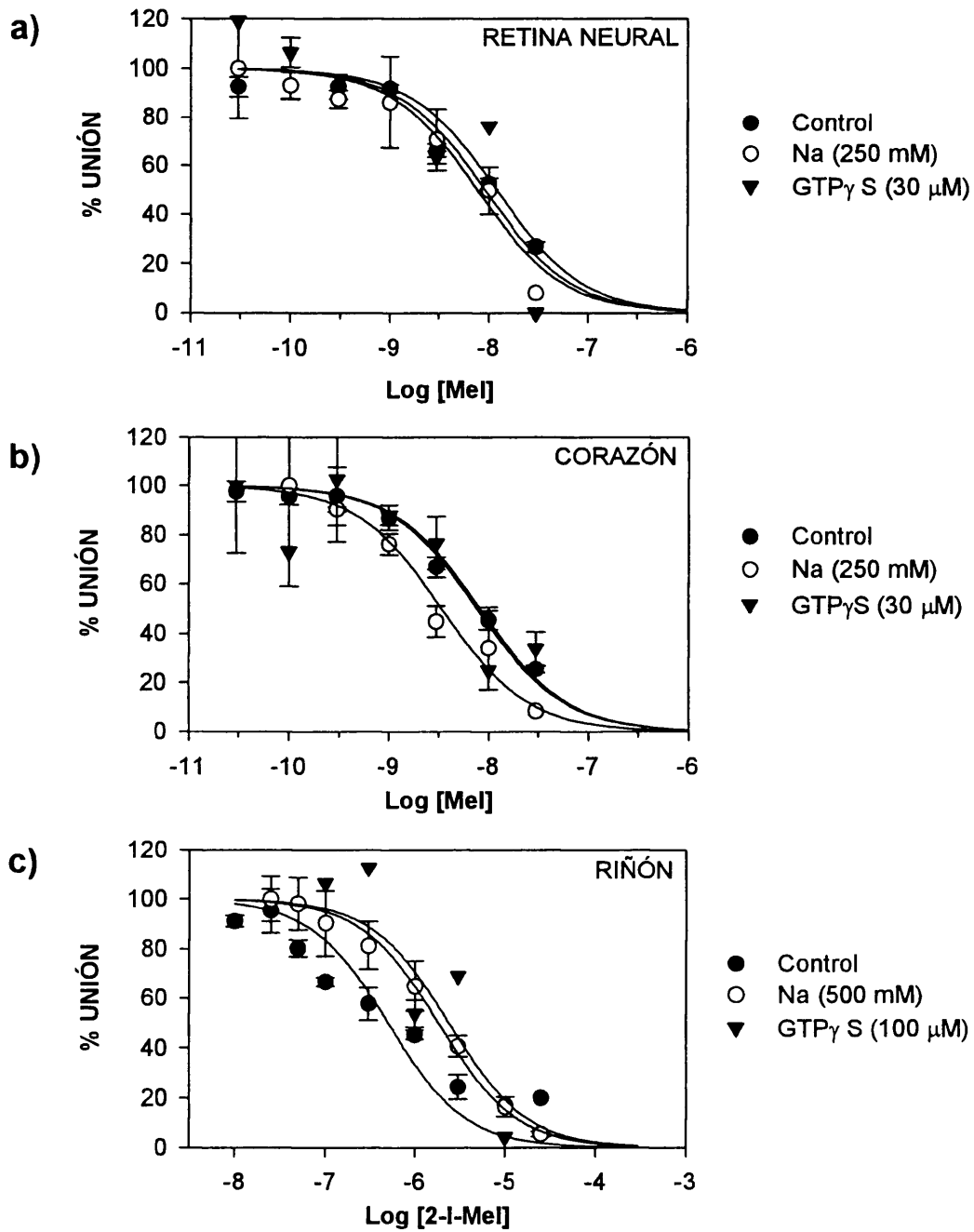


	RETINA	TECHO ÓPTICO	CORAZÓN	RIÑÓN
UNIÓN MÁXIMA (fmol/mg prot)	32,41 ± 1,31	17,10 ± 0,83	5,85 ± 0,18	2,49 ± 0,12
% INHIBICIÓN MÁXIMA	85%	74%	77%	96%
IC <sub>50</sub> (μM)	0,06 ± 0,005	0,81 ± 0,016	9,79 ± 0,015	28,71 ± 0,013

Figura 6. Efecto del GTP $\gamma$ S sobre la unión de 2[<sup>125</sup>I]-Mel en extractos de membrana procedentes de retina neural, techo óptico, corazón y riñón de la tenca. En la tabla adjunta se muestran los valores de unión máxima (estimación  $\pm$  e.e.), así como el porcentaje de inhibición máxima y los valores de IC<sub>50</sub> medidos en todos los tejidos estudiados. La gráfica representa porcentajes de unión, considerando el 100 % de la unión el valor que aparece en la tabla.



**Figura 7.** Efecto del GTP $\gamma$ S y el Na<sup>+</sup> sobre la unión máxima de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel y sobre la curva de inhibición del ligando no marcado en extractos de membranas celulares de a) retina neural, b) corazón y c) riñón de *T. tinca*. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e.m. de valores triplicados.



**Figura 8.** Efecto del GTP $\gamma$ S y el Na<sup>+</sup> sobre la curva de inhibición del ligando en extractos de membranas celulares procedentes de a) retina neural, b) corazón y c) riñón de *T. tinca*. Los datos están expresados como la media  $\pm$  e.e.m. del porcentaje de la unión específica en ausencia de agonistas o antagonistas.



a 27 fmol/mg prot. en ausencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , y valores de 7 fmol/mg prot en el caso de la adición de  $\text{Na}^+$  y de 2,5 fmol/mg prot. si se añade  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ . En la Figura 7b también se observa un descenso en la unión de los receptores en el corazón de la tenca, con valores que oscilan desde los 5,5 fmol/mg prot en ausencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , hasta los 1,5 ó los 2 fmol/mg prot para la adición de  $\text{Na}^+$  y  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , respectivamente. En el riñón, la Figura 7c muestra un descenso significativo de la densidad de receptores cuando se añade  $\text{Na}^+$  o  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , con valores de unión que oscilan desde los 9 fmol/mg prot sin  $\text{Na}^+$  ni  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , hasta los 3 y 0,5 fmol/mg prot tras la adición de  $\text{Na}^+$  y  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , respectivamente.

En resumen, la adición de  $\text{Na}^+$  o  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  en el ensayo produce una clara inhibición de la unión de 2-[ $^{125}\text{I}$ ]-Mel. Además, estos compuestos modifican profundamente la curva de competición de los ligandos específicos, Mel para la retina neural y el corazón, y 2-I-Mel para el riñón.

Con el fin de mostrar claramente los efectos del  $\text{Na}^+$  y el  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  sobre la afinidad de los receptores por estos ligandos, se representan los datos normalizados en la Figura 8. Ni el  $\text{Na}^+$  (250 mM) ni el  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (30  $\mu\text{M}$ ) provocan cambios significativos en la afinidad de los receptores de la retina neural, dando lugar a que las curvas de inhibición estén muy próximas entre sí (Fig. 8a). Las constantes de inhibición de cada tratamiento son: 0,77 nM, 0,65 nM y 1,01 nM para el control,  $\text{Na}^+$  y  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , respectivamente. Tampoco se ve afectada la afinidad de los receptores de melatonina en el corazón (Figura 8b) tras la adición de  $\text{Na}^+$  o  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ . Los valores de  $K_i$  obtenidos son: 395,60 pM, 175,30 pM y 425,20 pM en ausencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , con  $\text{Na}^+$  o con  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , respectivamente. A su vez, la afinidad por la 2-I-Mel de los receptores, estimada a partir del valor de la  $K_i$ , desciende ligeramente tras la adición de  $\text{Na}^+$  o  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , como puede apreciarse por el desplazamiento a la derecha de la curva de inhibición en el riñón de la tenca (Fig. 8c). Los valores de  $K_i$  obtenidos son: 26,53 nM sin  $\text{Na}^+$  ni  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , 97,13 nM y 126,70 nM para el  $\text{Na}^+$  (500 mM) y el  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (100  $\mu\text{M}$ ), respectivamente.

#### **4. RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE LA TENCA.**

##### **4.1. Retina neural:**

En primer lugar se ha analizado si existen diferencias en las variaciones diarias de la densidad de receptores en función del sexo (Tabla 2). No encontramos diferencias apreciables en ninguna de las épocas del año, como se deduce tras comparar el valor de los parámetros estimados a partir de la función sinusoidal para cada uno de los sexos de forma separada. Por tanto, hemos tratado los resultados de los ritmos estacionales sin tener

**Tabla 2.** Parámetros de la función sinusoidal ajustada al ritmo diario de densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la retina neural de la tenca en cada una de las estaciones del año.

Estación	Sexo	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	φ	Máx/mín	Ruido/señal
Primavera		138,86±2,22	7,49±2,99	10:21 ± 1:01	1,11	0,40
	Machos	139,40±2,59	7,49±3,55	9:31 ± 1:15	1,11	0,47
	Hembras	137,94±2,83	8,01±5,40	11:26 ± 2:10	1,12	0,67
Verano		49,35±0,90	0,25±1,23	19:32 ± 12:20	1,01	0,87
	Machos	48,51±1,28	1,98±1,72	11:36 ± 2:20	1,08	0,87
	Hembras	50,28±1,24	2,53±1,66	23:00 ± 2:07	1,11	0,66
Otoño		58,30±1,57	9,88±2,10	11:20 ± 0:53	1,41	0,21 *
	Machos	54,78±1,86	9,13±2,50	11:23 ± 1:09	1,40	0,27 *
	Hembras	61,63±2,46	11,24±3,26	10:32 ± 1:13	1,45	0,29 *
Invierno		79,69±1,93	12,49±2,63	13:00 ± 0:52	1,37	0,21 *
	Machos	76,82±2,04	11,27±2,82	12:21 ± 1:00	1,34	0,25 *
	Hembras	80,77±2,41	9,90±3,27	11:50 ± 1:23	1,28	0,33

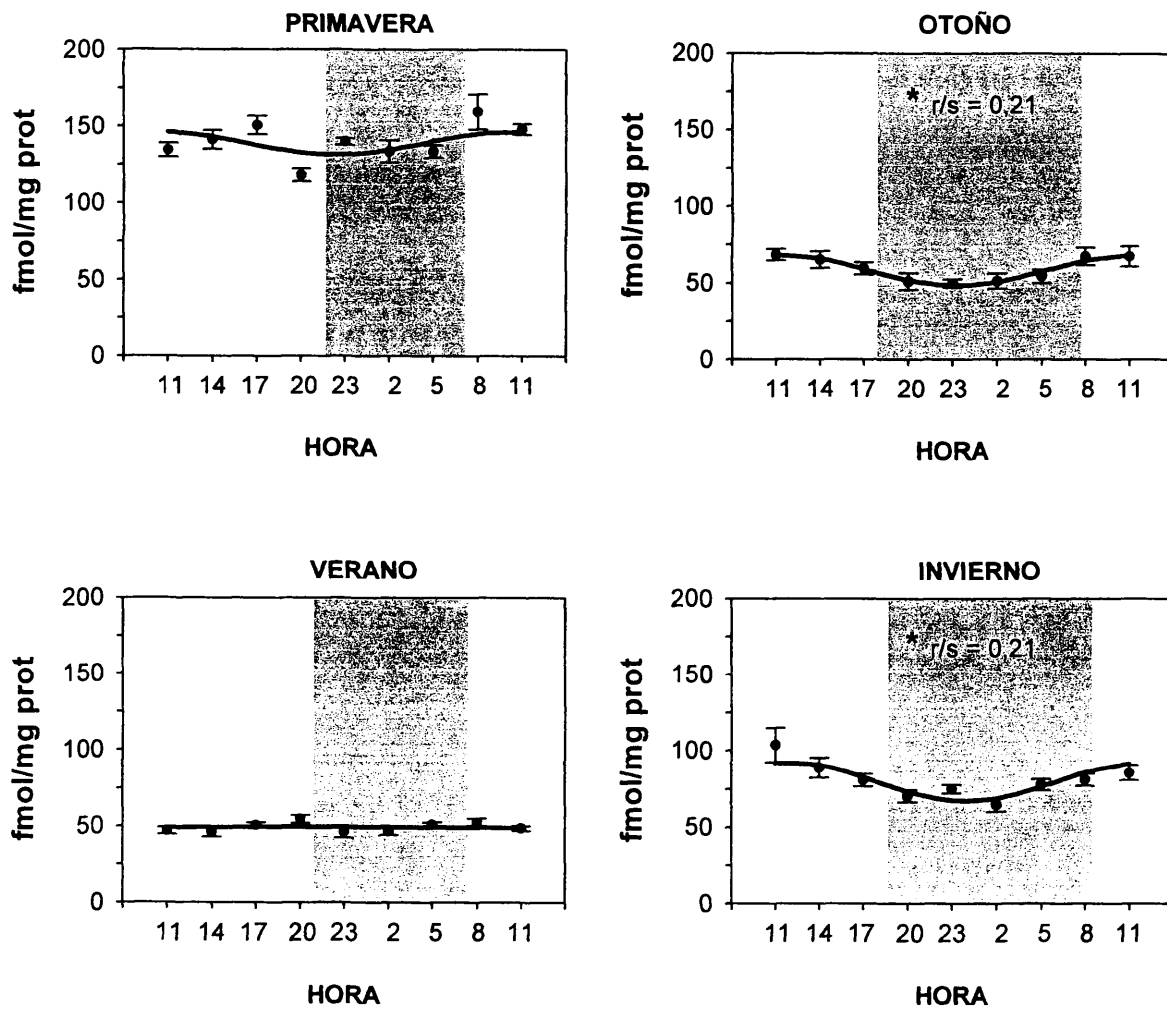
\* El ritmo es estadísticamente significativo (ruido/señal < 0,3). Los parámetros de la función se representan como estimación ± e.e. A<sub>0</sub>: mesor. A<sub>1</sub>: Amplitud sinusoidal. φ: Acrofase.

en cuenta el sexo de los animales. En la Figura 9 mostramos los ritmos diarios de densidad de receptores en la retina neural de la tenca en cada una de las estaciones del año. Este tejido muestra diferencias rítmicas diarias significativas en la densidad de receptores (cociente ruido/señal  $< 0,3$ ) en las estaciones de otoño e invierno. En ambas estaciones podemos apreciar claramente que la mayor densidad de receptores se encuentra en las horas centrales de la fase luminosa, tal y como indica el valor de la acrofase ( $\varphi$ ), que es a las  $11:20 \pm 0:53$  h en otoño y a las  $13:00 \pm 0:52$  h en invierno. Es importante destacar la notable ritmicidad estacional encontrada en la densidad de receptores en la retina neural de la tenca. Comparando los valores del mésores ( $A_0$ ) en cada una de las estaciones, encontramos la mayor densidad de receptores de melatonina en la retina en primavera ( $A_0 = 138,86 \pm 2,22$  fmol/mg prot), descendiendo drásticamente la densidad de sitios de unión para alcanzar valores mínimos en verano ( $A_0 = 49,35 \pm 0,90$  fmol/mg prot), y empieza a aumentar ligeramente en otoño ( $A_0 = 58,30 \pm 1,57$  fmol/mg prot). En invierno empieza el aumento gradual de la densidad de sitios de unión de melatonina ( $79,69 \pm 1,93$  fmol/mg prot) hasta alcanzar los valores máximos primaverales.

Con objeto de conocer si los ritmos diarios observados se deben a cambios en la afinidad, en la densidad de los receptores, o a ambos parámetros a la vez, se han realizado curvas de saturación en cada una de las estaciones, tanto en mitad de la fase luminosa como en mitad de la fase oscura del fotociclo diario, buscando además las posibles diferencias que puedan existir debidas al sexo. Como podemos observar en la Tabla 3, no existen diferencias significativas en los valores de  $K_d$  medidos en luz y en oscuridad en ninguna de las estaciones del año. Tampoco se aprecian diferencias en la afinidad de los receptores entre estaciones, ya que los valores de  $K_d$  se mantienen en el mismo orden de afinidades a lo largo de todo el año, oscilando entre 13 y 35 pM.

En la Tabla 3 también presentamos los valores de  $B_{max}$  obtenidos en los ensayos de saturación realizados con extractos de membranas procedentes de retina neural de machos y hembras extraídas a las 14:00 h (próximo a mitad del día) y a las 2:00 h (próximo a la mitad de la noche). Encontramos que en primavera la densidad de los receptores medida en los machos tiende a ser superior a las 14:00 h que a las 2:00 h ( $p = 0,032$ ), si bien la diferencia no llega a ser significativa. En verano existen diferencias día/noche en la  $B_{max}$  en las hembras ( $p = 0,005$ ), pero en este caso el valor más bajo se encuentra en los extractos de membranas procedentes de tencas hembras sacrificadas en mitad del día ( $39,65 \pm 1,12$  fmol/mg prot). En invierno, al realizar la comparación entre pares de grupos, se detectan diferencias día/noche en la densidad de receptores, encontrándose valores significativamente más elevados en ambos sexos en mitad del día ( $p = 0,004$  en los machos;  $p = 0,001$  en las hembras) respecto a los observados en mitad de la noche.

## RETINA NEURAL



**Figura 9.** Ritmicidad diaria y estacional en la densidad de receptores de melatonina en membranas celulares de retina neural del teleósteo *Tinca tinca*. La línea representa el ajuste sinusoidal. Cada punto (●) representa la media  $\pm$  e.e.m. (n = 8). La banda sombreada corresponde a la fase oscura del fotoperíodo diario.

**Tabla 3.** Variaciones diarias y estacionales de la constante de disociación (Kd) y de la densidad de receptores (Bmax) para los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en extractos de membrana procedentes de retina neural de machos y hembras de *Tinca tinca* sacrificados en mitad de la fase luminosa y de la fase oscura del fotociclo diario.

	HORA (h)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg prot)
<b>PRIMAVERA</b>			
MACHOS	14:00	19,09 ± 1,77	119,76 ± 4,41
	2:00	14,11 ± 1,21	101,29 ± 3,81
HEMBRAS	14:00	17,44 ± 1,16	115,42 ± 3,15
	2:00	18,99 ± 1,73	116,55 ± 4,63
<b>VERANO</b>			
MACHOS	14:00	20,42 ± 3,57	44,82 ± 1,97
	2:00	19,15 ± 3,74	44,54 ± 1,19
HEMBRAS	14:00	20,66 ± 2,95	39,65 ± 1,12
	2:00	25,22 ± 2,72	45,66 ± 1,36 #
<b>OTOÑO</b>			
MACHOS	14:00	34,21 ± 4,64	74,96 ± 1,96
	2:00	20,62 ± 4,54	63,60 ± 2,43
HEMBRAS	14:00	29,36 ± 4,69	70,38 ± 1,81
	2:00	25,37 ± 3,88	57,39 ± 1,57
<b>INVIERNO</b>			
MACHOS	14:00	22,33 ± 1,57	72,55 ± 2,02 #
	2:00	19,64 ± 1,47	48,26 ± 1,24
HEMBRAS	14:00	24,01 ± 1,38	75,75 ± 1,56 #
	2:00	22,09 ± 1,91	49,95 ± 1,37

La constante de disociación en el equilibrio (Kd) y la densidad de receptores (Bmax) se calculan mediante una regresión no lineal de un modelo logístico de 4 parámetros (De Lean *et al.*, 1978). El error estándar de las constantes (e.e.) se calcula a partir de los residuos obtenidos del ajuste de mínimos cuadrados. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron según el principio de la suma extra de cuadrados mediante el test de la F de Fisher-Snedecor. Los datos mostrados son la estimación ± e.e. # p < 0,01 respecto del mismo sexo en la fase opuesta y en la misma estación.

En resumen podemos afirmar que en la retina neural de la tenca, los cambios diarios en los receptores no son debidos a variaciones de la afinidad, sino más bien a un ritmo día/noche en la densidad de los sitios de unión.

#### 4.2. Techo óptico:

Al igual que en la retina neural, con el fin de comprobar si existen diferencias debidas al sexo, estimamos las funciones sinusoidales que definen los ritmos diarios en la densidad de receptores de melatonina (Tabla 4). Puede observarse que no existen diferencias entre machos y hembras en ninguno de los parámetros, por lo que hemos tratado los ritmos estacionales sin tener en cuenta el sexo de los animales.

Los ritmos diarios de densidad de receptores en el techo óptico de la tenca en cada una de las estaciones del año se presentan en la Figura 10. Este tejido muestra diferencias rítmicas diarias significativas en la densidad de receptores únicamente en otoño, siendo el valor del cociente ruido/señal 0,15. Además, este ritmo se produce tanto en machos como en hembras (cociente ruido/señal = 0,17 y 0,29, respectivamente). Al igual que ocurre en la retina neural, en esta estación el momento del ciclo diario con mayor densidad de receptores también coincide con las horas centrales del día, como indica el valor de la fase ( $\varphi$ ), siendo el máximo a las  $11:09 \pm 0:37$  h. Del mismo modo, la amplitud sinusoidal ( $A_1$ ) es muy elevada ( $22,70 \pm 3,37$  fmol/mg prot), lo que muestra claramente la gran oscilación día/noche que se produce en esta estación, dando lugar a un valor en el coeficiente máximo-mínimo superior a 2. Nuevamente, de forma paralela a lo encontrado en la retina neural, en el techo óptico de la tenca se produce una clara estacionalidad en la densidad de receptores. El valor de la densidad media diaria o mesor ( $A_0$ ) más elevado lo encontramos en primavera ( $73,73 \pm 1,15$  fmol/mg prot) y el mínimo en verano ( $A_0 = 51,81 \pm 1,57$  fmol/mg prot), siendo intermedios los valores de otoño e invierno.

En la Tabla 5 se muestran los valores de las  $K_d$  y  $B_{max}$  obtenidas a partir de las curvas de saturación realizadas con extractos de membranas procedentes del techo óptico de la tenca. Los valores de  $K_d$  no difieren en el día y la noche en ninguna de las estaciones del año, únicamente se roza la significación ( $p = 0,017$ ) en las hembras en otoño, donde la comparación entre pares de grupos revela que los extractos de membranas procedentes de hembras sacrificadas en mitad de la noche presentan mayor afinidad ( $K_d = 16,58 \pm 2,50$  pM) que los obtenidos en mitad del día ( $K_d = 25,69 \pm 2,93$  pM) (Tabla 5).

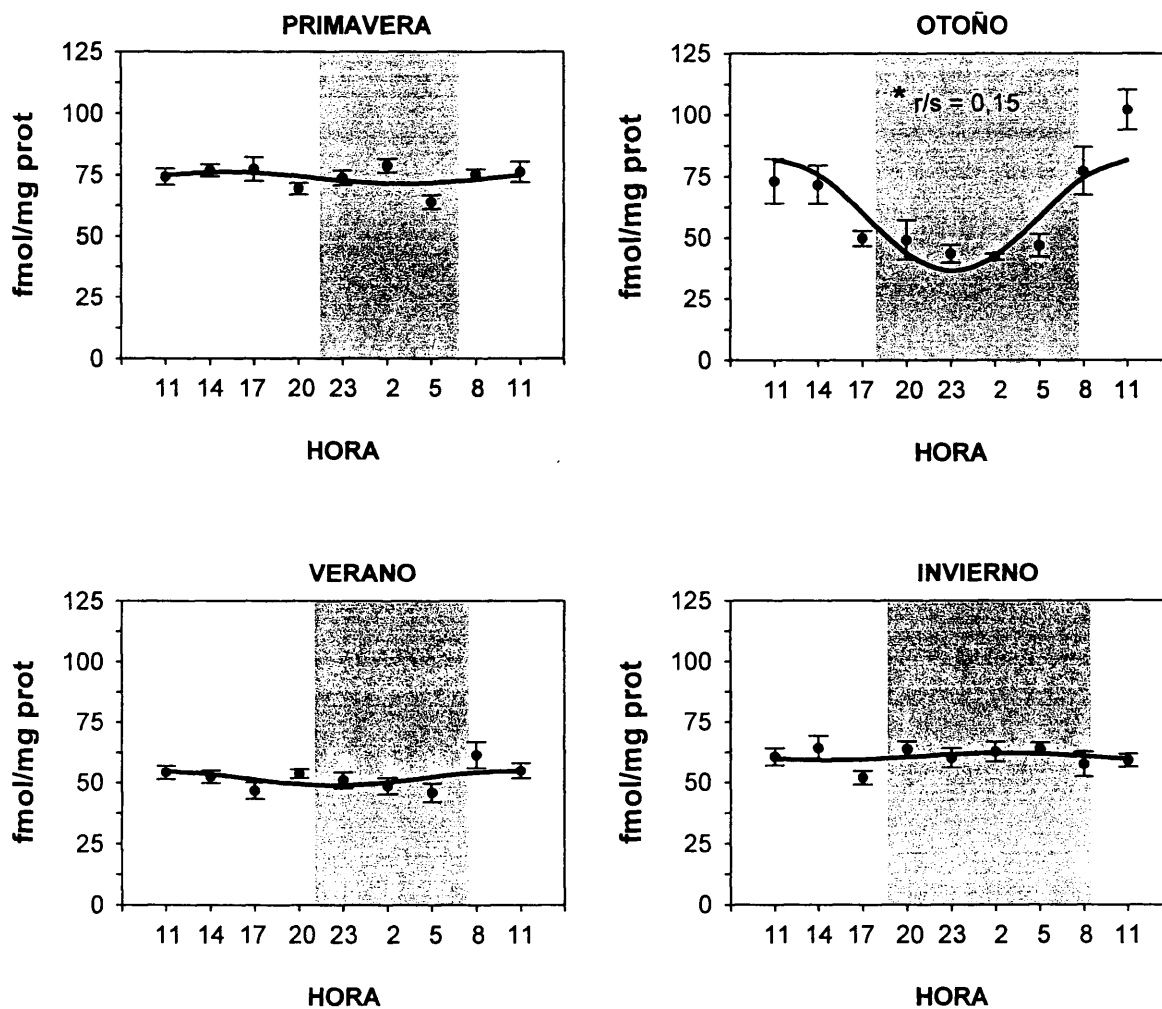
En relación con la densidad de receptores de 2-[ $^{125}$ I]-Mel (Tabla 5), sólo en las estaciones de otoño e invierno se aprecian diferencias día/noche significativas. En otoño, ambos sexos muestran densidades de receptores superiores en mitad de la fase luminosa

**Tabla 4.** Parámetros de la función sinusoidal ajustada a los ritmos diarios de densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina en el techo óptico de la tenca en las distintas estaciones del año.

Estación	Sexo	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	φ	Máx/mín	Ruido/señal
Primavera		73,73±1,15	2,40±1,66	15:08 ± 1:51	1,07	0,69
	Machos	72,30±1,68	2,25±2,25	10:37 ± 2:54	1,06	1,00
	Hembras	75,13±1,47	4,59±2,18	17:00 ± 1:38	1,13	0,47
Verano		51,81±1,57	2,94±1,61	10:23 ± 1:38	1,12	0,55
	Machos	48,59±1,86	2,03±1,83	12:39 ± 2:26	1,09	0,90
	Hembras	54,11±2,50	2,64±2,19	10:51 ± 2:10	1,10	0,83
Otoño		59,26±2,51	22,70±3,37	11:09 ± 0:37	2,24	0,15 *
	Machos	60,23±3,11	25,13±4,19	11:25 ± 0:42	2,43	0,17 *
	Hembras	56,90±4,19	18,07±5,20	11:21 ± 1:12	1,93	0,29 *
Invierno		60,72±1,31	1,44±1,90	2:32 ± 3:32	1,05	1,31
	Machos	57,73±1,97	2,89±2,90	3:27 ± 2:12	1,11	1,00
	Hembras	63,06±1,64	1,22±2,23	21:30 ± 5:00	1,04	1,84

\* El ritmo es estadísticamente significativo (ruido/señal < 0,3). Los parámetros de la función se representan como la estimación ± e.e. A<sub>0</sub>: mesor. A<sub>1</sub>: Amplitud sinusoidal. φ: Acrofase.

## TECHO ÓPTICO



**Figura 10.** Ritmicidad diaria y estacional en la densidad de receptores de melatonina en membranas celulares del techo óptico de la tenca. La línea representa el ajuste sinusoidal. Cada punto (●) representa la media  $\pm$  e.e.m. ( $n = 8$ ). La banda sombreada corresponde a la fase oscura del fotoperíodo diario.



**Tabla 5.** Constantes de disociación (Kd) y densidades de receptores (Bmax) para los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en extractos de membrana procedentes del techo óptico de tencas sacrificadas en mitad de la fase luminosa y en mitad de la fase oscura del fotociclo diario en las cuatro estaciones del año.

	HORA (h)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg prot)
<b>PRIMAVERA</b>			
MACHOS	14:00	18,77 ± 3,45	58,50 ± 4,27
	2:00	21,92 ± 4,42	66,17 ± 5,27
HEMBRAS	14:00	15,56 ± 1,98	59,58 ± 3,24
	2:00	17,73 ± 2,35	54,31 ± 2,95
<b>VERANO</b>			
MACHOS	14:00	31,32 ± 4,76	45,06 ± 2,24
	2:00	31,94 ± 4,02	37,73 ± 1,47
HEMBRAS	14:00	34,53 ± 3,60	39,70 ± 1,52
	2:00	21,18 ± 6,20	30,72 ± 2,85
<b>OTOÑO</b>			
MACHOS	14:00	31,95 ± 3,26	66,30 ± 2,31 #
	2:00	21,67 ± 3,92	43,70 ± 1,73
HEMBRAS	14:00	25,69 ± 2,93	64,96 ± 2,56 #
	2:00	16,58 ± 2,50	35,86 ± 1,50
<b>INVIERNO</b>			
MACHOS	14:00	28,33 ± 4,06	65,13 ± 2,17
	2:00	21,83 ± 2,68	66,26 ± 2,81**
HEMBRAS	14:00	23,42 ± 5,08	63,16 ± 4,91
	2:00	16,52 ± 1,90	54,07 ± 1,84

La constante de disociación en el equilibrio (Kd) y densidad de receptores (Bmax) se calculan mediante una regresión no lineal de un modelo logístico de 4 parámetros. El error estándar de las constantes (e.e.) se calcula a partir de los residuos obtenidos del ajuste de mínimos cuadrados. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron según el principio de la suma extra de cuadrados evaluada mediante el test de la *F* de Fisher-Snedecor. Los datos mostrados son la estimación ± e.e. \*\* *p* < 0,01 respecto del sexo opuesto en la misma fase; # *p* < 0,01 respecto del mismo sexo en la fase opuesta y en la misma estación.

respecto a los valores nocturnos ( $p = 0,002$ ). Las diferencias entre sexos en esta estación rozan la significación ( $p = 0,02$ ) cuando se compara la densidad de receptores durante la noche (2:00 h), encontrándose los valores más elevados en los machos ( $B_{\max} = 43,70 \pm 1,73$  fmol/mg prot), frente a lo medido en las hembras ( $B_{\max} = 35,86 \pm 1,50$  fmol/mg prot). En invierno, únicamente se observan diferencias significativas entre machos y hembras ( $p = 0,002$ ) sacrificados en mitad de la noche con valores superiores en los machos, ( $B_{\max} = 66,26 \pm 2,81$  fmol/mg prot), frente a los  $54,07 \pm 1,84$  fmol/mg prot medidos en las hembras.

En resumen, podemos decir que en el techo óptico de la tenca, los cambios diarios apreciados en la densidad de los receptores (datos reflejados en los ajustes circadianos) no se deben a cambios en la afinidad de los receptores, sino más bien al ritmo diario de su densidad.

#### 4.3. Corazón:

Al igual que en los tejidos anteriores, en primer lugar comprobamos si existían diferencias entre ambos sexos en los parámetros de las funciones sinusoidales teóricas que definen los ritmos diarios en la densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel (Tabla 6). Al no existir diferencias entre sexos, agrupamos los datos y los representamos en la Figura 11. Las variaciones diarias en la densidad de los receptores de melatonina en el corazón de la tenca resultan ser estadísticamente significativas en otoño e invierno, siendo el valor del cociente ruido/señal de 0,29 en ambas estaciones. En otoño, la mayor densidad de receptores coincide con las horas centrales del día, siendo la fase ( $\varphi$ ) a las  $12:49 \pm 1:08$  h. El momento del máximo en invierno también tiene lugar durante la fase luminosa del fotociclo diario, si bien se produce un ligero retraso del mismo ( $\varphi = 16:08 \pm 1:02$  h), acercándose dicho máximo a las últimas horas de la fase luminosa.

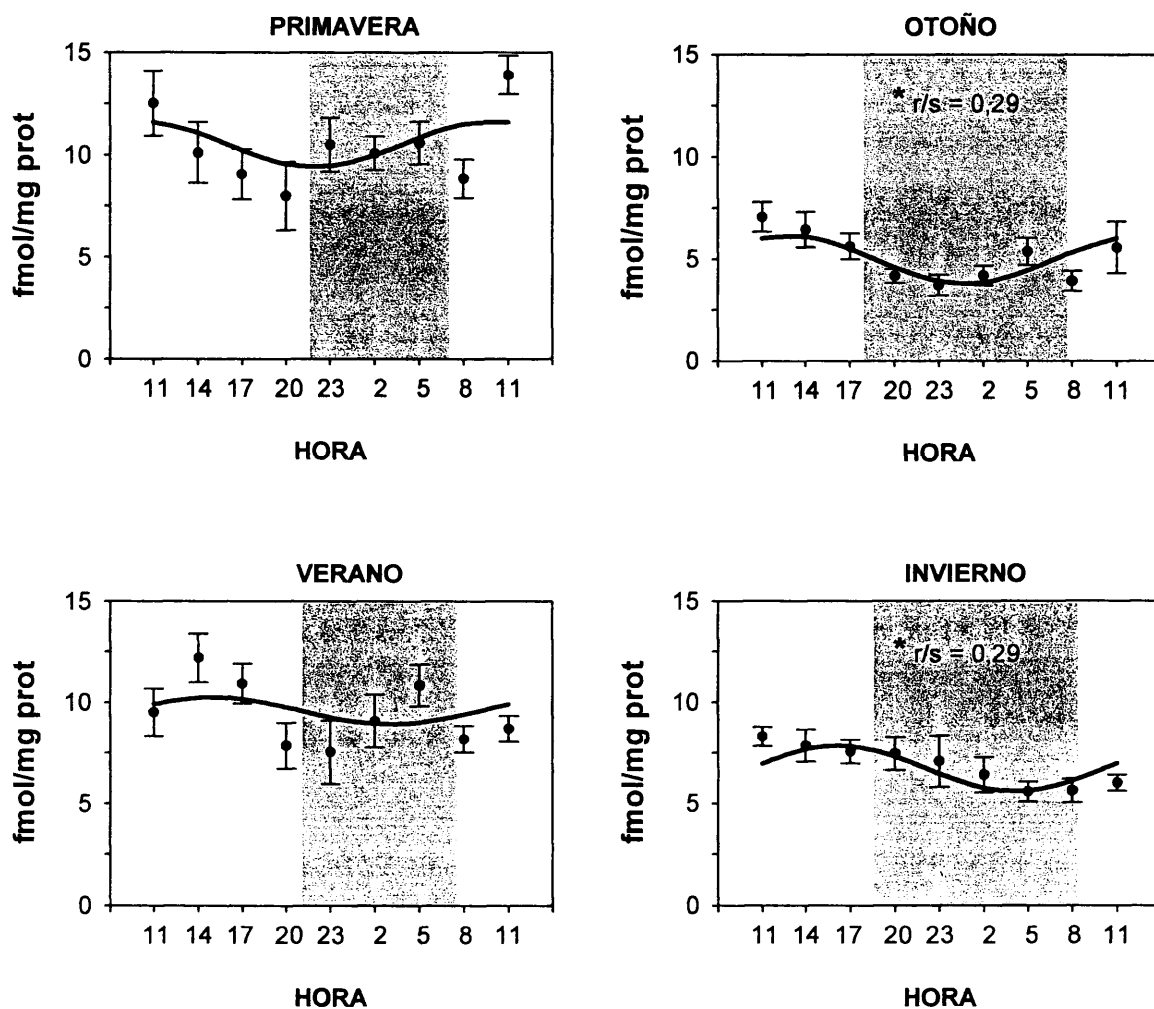
En el estudio de la ritmicidad diaria en extractos de membranas plasmáticas obtenidas del corazón de la tenca se aprecia un claro paralelismo en la tendencia observada en éste y los tejidos estudiados anteriormente (retina neural y techo óptico), hallando también en el corazón un ritmo significativo durante las estaciones de otoño e invierno (cociente ruido/señal = 0,29 en ambos casos) (Tabla 6). En cuanto a la variación estacional, cabe destacar que durante la primavera y verano el mesor es muy similar, y ligeramente mayor que en otoño e invierno.

**Tabla 6.** Parámetros que definen la función sinusoidal ajustada al ritmo diario de densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el corazón del teleosteo *Tinca tinca*, en cada una de las estaciones del año.

Estación	Sexo	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	φ	Máx/mín	Ruido/señal
Primavera		10,52±0,44	1,10±0,60	9:57 ± 1:36	1,23	0,54
	Machos	10,72±0,56	1,91±0,86	15:18 ± 1:30	1,43	0,45
	Hembras	11,22±0,65	2,26±0,95	8:05 ± 1:30	1,51	0,42
Verano		9,59±0,37	0,66±0,53	15:03 ± 2:10	1,15	0,79
	Machos	9,14±0,48	1,08±0,66	14:45 ± 1:40	1,27	0,62
	Hembras	9,99±0,56	0,28±0,83	15:36 ± 6:08	1,06	3,00
Otoño		4,95±0,24	1,15±0,33	12:49 ± 1:08	1,60	0,29 *
	Machos	4,37±0,24	0,74±0,32	11:51 ± 1:14	1,41	0,44
	Hembras	5,65±0,43	1,65±0,60	13:24 ± 1:22	1,83	0,37
Invierno		6,71±0,22	1,13±0,32	16:08 ± 1:02	1,40	0,29 *
	Machos	6,43±0,25	1,21±0,36	17:42 ± 1:05	1,46	0,29 *
	Hembras	7,45±0,43	0,69±0,62	16:55 ± 2:38	1,20	0,90

\* El ritmo es estadísticamente significativo (ruido/señal < 0,3). Los parámetros de la función se representan como la estimación ± e.e. A<sub>0</sub>: Mesor. A<sub>1</sub>: Amplitud sinusoidal. φ: Acrofase.

## CORAZÓN



**Figura 11.** Variaciones diarias y estacionales en la densidad de receptores de melatonina en preparaciones de membrana obtenidas del corazón de *T. tinca*. La línea representa el ajuste sinusoidal. Cada punto (●) representa la media  $\pm$  e.e.m. La banda sombreada corresponde a la fase oscura del fotoperiodo diario.

La afinidad de los receptores de melatonina por el ligando no muestra diferencias significativas a lo largo de las estaciones, ni entre sexos, ni al comparar los valores obtenidos al medio día con los obtenidos a media noche (Tabla 7). La densidad de receptores, en cambio, muestra diferencias significativas en otoño (Tabla 7), encontrando diferencias significativas día/noche en ambos sexos ( $p = 0,001$  en los machos y  $p = 0,004$  en las hembras), con valores máximos en mitad del día y mínimos en mitad de la noche. En invierno la tendencia es similar a la de otoño, es decir densidades superiores durante el día tanto en machos como en hembras, si bien las diferencias no llegan a la significación estadística.

#### 4.4. Riñón:

No encontramos diferencias apreciables en ninguno de los parámetros que definen las funciones sinusoidales del ajuste de las variaciones diarias de receptores en ninguna de las épocas del año (Tabla 8) para ninguno de los sexos. Por tanto, de nuevo hemos tratado los ritmos estacionales sin tener en cuenta el sexo de los animales.

En la Figura 12 representamos los ritmos diarios y estacionales de la densidad de receptores en el riñón. Al igual que en el resto de los tejidos estudiados, existen diferencias significativas únicamente en otoño (coeficiente ruido/señal = 0,29), con valores máximos durante el día y más bajos durante la noche. Además, también se roza la significación en invierno (coeficiente ruido/señal = 0,36). Al igual que ocurre en el caso del tejido cardíaco de la tenca, también en el riñón se produce un ligero desplazamiento del momento del día en el que se observan las mayores densidades de receptores ( $\varphi = 7:40 \pm 1:04$  h), adelantándose hacia el comienzo de la fotofase.

En los ensayos de saturación a 4°C realizados con extractos de membrana procedentes de machos y hembras sacrificados en mitad de la fase luminosa y en mitad de la escotofase no se observan diferencias día/noche ni en la afinidad ni en la densidad de receptores (Tabla 9). Sin embargo se puede observar un cierto carácter estacional en la densidad de receptores, con los valores medios más elevados en invierno (2,15 fmol/mg prot), descendiendo drásticamente hasta los valores medios de verano (0,67 fmol/mg prot), y pasando por densidades medias ligeramente superiores en primavera (1,58 fmol/mg prot). En otoño comienza el aumento de la densidad media de receptores (0,68 fmol/mg prot) hasta alcanzar los valores medios máximos invernales.

**Tabla 7.** Constantes de disociación (Kd) y densidad de receptores (Bmax) para los sitios de unión de [2-<sup>125</sup>I]-Melatonina en extractos de membrana procedentes del corazón de machos y hembras de tenca sacrificadas en mitad de la fase luminosa y en mitad de la fase oscura del fotociclo diario en las cuatro estaciones del año.

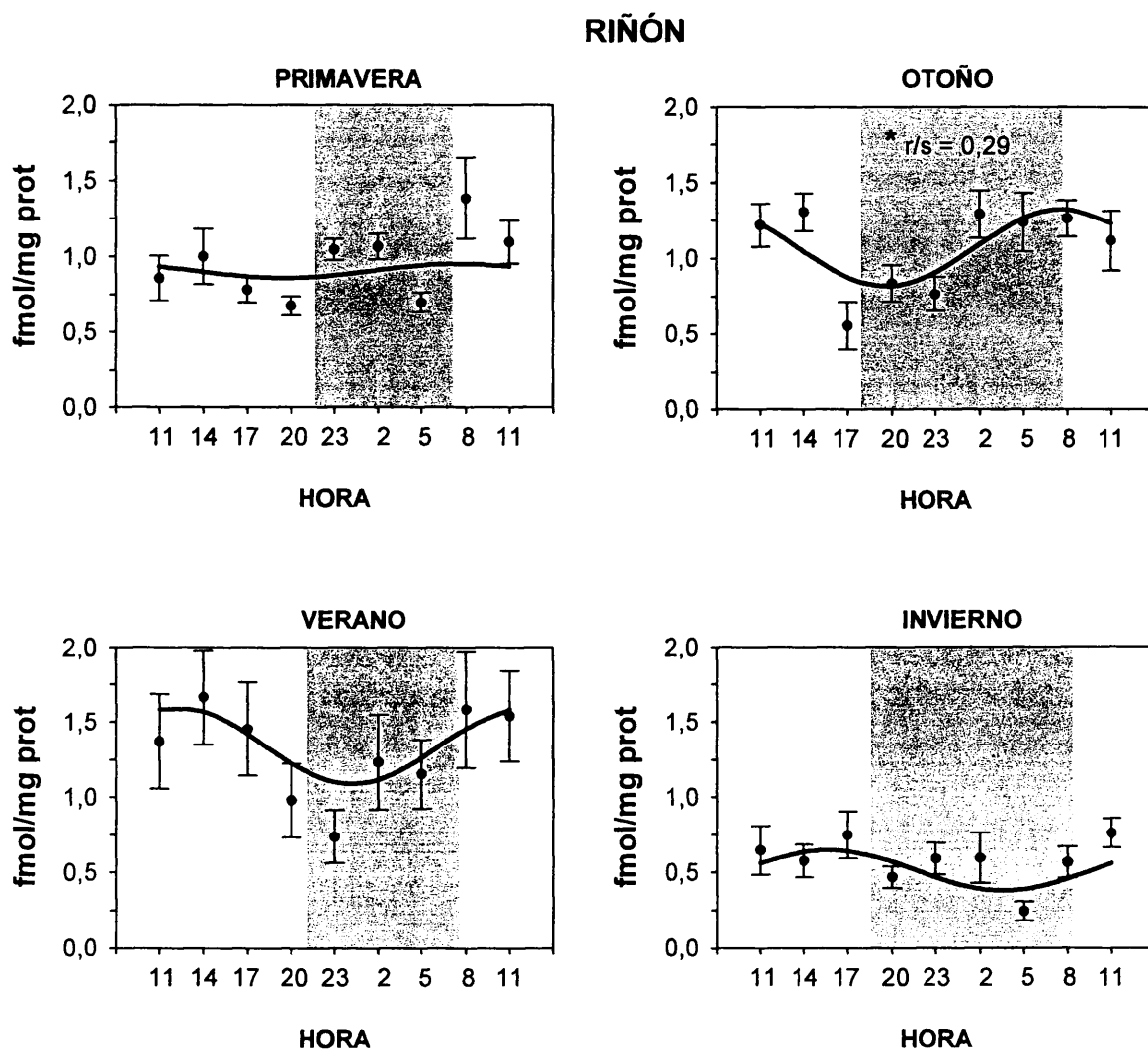
	HORA (h)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg prot)
<b>PRIMAVERA</b>			
MACHOS	14:00	16,21 ± 5,30	8,44 ± 0,62
	2:00	17,51 ± 2,97	9,80 ± 0,49
HEMBRAS	14:00	11,66 ± 1,75	10,50 ± 0,44
	2:00	13,10 ± 1,97	11,02 ± 0,52
<b>VERANO</b>			
MACHOS	14:00	16,08 ± 3,36	8,94 ± 0,78
	2:00	14,43 ± 4,44	10,43 ± 1,11
HEMBRAS	14:00	10,08 ± 3,00	12,30 ± 1,76
	2:00	11,82 ± 2,98	8,23 ± 0,81
<b>OTOÑO</b>			
MACHOS	14:00	13,34 ± 2,51	9,92 ± 0,66 #
	2:00	11,38 ± 4,05	5,53 ± 0,68
HEMBRAS	14:00	10,15 ± 1,57	9,79 ± 0,52 #
	2:00	12,63 ± 2,33	5,99 ± 0,42
<b>INVIERNO</b>			
MACHOS	14:00	17,99 ± 5,35	5,80 ± 0,60
	2:00	13,32 ± 4,04	3,57 ± 0,39
HEMBRAS	14:00	13,43 ± 2,02	7,34 ± 0,28
	2:00	13,71 ± 4,57	4,59 ± 0,41

La constante de disociación en el equilibrio (Kd) y densidad de receptores (Bmax) se calculan mediante una regresión no lineal de un modelo logístico de 4 parámetros. El error estándar de las constantes (e.e.) se calcula a partir de los residuos obtenidos del ajuste de mínimos cuadrados. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron según el principio de la suma extra de cuadrados mediante el test de la F de Fisher-Snedecor. Los datos mostrados son la estimación ± e.e. # p < 0,01 respecto del mismo sexo en la fase opuesta y en la misma estación.

**Tabla 8.** Parámetros de la función sinusoidal ajustada al ritmo diario de densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el riñón de *T. tinca*, en cada una de las estaciones del año.

Estación	Sexo	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	φ	Máx/mín	Ruido/señal
Primavera		0,90±0,04	0,05±0,05	7:34 ± 2:56	1,11	1,15
	Machos	0,91±0,05	0,08±0,08	7:03 ± 2:10	1,19	1,02
	Hembras	0,89±0,07	0,04±0,09	13:43 ± 5:50	1,09	2,30
Verano		1,34±0,10	0,26±0,14	12:13 ± 1:33	1,47	0,55
	Machos	1,12±0,11	0,46±0,16	14:09 ± 1:19	2,40	0,36
	Hembras	1,25±0,15	0,28±0,22	8:46 ± 2:09	1,58	0,78
Otoño		1,07±0,05	0,25±0,07	7:40 ± 1:04	1,35	0,29 *
	Machos	1,08±0,07	0,19±0,10	8:32 ± 1:26	1,44	0,54
	Hembras	1,08±0,06	0,30±0,09	7:09 ± 1:07	1,79	0,31
Invierno		0,51±0,03	0,14±0,05	15:39 ± 1:16	1,73	0,36
	Machos	0,59±0,04	0,12±0,06	18:36 ± 1:37	1,51	0,48
	Hembras	0,50±0,08	0,20±0,08	15:23 ± 1:21	2,40	0,39

\* El ritmo es estadísticamente significativo (ruido/señal < 0,3). Los ensayos se realizan a 4°C. Los parámetros de la función se representan como la estimación ± e.e. A<sub>0</sub>: Mesor. A<sub>1</sub>: Amplitud sinusoidal. φ: Acrofase.



**Figura 12.** Ritmo diario y estacional en la densidad de receptores de melatonina en preparaciones de membrana de riñón de tenca. La línea representa el ajuste sinusoidal. Cada punto (●) representa la media  $\pm$  e.e.m. ( $n = 8$ ). La banda sombreada corresponde a la fase oscura del fotoperíodo diario.



**Tabla 9.** Constantes de disociación (Kd) y densidad de receptores (Bmax) para los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en extractos de membrana de riñón de tencas de ambos sexos sacrificadas en mitad de la fase luminosa y en mitad de la fase oscura del fotociclo diario en las cuatro estaciones del año. Los ensayos se realizan a 4°C.

	HORA (h)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg prot)
<b>PRIMAVERA</b>			
MACHOS	14:00	591,80 ± 151,18	1,17 ± 0,28
	2:00	541,89 ± 184,71	0,92 ± 0,19
HEMBRAS	14:00	525,98 ± 167,72	1,01 ± 0,20
	2:00	501,49 ± 157,50	1,14 ± 0,26
<b>VERANO</b>			
MACHOS	14:00	420,97 ± 101,68	0,79 ± 0,15
	2:00	225,01 ± 91,40	0,42 ± 0,10
HEMBRAS	14:00	216,38 ± 56,76	0,66 ± 0,10
	2:00	400,63 ± 123,22	0,82 ± 0,18
<b>OTOÑO</b>			
MACHOS	14:00	525,69 ± 50,37	0,70 ± 0,05
	2:00	525,34 ± 36,72	0,81 ± 0,06
HEMBRAS	14:00	469,94 ± 80,56	0,56 ± 0,08
	2:00	506,57 ± 48,16	0,67 ± 0,05
<b>INVIERNO</b>			
MACHOS	14:00	545,31 ± 190,13	1,74 ± 0,33
	2:00	509,62 ± 112,59	3,04 ± 0,47
HEMBRAS	14:00	605,96 ± 140,18	2,17 ± 0,50
	2:00	523,94 ± 233,71	1,64 ± 0,47

La constante de disociación en el equilibrio (Kd) y densidad de receptor (Bmax) obtenidas se calculan mediante una regresión no lineal de un modelo logístico de 4 parámetros. El error estándar de las constantes (e.e.) se calcula a partir de los residuos obtenidos del ajuste de mínimos cuadrados. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por el principio de la suma extra de cuadrados evaluada mediante el test de la F de Fisher-Snedecor. Los datos mostrados corresponden al promedio de la estimación ± e.e.

## **5. RITMICIDAD ENDÓGENA EN LA DENSIDAD DE SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN ENCÉFALO DE *Tinca tinca*.**

Con objeto de investigar si las variaciones diarias observadas en los sitios de unión de melatonina en distintas áreas encefálicas de la tenca están controladas por un oscilador endógeno, sometimos a los animales a condiciones de oscuridad constante durante 72 horas y analizamos la ritmicidad diaria de densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. Como se puede observar en la Figura 13, en todos los tejidos encefálicos estudiados desaparece el ritmo diario de densidad de receptores. Es interesante comparar las densidades de sitios de unión en cada uno de los tejidos encefálicos, siendo el techo óptico el que presenta la mayor densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel, con valores medios que alcanzan los  $20 \pm 1$  fmol/mg prot. En cambio, las densidades son significativamente más bajas en el telencéfalo, el diencefalo y el rombencéfalo, con densidades medias de  $4,0 \pm 1,0$ ;  $1,5 \pm 1,0$ ; y  $1,0 \pm 0,5$  fmol/mg prot, respectivamente.

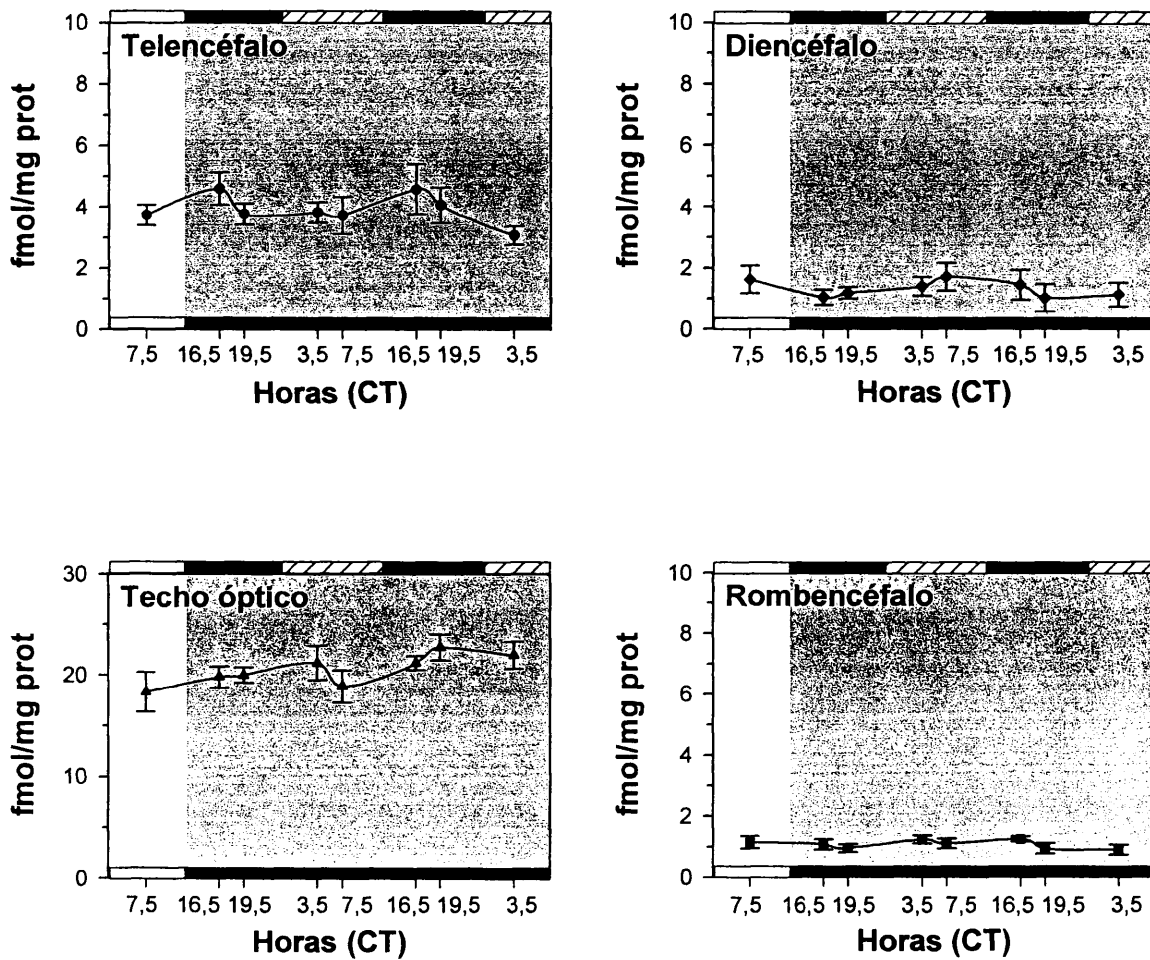
## **6. EFECTO DE LA LUZ SOBRE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LA RETINA Y TECHO ÓPTICO DE *Tinca tinca*.**

### **6.1. Efecto de diferentes intensidades lumínicas durante la fase luminosa del fotociclo diario sobre la Kd y la Bmax.**

Para investigar si distintas intensidades de luz pueden producir cambios en la afinidad o la densidad de los receptores en la tenca, se aclimataron dos grupos de peces a fotoperíodos 12L;12D, con intensidades bajas y altas durante la fotofase, concretamente 20 y 1300 lux (apartado 2.4.6.1 de materiales y métodos). Los peces se sacrificaron en mitad de las fases luminosa y oscura de su fotociclo diario, y que, en estas condiciones, corresponden a ZT 6 (mitad del día) y ZT 18 (mitad de la noche).

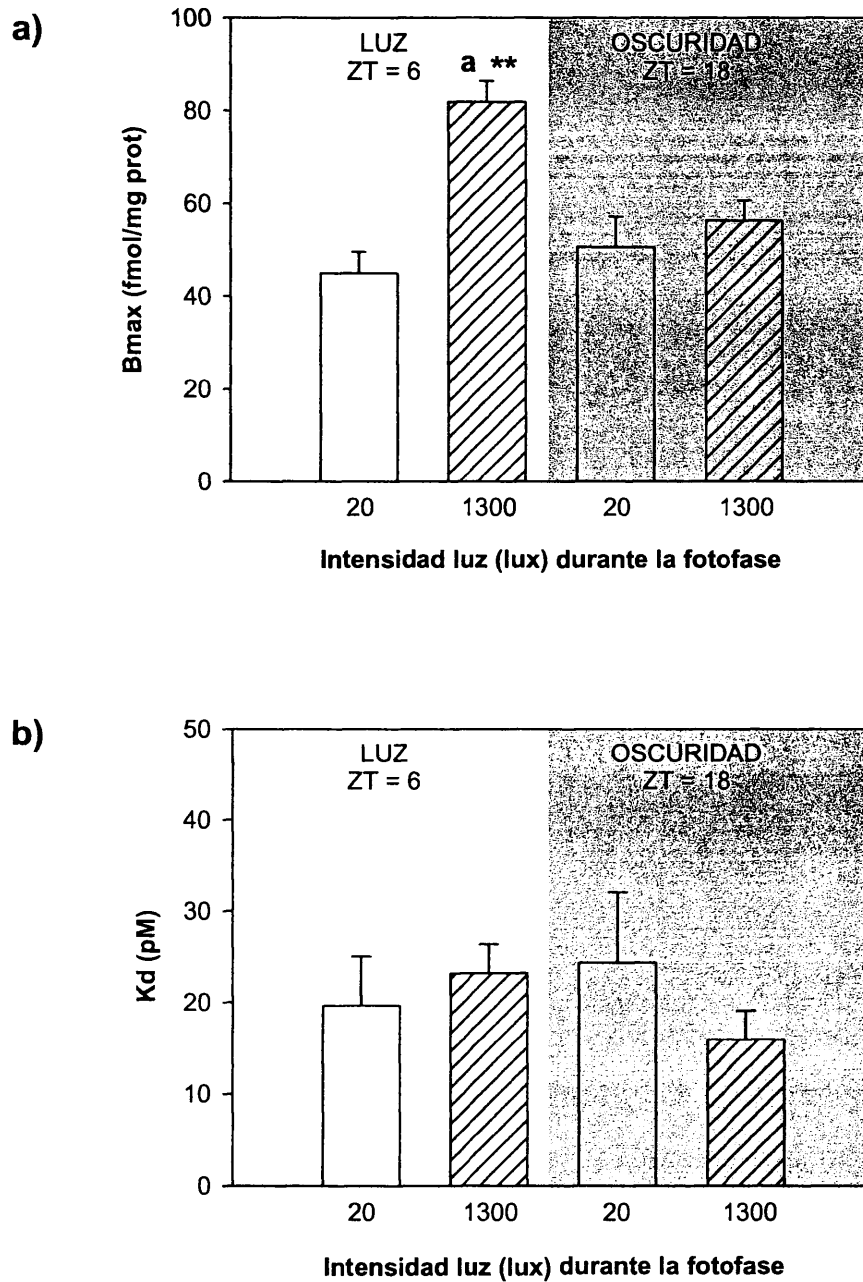
#### **a) Retina neural:**

La Figura 14 muestra el efecto producido por distintas intensidades de luz aplicadas durante la fase luminosa del fotociclo diario en la densidad de receptores de melatonina en la retina neural de la tenca. Las densidades máximas a mediodía aumentan significativamente ( $p = 0,001$ ) (Figura 14a) en retinas expuestas a una intensidad lumínica de 1300 lux ( $B_{max} = 81,85 \pm 4,59$  fmol/mg prot) respecto a las retinas expuestas a sólo a 20 lux durante el mismo período ( $p = 0,01$ ) ( $B_{max} = 45,02 \pm 4,63$  fmol/mg prot). Esta elevada densidad de receptores a medio día en tencas aclimatadas a 1300 lux se reduce significativamente a media noche ( $p = 0,004$ ), no existiendo diferencias en la fase oscura entre ambos grupos de peces ( $p = 0,496$ ) ( $B_{max} = 50,66 \pm 6,57$  y  $56,36 \pm 4,29$  fmol/mg prot para 20 y 1300 lux, respectivamente).



**Figura 13.** Densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en telencéfalo, techo óptico, diencéfalo y rombencéfalo de tencas sometidas a condiciones de oscuridad constante (n = 7/punto). Las barras oscuras y rayadas en la parte superior de las figuras representan la noche y el día subjetivos. La barra en la parte inferior indica las condiciones de iluminación durante el experimento. Los valores mostrados son el promedio  $\pm$  e.e.m. CT: tiempo circadiano.

## RETINA NEURAL



**Figura 14.** a) Capacidad máxima de unión y b) constantes de disociación ( $K_d$ ) de los receptores de 2- $[^{125}\text{I}]$ -Mel en la retina neural de tencas aclimatadas a dos intensidades lumínicas diferentes (20 y 1300 lux). Las muestras fueron obtenidas en mitad de la fase luminosa y en mitad de la fase oscura (fondo sombreado). \*\*:  $p < 0,01$  respecto de la fase oscura; a:  $p < 0,01$  respecto de la intensidad luminosa de 20 lux.

En el análisis de la afinidad de los receptores (Figura 14b) observamos que no existen diferencias en la  $K_d$  entre ambos grupos de peces aclimatados a intensidades diurnas de luz diferentes. La afinidad de los receptores es muy similar tanto en mitad del día como en mitad de la noche en cada una de las aclimataciones. Los valores de las constantes son:  $K_d = 19,64 \pm 5,38$  pM y  $24,30 \pm 7,73$  pM en mitad de la fotofase y la escotofase, respectivamente, en el grupo aclimatado a 20 lux; y  $23,15 \pm 3,23$  pM y  $15,92 \pm 3,13$  pM a medio día y media noche en el grupo aclimatado a 1300 lux.

#### b) Techo óptico:

En el techo óptico las variaciones día/noche en la densidad máxima de receptores rozan la significación ( $p = 0,039$ ) en el grupo de 20 lux (Figura 15a), con valores de  $22,96 \pm 2,56$  fmol/mg prot durante el día, frente a una densidad de receptores de  $40,43 \pm 2,30$  fmol/mg prot durante la noche. Al igual que sucedía en la retina, la exposición a 1300 lux de intensidad provoca un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) en la densidad máxima de receptores de 2-[ $^{125}$ I]-Mel ( $B_{max} = 55,53 \pm 3,09$  fmol/mg prot) respecto a lo observado a 20 lux de intensidad ( $B_{max} = 22,96 \pm 2,56$  fmol/mg prot). La elevada densidad de receptores a medio día en tencas aclimatadas a 1300 lux se reduce significativamente durante la noche ( $p = 0,003$ ), no existiendo diferencias significativas en la densidad de receptores a media noche entre ambos grupos de tencas.

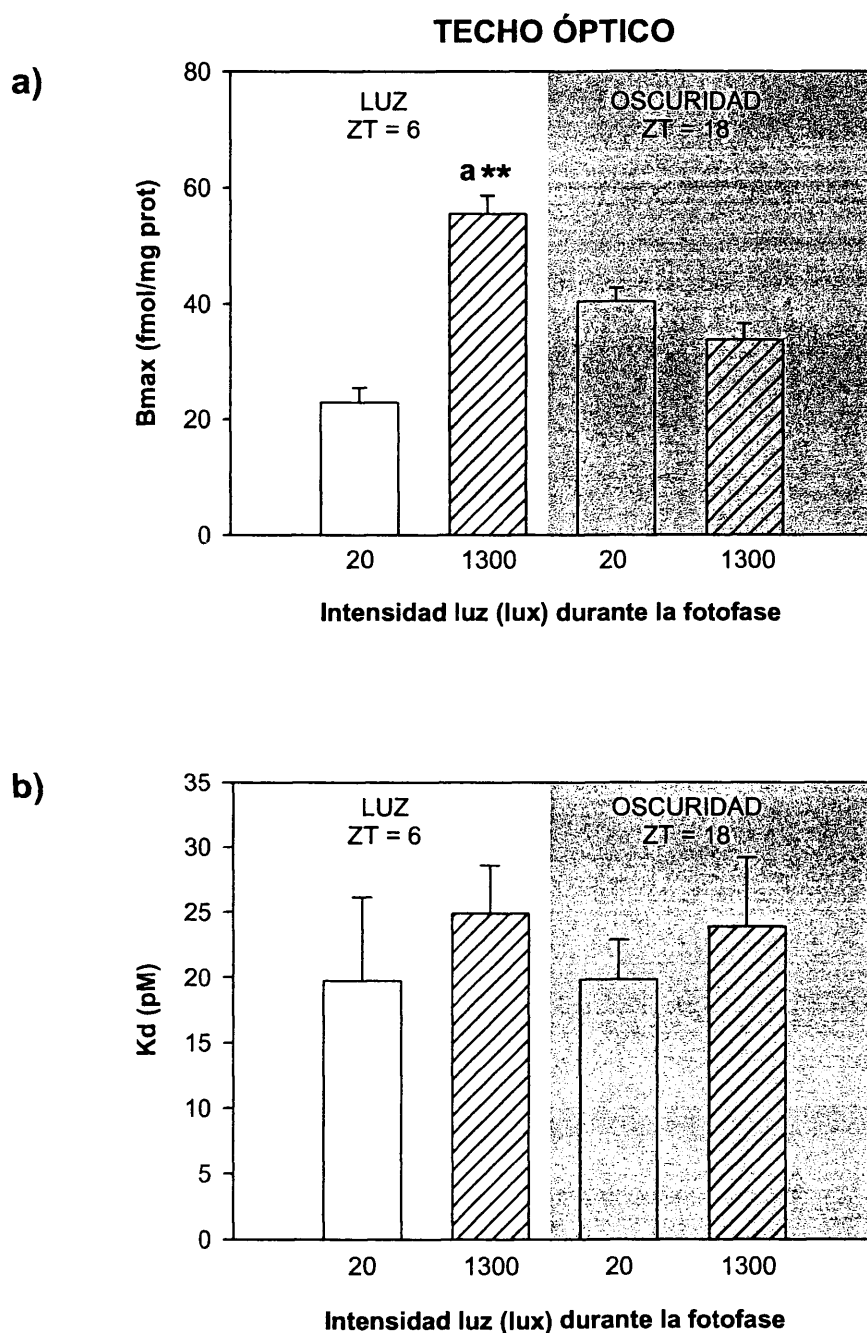
En la Figura 15b, se observa la ausencia de variaciones significativas ( $p = 0,754$ ) en la afinidad de los receptores de 2-[ $^{125}$ I]-Mel en el techo óptico de tencas aclimatadas a las dos intensidades de luz diferentes (20 y 1300 lux). Las afinidades por 2-[ $^{125}$ I]-Mel en ambos grupos fueron muy similares.

En resumen, parece ser que el ritmo día/noche en la densidad de receptores de la retina neural y del techo óptico depende estrechamente de la intensidad luminosa durante el día, ya que con intensidades bajas dicha oscilación desaparece.

### 6.2. Efecto de un pulso de luz de diferentes intensidades en mitad de la escotofase sobre la $K_d$ y la $B_{max}$ .

#### a) Retina neural:

La densidad máxima de receptores de 2-[ $^{125}$ I]-Mel en la retina neural de tencas expuestas durante la noche a un pulso de diferentes intensidades se muestra en la Figura 16a. Como puede observarse, la densidad es más alta ( $p = 0,001$ ) en el grupo sometido a 1 lux de intensidad lumínica, no existiendo diferencias significativas en las densidades en los



**Figura 15. a)** Capacidad máxima de unión y **b)** Valores de la constante de disociación ( $K_d$ ) de los receptores de 2-[ $^{125}$ I]-Mel en el techo óptico de tencas aclimatadas a 20 y 1300 lux de intensidad luminosa. Las muestras se obtuvieron en mitad de las fases luminosa y oscura del fotociclo diario (fondo sombreado). \*\*:  $p < 0,01$  respecto de la fase oscura; a:  $p < 0,01$  respecto de la intensidad luminosa de 20 lux.

tres restantes grupos (0,3; 3 y 1300 lux).

La afinidad de los receptores de melatonina en la retina de la tenca no se modifica significativamente ( $p = 0,22$ ) por la exposición a un pulso de luz de distintas intensidades durante la noche (Figura 16b). Los valores de las constantes de disociación fueron:  $K_d = 8,24 \pm 0,97$ ;  $10,69 \pm 1,05$ ;  $8,37 \pm 0,79$  y  $9,63 \pm 1,12$  pM, para las retinas de peces sometidos a pulsos de luz de intensidad 0,3; 1; 3 y 1300 lux, respectivamente.

#### **b) Techo óptico:**

En la Figura 17, se han representado los resultados obtenidos en el techo óptico. Al igual que sucede en la retina, la densidad de receptores más alta la encontramos en el grupo de tencas sometidas a la exposición luminosa de 1 lux de intensidad (Figura 17a), siendo esta diferencia estadísticamente significativa únicamente cuando se compara con la densidad de receptores en tencas expuestas a 1300 lux de intensidad de luz ( $p = 0,001$ ).

En cuanto a la afinidad (Figura 17b), el grupo de peces que recibió el pulso de mayor intensidad de luz (1300 lux) muestra una afinidad ligeramente superior (valor de la  $K_d$  más bajo) que los restantes grupos, sin embargo esta diferencia sólo resulta estadísticamente significativa ( $p = 0,007$ ) si se compara con el grupo de peces con exposición a 1 lux. Los valores de  $K_d$  observados son  $15,63 \pm 2,96$ ;  $18,76 \pm 2,16$ ;  $17,26 \pm 2,56$  y  $12,07 \pm 1,36$  pM en los grupos de 0,3; 1; 3 y 1300 lux, respectivamente.

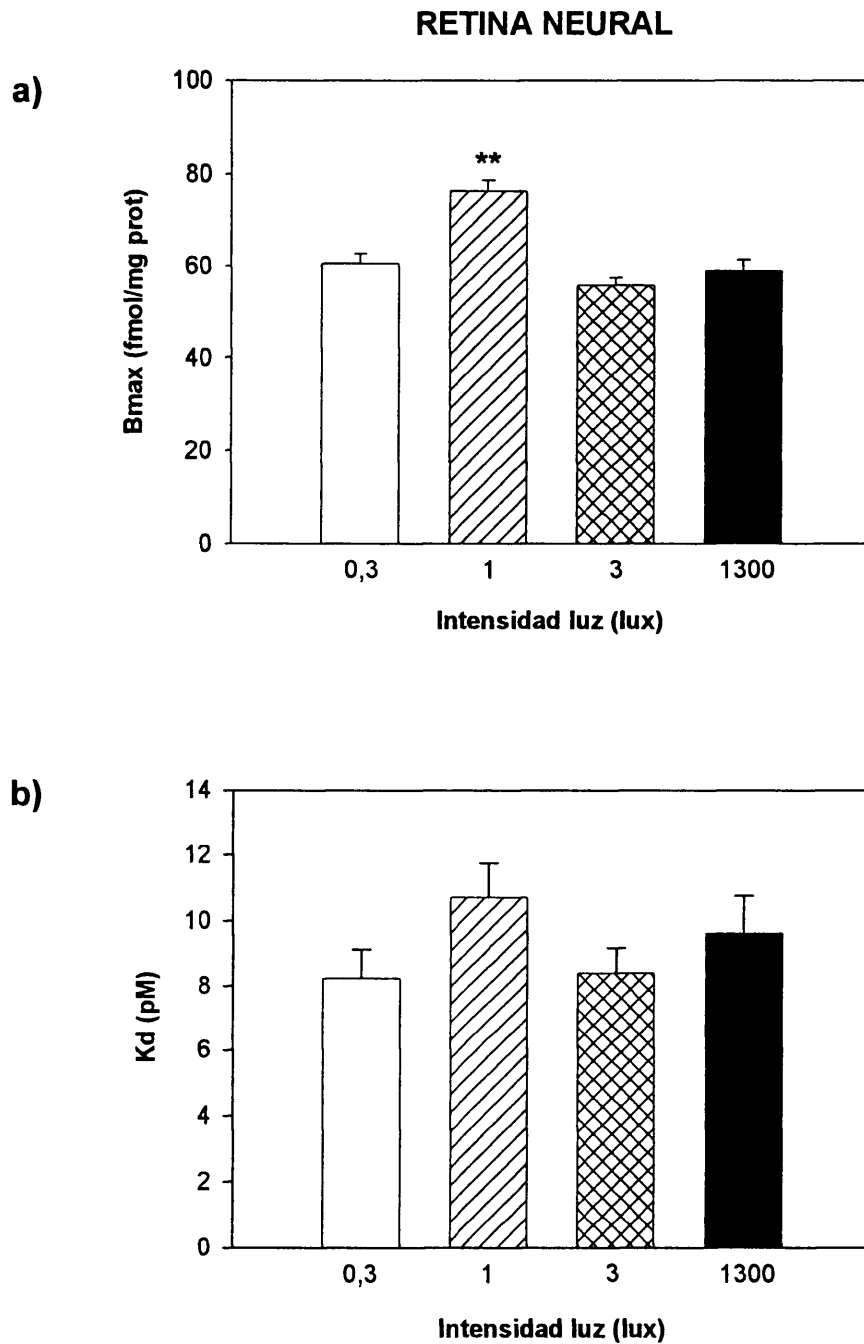
## **7. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE LA UNIÓN DE LA MELATONINA A SU RECEPTOR EN LA TENCA.**

### **7.1. Ensayos de saturación.**

#### **a) Retina neural.**

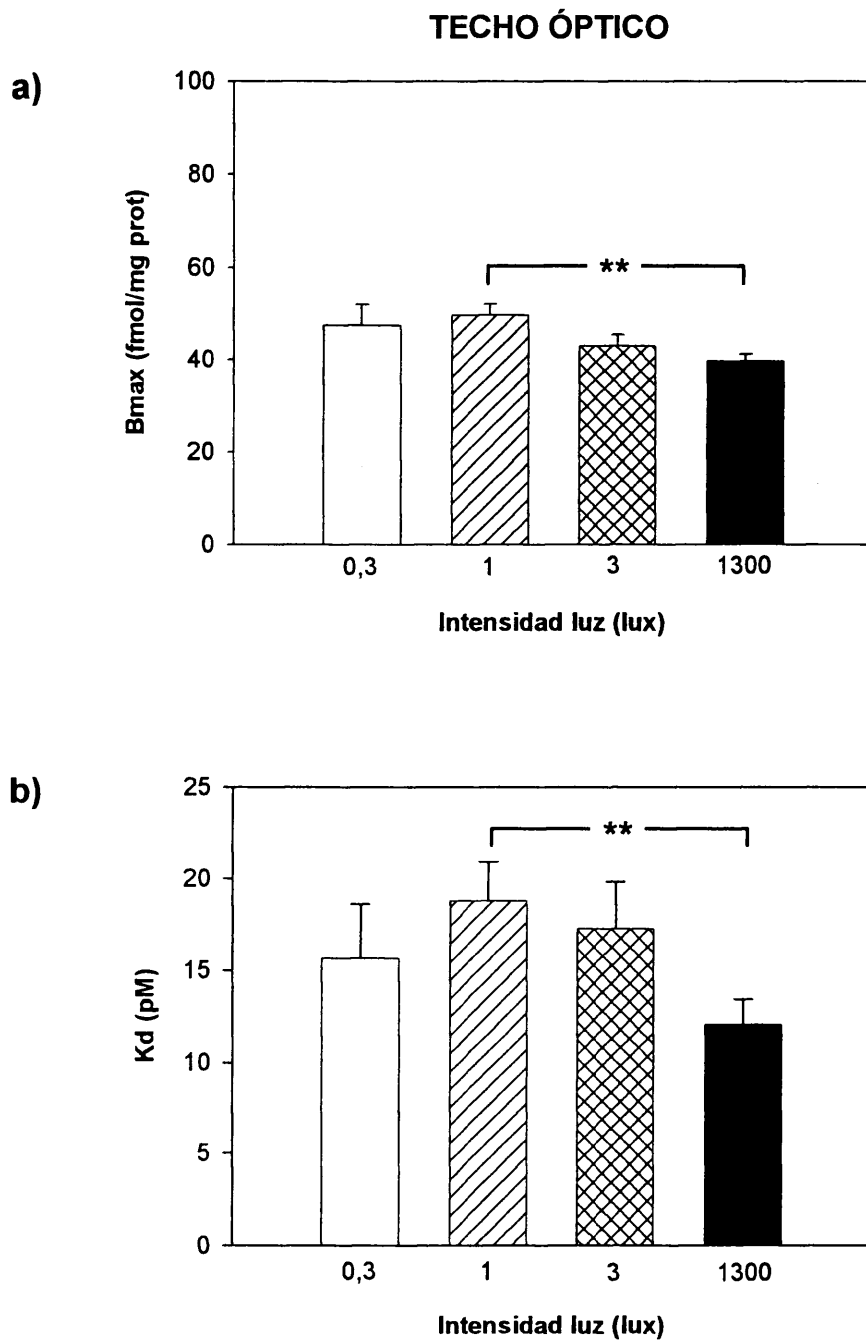
La temperatura del ensayo no afecta significativamente a la afinidad de la unión de melatonina a su receptor en la retina neural de la tenca. No existen diferencias significativas ( $p = 0,211$ ) entre las curvas de saturación realizadas a 15°C, 25°C y 30°C (Fig. 18a, b y c, respectivamente), siendo las constantes de disociación ( $K_d$ )  $22,50 \pm 2,25$ ;  $29,83 \pm 3,58$  y  $27,37 \pm 3,98$  pM para los ensayos realizados a 15°C, 25°C y 30°C, respectivamente.

Sin embargo, la temperatura del ensayo sí afecta a la capacidad de unión de los receptores en la retina neural de la tenca ( $p = 0,003$ ), observándose una  $B_{max}$  menor en los extractos de membranas incubados a una temperatura de ensayo de 30°C ( $B_{max} = 47,43 \pm 3,05$  fmol/mg prot), que es significativamente inferior a la observada en los ensayos realizados a 15°C ( $p = 0,003$ ) y a 25°C ( $p = 0,001$ ).



**Figura 16. a)** Capacidad máxima de unión y **b)** valores de la constante de disociación (Kd) de los receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la retina neural de *T. tinca* tras la exposición en mitad de la escotofase a una hora a luz de diferentes intensidades (0,3; 1; 3 y 1300 lux). Los datos mostrados corresponden al promedio de la estimación  $\pm$  e.e. \*\*  $p < 0,01$  respecto al resto de grupos.





**Figura 17.** a) Capacidad máxima de unión y b) valores de la constante de disociación (Kd) de los receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el techo óptico de *T. tinca* tras la exposición en mitad de la escotofase a una hora a luz de diferentes intensidades (0,3; 1; 3 y 1300 lux) en mitad de la escotofase (n = 7/grupo). Los datos mostrados corresponden al promedio de la estimación  $\pm$  e.e. \*\* p < 0,01.

## RETINA NEURAL

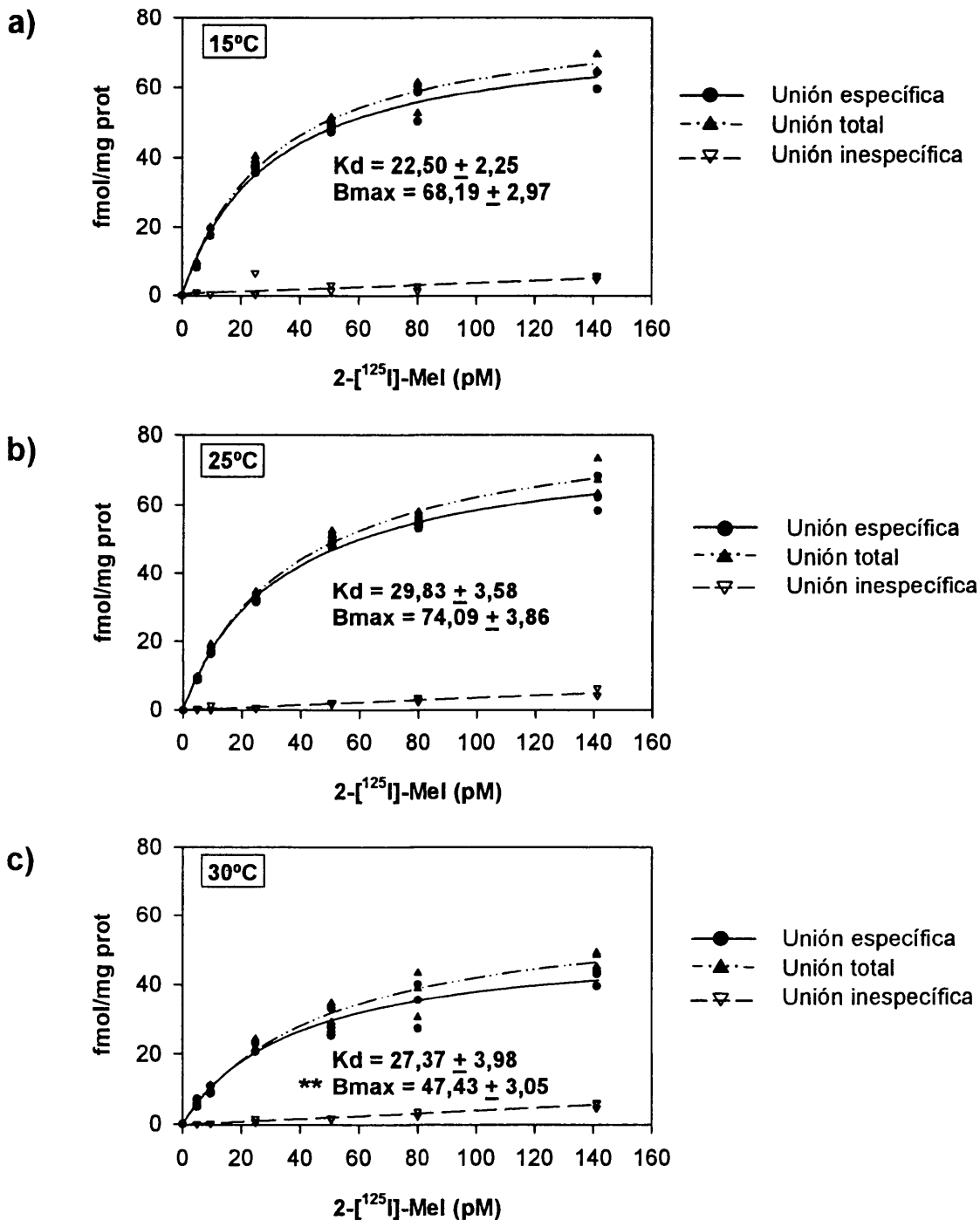


Figura 18. Curvas de saturación de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a sus receptores en la retina de la tenca a tres temperaturas distintas de ensayo: a) 15°C; b) 25°C y c) 30°C. La unión inespecífica se cuantifica por adición de 1 μM de melatonina no marcada. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando. \*\* p < 0,01 respecto a las dos temperaturas restantes.

### **b) Techo óptico.**

Los ensayos de saturación realizados a diferentes temperaturas de incubación con extractos de membranas procedentes del techo óptico de la tenca se presentan en la Figura 19. La temperatura del ensayo tampoco afecta a la afinidad de los receptores del techo óptico de la tenca ( $p = 0,033$ ), al igual que ocurre en la retina neural, siendo las constantes de disociación muy similares,  $26,66 \pm 2,54$  pM;  $K_d = 42,94 \pm 7,15$  pM y  $K_d = 33,01 \pm 5,29$  pM, a  $15^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ , respectivamente.

Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en los ensayos de saturación realizados a diferentes temperaturas en la retina neural de esta especie, la densidad de receptores no se ve afectada por la temperatura del ensayo en extractos de membranas de techo óptico de la tenca ( $p = 0,098$ ). Los valores de  $B_{\text{max}}$  observados son  $59,33 \pm 2,49$ ;  $70,97 \pm 5,47$  y  $64,25 \pm 4,44$  fmol/mg prot, para los ensayos realizados a  $15^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ , respectivamente.

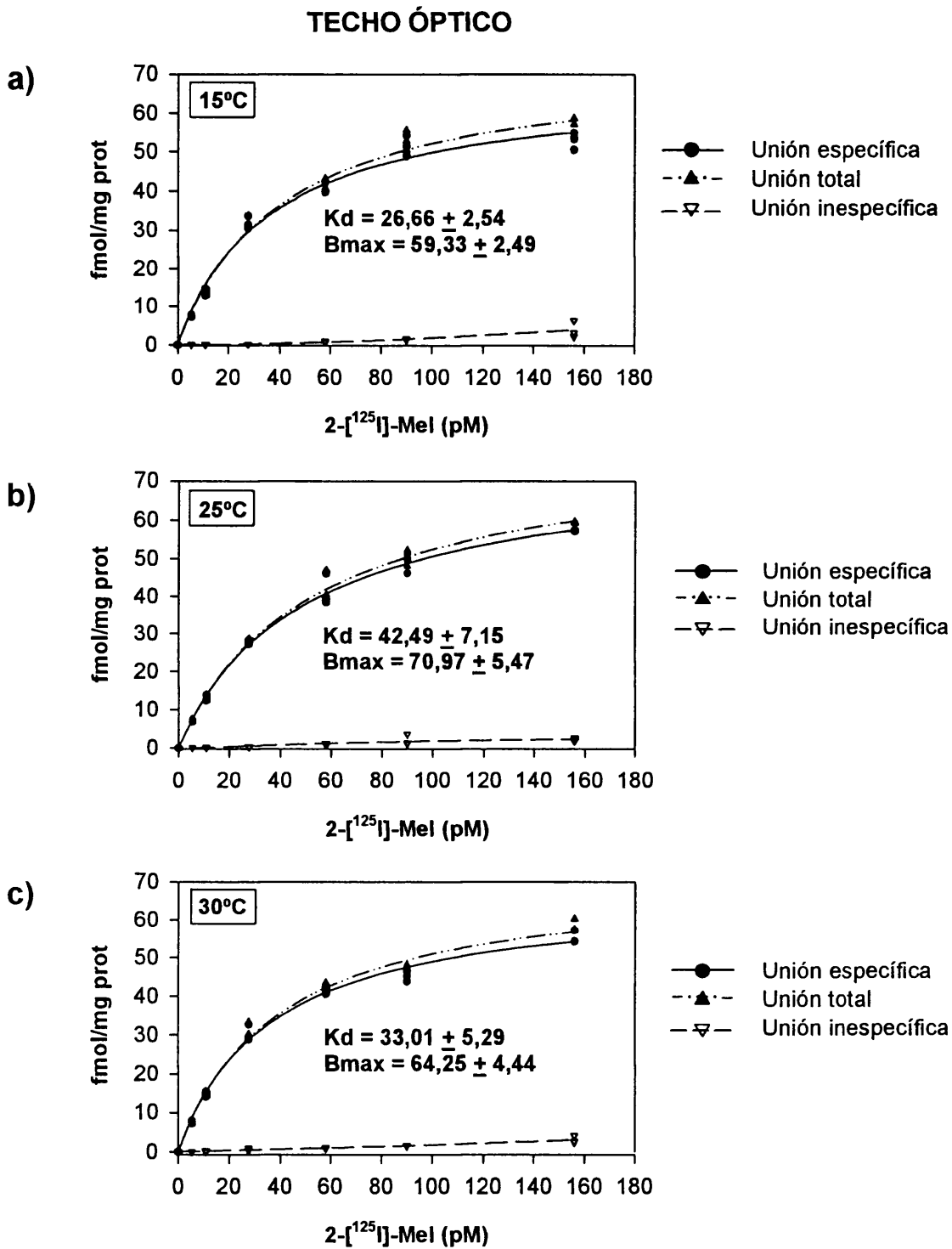
## **7.2. Ensayos cinéticos.**

### **a) Retina neural.**

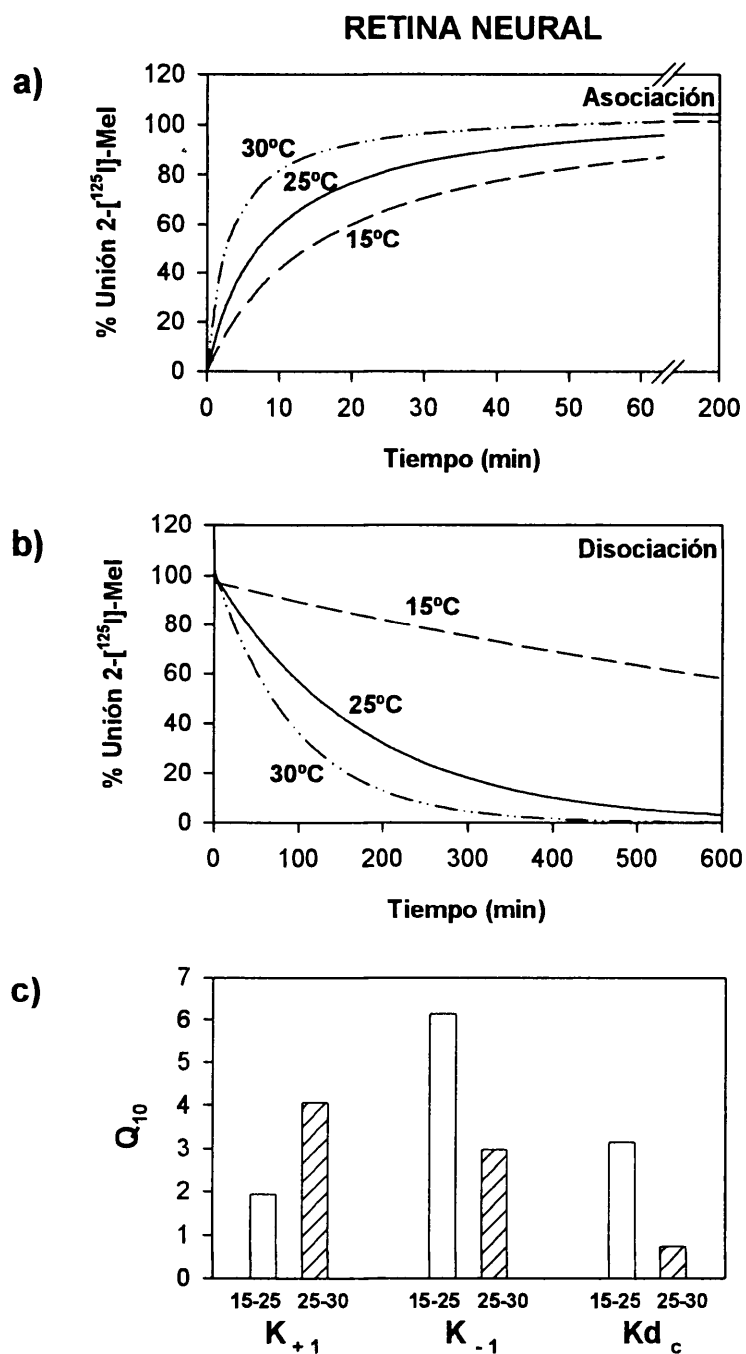
En la Figura 20 se muestran las cinéticas de asociación de 2-[ $^{125}\text{I}$ ]-Mel a sus receptores en la retina de la tenca a tres temperaturas diferentes ( $15^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ ). Se alcanza el equilibrio tras 120 minutos de incubación a  $15^\circ\text{C}$  (Fig. 20a). Para inducir la disociación se añade Mel  $1 \mu\text{M}$  a la solución de membranas en equilibrio, y la unión específica se cuantifica en diferentes intervalos de tiempo (ver apartado 2.4.7.2. de materiales y métodos). De este modo, la disociación completa se produce a las 24 horas de la adición de melatonina  $1 \mu\text{M}$  a  $15^\circ\text{C}$  (Fig. 20b).

Cuando los extractos de membrana de retina neural se incuban a  $25^\circ\text{C}$ , el equilibrio se alcanza en la mitad de tiempo que a  $15^\circ\text{C}$ , es decir 60 minutos (Fig. 20a), que se refleja en un aumento de la tasa de asociación (Tabla 10). Tras la adición de melatonina  $1 \mu\text{M}$ , la disociación completa se produce también a una velocidad mucho mayor de la obtenida a  $15^\circ\text{C}$  (Fig. 20b), siendo el valor de la tasa de disociación a  $25^\circ\text{C}$  aproximadamente 6 veces superior al observado a  $15^\circ\text{C}$  (Tabla 10).

A los 40 minutos de incubación de los extractos de membranas de retina a  $30^\circ\text{C}$  se alcanza el equilibrio (Fig. 20a), tiempo ligeramente inferior al necesitado para  $25^\circ\text{C}$ , lo que se traduce en una duplicación de la tasa de asociación (Tabla 10). La disociación también se produce ligeramente más rápido que en el ensayo realizado a  $25^\circ\text{C}$  (Fig. 20b), aumentando en consecuencia el valor de la tasa de disociación a casi el doble (Tabla 10).



**Figura 19.** Curvas de saturación de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a sus receptores en el techo óptico de *T. tinca* a tres temperaturas distintas de ensayo: a) 15°C; b) 25°C y c) 30°C. La unión inespecífica se cuantifica por adición de 1 μM de melatonina no marcada. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando.



**Figura 20.** Efecto de la temperatura sobre la cinética de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a extractos de membranas de retina neural de *T. tinca*. Las líneas representan: **a)** Asociación a 15°C, 25°C y 30°C y **b)** Disociación a las mismas temperaturas. **c)** Valores de Q<sub>10</sub> para las tasas de asociación, disociación y constante cinética de disociación en los intervalos 15-25°C y 25-30°C.

A partir de los valores medidos de las tasas de asociación y disociación, así como de la constante cinética de disociación, obtenida a partir del cociente entre ambas tasas (Tabla 10), se puede apreciar el potente efecto de la temperatura del ensayo modificando las cinéticas de asociación y disociación en la retina neural de la tenca. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en la asociación se reduce de forma paralela al aumento de la temperatura del ensayo, y en cuanto a la cinética de disociación, se produce la completa disociación de forma más rápida a medida que aumenta la temperatura del ensayo.

**Tabla 10.** Cinéticas de asociación y disociación a distintas temperaturas de ensayo en extractos de membrana de retina neural de la tenca.

	15°C	25°C	30°C
$K_{+1}$ ( $10^{-3} \times \text{pM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$0,371 \pm 0,029$	$0,718 \pm 0,045$	$1,446 \pm 0,102$
$K_{-1}$ ( $10^{-3} \times \text{min}^{-1}$ )	$0,860 \pm 0,068$	$5,261 \pm 0,328$	$9,075 \pm 1,153$
$Kd_{\text{cinética}}$ (pM)	2,32	7,32	6,27

Las tasas de asociación ( $K_{+1}$ ) y disociación ( $K_{-1}$ ) se han calculado mediante una regresión no lineal, asumiendo un aumento exponencial hasta un máximo de pseudo primer orden para la  $K_{+1}$ , así como una caída exponencial de primer orden para la  $K_{-1}$ . La  $Kd$  obtenida a partir de los estudios cinéticos se calcula a partir del cociente entre ambas constantes ( $Kd = K_{-1} / K_{+1}$ ).

Los coeficientes de temperatura ( $Q_{10}$ ) para las tasas de asociación y disociación y para la constante cinética de disociación se muestran en la Figura 20c. En el caso de la tasa de asociación, los valores en ambos intervalos: 15-25 y 25-30, son siempre superiores a 1, indicando un aumento en la sensibilidad térmica. Para la tasa de disociación, se observan diferencias entre los dos intervalos de temperatura estudiados. La  $Q_{10}$  es bastante superior (6,12) en el intervalo 15-25°C que en el intervalo 25-30°C (2,97), lo que revela un descenso de la sensibilidad térmica en las cinéticas de disociación cuando aumenta la temperatura del ensayo por encima de 25°C. Los valores de  $Q_{10}$  para la constante cinética de disociación indican un descenso de la sensibilidad térmica en el intervalo de 25-30°C, ya que el valor es inferior a 1 (0,73), mientras que en el intervalo de 15-25°C es superior a 1 (3,15), mostrando una elevada sensibilidad térmica a esta temperatura, que está determinada por la alta sensibilidad de la tasa de disociación.

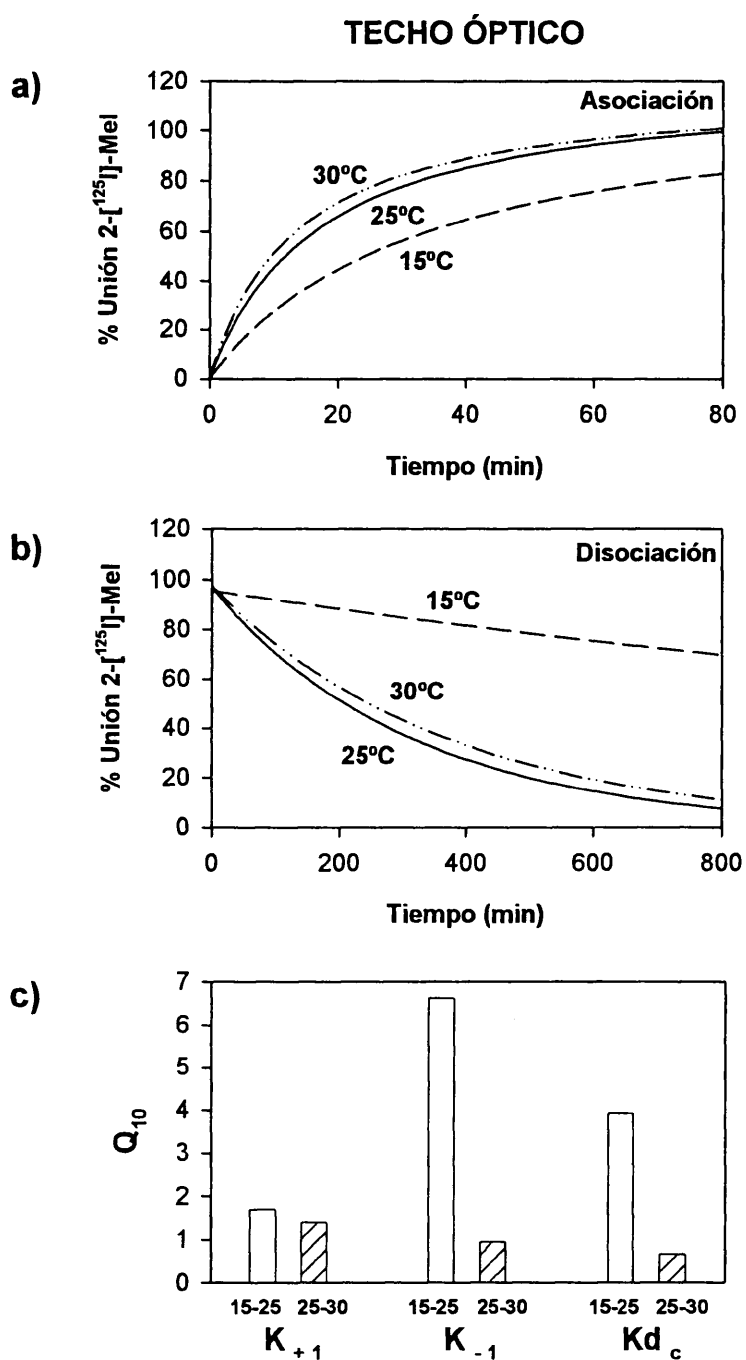
**b) Techo óptico.**

En la Figura 21 se muestran las cinéticas de asociación y disociación de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en extractos de membranas de techo óptico de la tenca a las mismas temperaturas que en la retina neural. A 15°C se alcanza el equilibrio tras 120 minutos de incubación (Fig. 21a). La disociación a 15°C se produce muy lentamente, de modo que se requieren 28 horas para lograr una disociación completa (Fig. 21b).

A una temperatura de 25°C, el equilibrio se alcanza en la mitad de tiempo que a 15°C (60 minutos) (Fig. 21a), lo que se traduce en un aumento de la tasa de asociación de casi el doble que a 15°C (Tabla 11). La disociación completa se produce 14 horas después de la adición de melatonina 1 µM (Fig. 21b), el doble de rápido que a 15°C, aumentando el valor de la tasa de disociación (Tabla 11). No obstante en el techo óptico la disociación parece ligeramente más lenta que en la retina neural a cualquier temperatura.

Temperaturas de incubación superiores provocan un aumento en la velocidad de la asociación. Así, a 30°C (Fig 21a), se llega al equilibrio tras 40 minutos de incubación, tiempo inferior al requerido en los ensayos a 25°C y muy por debajo del necesario para llegar al equilibrio cuando se incubaba a 15°C. A diferencia de lo que ocurre en el caso de la retina neural, donde también la velocidad de la disociación aumenta con la temperatura, la cinética de disociación en el techo óptico no se ve afectada por un aumento de la temperatura de incubación de 25°C a 30°C (Fig. 21b), lo que se refleja en valores similares de las tasas de disociación medidas a ambas temperaturas (Tabla 11).

Los coeficientes de temperatura ( $Q_{10}$ ) para las tasas de asociación y disociación, y la constante cinética de disociación se han representado en la Figura 21c. En la asociación, los valores de  $Q_{10}$  son siempre superiores a 1, indicándonos un incremento de la sensibilidad térmica de los procesos de asociación en este tejido. El valor del coeficiente de temperaturas es 1,69 en el intervalo 15-25°C, y desciende ligeramente en el intervalo 25-30°C (1,40). A diferencia de lo que ocurre en la retina neural, en el techo óptico la cinética de asociación no cambia cuando aumenta la temperatura del ensayo de 25°C a 30°C. En la tasa de disociación existen diferencias entre los dos intervalos de temperatura estudiados. A pesar de que existe una marcada sensibilidad térmica, el valor de la  $Q_{10}$  observado en el intervalo 15-25°C es bastante elevado (6,62) pero desciende abruptamente en el intervalo 25-30°C (0,93). Estos valores son similares a los observados en la retina neural. La  $Q_{10}$  para la constante de disociación cinética muestra un descenso de la sensibilidad térmica en el intervalo 25-30°C, ya que el valor es inferior a 1 (0,66), mientras que en el intervalo 15-25°C el valor de la  $Q_{10}$  es superior a 1 (3,92), indicando una elevada sensibilidad térmica, como ocurre en la retina neural.



**Figura 21.** Efecto de la temperatura sobre la cinética de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina a extractos de membrana de techo óptico de *T. tinca*. Las líneas representan: **a)** Asociación a 15°C, 25°C y 30°C y **b)** Disociación a las mismas temperaturas. **c)** Valores de Q<sub>10</sub> para las tasas de asociación, disociación y constante cinética de disociación en los intervalos 15-25°C y 25-30°C.



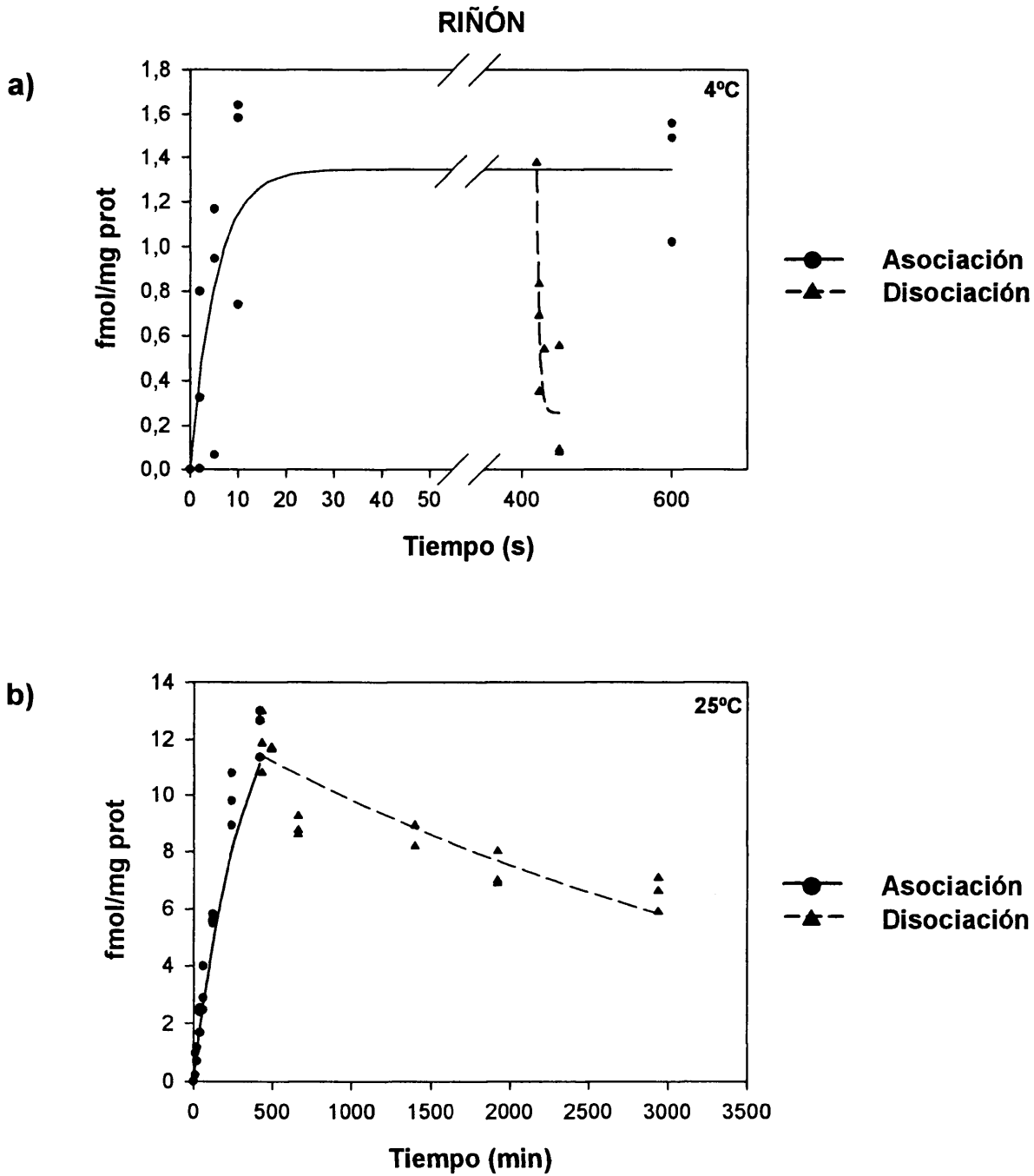
**Tabla 11.** Cinéticas de asociación y disociación a distintas temperaturas de ensayo en extractos de membrana del techo óptico de la tenca (*T. tinca*).

	15°C	25°C	30°C
$K_{+1}$ ( $10^{-3} \times \text{pM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$0,214 \pm 0,027$	$0,363 \pm 0,022$	$0,446 \pm 0,074$
$K_{-1}$ ( $10^{-3} \times \text{min}^{-1}$ )	$0,446 \pm 0,074$	$2,954 \pm 0,249$	$2,751 \pm 0,271$
$Kd_{\text{cinética}}$ (pM)	2,08	8,15	5,41

Las tasas de asociación ( $K_{+1}$ ) y disociación ( $K_{-1}$ ) se han calculado mediante una regresión no lineal, asumiendo un aumento exponencial hasta un máximo de pseudo primer orden para la  $K_{+1}$ , así como una caída exponencial de primer orden para la  $K_{-1}$ . La  $Kd$  obtenida a partir de los estudios cinéticos se calcula a partir del cociente entre ambas constantes ( $Kd = K_{-1}/K_{+1}$ ).

### c) Riñón.

En la Figura 22 mostramos cómo las cinéticas de asociación y disociación de la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el riñón de la tenca son mucho más rápidas que en la retina neural y en el techo óptico. Las cinéticas de asociación de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a extractos de membrana del riñón de *Tinca tinca* se han realizado únicamente a dos temperaturas, 4°C y 25°C. Los valores de las tasas de asociación y disociación, y de la constante cinética de disociación a 4°C, se muestran en la Tabla 12. Se alcanza el equilibrio a los 10 segundos de incubación de los extractos de membranas a 4°C (Fig. 22a), y la disociación completa se logra a los 100 segundos de la adición de la NAS 10  $\mu\text{M}$ . Como observamos en la Figura 22b, a 25°C el equilibrio en la asociación no se alcanza ni tras 500 minutos de incubación. De forma similar, aunque se prolongó el tiempo de disociación hasta los 2500 minutos, tampoco se logra la disociación completa tras la adición de NAS 10  $\mu\text{M}$ , por lo que no fue posible calcular las tasas de asociación y disociación a esta temperatura.



**Figura 22.** Efecto de la temperatura sobre la cinética de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a extractos de membrana del riñón de *T. tinca*. a) 4°C y b) 25°C. Cada punto representa valores individuales de unión de radioligando. Las tasas de asociación ( $K_{+1}$ ) y disociación ( $K_{-1}$ ) se calculan mediante una regresión no lineal, asumiendo un aumento exponencial hasta un máximo de pseudo primer orden para la  $K_{+1}$ , y una caída exponencial de primer orden para la  $K_{-1}$ .

**Tabla 12.** Cinéticas de asociación y disociación a distintas temperaturas de ensayo en extractos de membrana de riñón de *Tinca tinca*.

	4°C	25°C
$K_{+1}$ ( $10^{-3} \times \text{pM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	43,02 $\pm$ 13,32	No se alcanza el equilibrio (> 500 min)
$K_{-1}$ ( $10^{-3} \times \text{min}^{-1}$ )	4027,86 $\pm$ 1560,96	No se alcanza el equilibrio (> 2500 min)
$K_{d_{\text{cinética}}}$ (pM)	93,6	-

Las tasas de asociación ( $K_{+1}$ ) y disociación ( $K_{-1}$ ) se han calculado mediante una regresión no lineal, asumiendo un aumento exponencial hasta un máximo de pseudo primer orden para la  $K_{+1}$ , así como una caída exponencial de primer orden para la  $K_{-1}$ . La  $K_d$  obtenida a partir de los estudios cinéticos se calcula a partir del cociente entre ambas constantes ( $K_d = K_{-1}/K_{+1}$ ).

## **V. DISCUSIÓN**

## 1. DISTRIBUCIÓN Y DENSIDADES RELATIVAS DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE *Tinca tinca*:

Los estudios de localización y caracterización de receptores de melatonina en el cerebro de los peces se limitan a un número muy reducido de especies. Por este motivo, y debido al interés de nuestro grupo de investigación en la tenca como animal de experimentación, nuestro primer objetivo ha sido determinar y cuantificar la presencia de receptores de melatonina en esta especie. Nuestros resultados muestran, por primera vez en el teleósteo *Tinca tinca* la existencia de una elevada densidad de receptores en un área del sistema nervioso central implicada en funciones visuales, como es el techo óptico, y en tejidos oculares, la retina neural, el epitelio pigmentado y el iris. Existen sitios de unión de melatonina en otras áreas encefálicas, como el telencéfalo, el diencefalo y el rombencéfalo, pero su densidad es mucho menor.

El patrón de distribución de los receptores de melatonina ha sido estudiado en varias clases de vertebrados, encontrándose una gran variabilidad filogenética, si bien ciertas localizaciones se conservan. Por ejemplo, en los mamíferos, la *pars tuberalis* hipofisaria y el núcleo supraquiasmático hipotalámico son las regiones de mayor densidad y las más estudiadas, no obstante sitios de unión para melatonina se han encontrado distribuidos en distintas localizaciones encefálicas, pero en mucha menor densidad (véase la sección de introducción de la presente Memoria). El número de estudios realizados en vertebrados no mamíferos es notablemente inferior, si bien los resultados publicados señalan una localización abundante de receptores de melatonina en estructuras encefálicas que reciben inervación desde la retina (hipotálamo, tálamo y mesencéfalo), estructuras auditivas y del sistema límbico.

Nuestros resultados en la tenca coinciden, en gran medida, con estudios previos realizados en otros peces. En *Salmo salar* (Ekström y Vanecek, 1992), *Oncorhynchus mykiss* (Davies *et al.*, 1994; Mazurais *et al.*, 1999), *Carassius auratus* (Iigo *et al.*, 1994b), *Silurus asotus* (Iigo *et al.*, 1997b), *Petromyzon marinus*, *Raja erinacea* (Vernadakis *et al.*, 1998) y en *Dicentrarchus labrax* (Bayarri *et al.*, 2004a) las regiones de techo óptico-tálamo y áreas preópticas son las que muestran mayores densidades. Todos estos resultados corroboran el papel desempeñado por la melatonina en relación con estructuras encefálicas relacionadas con funciones visuales, especialmente en los vertebrados no mamíferos. No obstante, la presencia de sitios de unión de melatonina en otras áreas encefálicas, como el telencéfalo, el diencefalo y el rombencéfalo confirma la amplia distribución de sitios de unión de melatonina en el cerebro de los teleósteos, a diferencia de la distribución restringida de sitios de unión de melatonina en el cerebro de los mamíferos. Además, enfatiza la

importancia de la melatonina en el ajuste de diferentes funciones rítmicas, circadianas y/o estacionales controladas por dichas regiones cerebrales.

La capacidad máxima de unión de los receptores de melatonina es variable dependiendo de las especies de peces, encontrándose los valores más bajos en los preparaciones de membranas de encéfalo del carpín (Iigo *et al.*, 2003b), con valores máximos que rondan los 7 fmol/mg prot y en *Oncorhynchus masou*, con 15 fmol/mg prot (Amano *et al.*, 2003a). Cifras medias, próximas a los 35 fmol/mg prot se han publicado para *Esox lucius* (Gaildrat *et al.*, 1998), y valores mucho más elevados en *Sparus aurata*, especie en la que oscilan entre los 110 y los 200 fmol/mg prot (Falcón *et al.*, 1996b). No obstante, todos estos datos se refieren al encéfalo completo, sin determinar diferencias de densidad entre distintas regiones cerebrales, a diferencia de lo que nosotros presentamos para la tenca. El único trabajo existente en la bibliografía referido a densidades en regiones encefálicas concretas ha sido realizado en la lubina (Bayarri *et al.*, 2004a), en el que las densidades encontradas en las distintas áreas son muy similares a las de la tenca, siendo el techo óptico la región encefálica que presenta la mayor capacidad de unión, con valores alrededor de 70 fmol/mg prot, ligeramente superiores a los que nosotros describimos en la tenca.

Junto al techo óptico, la retina neural es, en la tenca, el tejido que muestra la capacidad de unión más elevada. Hasta la fecha los únicos estudios que han determinado densidades en la retina de peces son los realizados en el carpín (Iigo *et al.*, 1997c) y en la lubina (Bayarri *et al.*, 2004b), siendo los valores de esta última especie muy similares a los medidos en la tenca. Mediante técnicas de hibridación *in situ*, se ha podido demostrar la expresión de receptores de melatonina en la retina de *Xenopus laevis*, confirmando el importante papel de la melatonina en la fisiología retiniana (Wiechmann y Smith, 2001). Además, en nuestro estudio hemos analizado otros tejidos oculares aparte de la retina neural, como son el iris y el epitelio pigmentado, hallándose también densidades elevadas (20-30 fmol/mg prot), sugiriendo posibles acciones adicionales de la melatonina en otros tejidos oculares además de en la retina.

Comparando los datos obtenidos en la tenca referentes al diencéfalo con lo descrito en el hipotálamo de la lubina, observamos que las densidades de la tenca son alrededor de 2-3 fmol/mg prot, mientras que en la lubina son del orden de 40 fmol/mg prot (Bayarri *et al.*, 2004a), valores muy superiores y de un orden de magnitud similar al encontrado en el techo óptico de la tenca. Aunque no contienen exactamente el mismo tejido neural (diencéfalo versus hipotálamo), resulta llamativa esta gran diferencia en la densidad entre ambas especies. Los receptores en la lubina tienen una distribución similar a la de *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004a), con elevadas densidades en hipotálamo-diencéfalo, pero este patrón

es notablemente distinto al de la tenca, en la que la región diencefálica es pobre en receptores de melatonina. Esta diferencia entre especies en la distribución central de receptores de melatonina probablemente tenga un significado funcional, que en la actualidad aún es desconocido.

Teniendo presente la función clásica y profundamente estudiada de la melatonina como reguladora de los ritmos reproductores en los mamíferos, se han realizado importantes esfuerzos dirigidos a localizar receptores de melatonina en la hipófisis. En la rata, algunos estudios confirman su existencia en las células gonadotropas adenohipofisarias (Morgan *et al.*, 1992, 1995; Vanecek y Klein, 1992a, 1995; Vanecek, 1995; Sumova y Vanecek, 1997; Zemkova y Vanecek, 1997), sugiriendo un control de la indolamina sobre el eje reproductor gonadal, a nivel hipofisario. En los peces, únicamente en el lucio (*Esox lucius*) se ha descrito la presencia de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la hipófisis (Gaildrat y Falcón, 1999, 2000). En nuestras condiciones experimentales no parece haber una unión específica significativa de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la hipófisis de la tenca. Este resultado negativo podría deberse al uso de preparaciones con una cantidad de tejido insignificante, por lo que sería necesario realizar ensayos de unión en preparaciones aún más concentradas que las empleadas por nosotros (10 hipófisis/100 µl) con el fin de descartar esta posibilidad. No obstante, consideramos que aunque se lograra detectar unión en estas preparaciones, la densidad sería en todo caso muy baja.

El número de estudios realizados para localizar sitios de unión de melatonina en tejidos periféricos es muy inferior al existente para el sistema nervioso central. De forma general se han localizado sitios de unión con características de receptores tipo MT<sub>1</sub> en lugares relacionados con el sistema circulatorio de mamíferos y aves (Erçahin *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 1996), órganos inmunes (Niles, 1989; Viswanathan *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1991; Pang y Pang, 1992) en el sistema reproductor (Zhao *et al.*, 2002) y en el tracto gastrointestinal (Poon *et al.*, 1997, 2002). Receptores del tipo MT<sub>2</sub> se han descrito en el riñón, en el ovario, en la circulación coronaria y en varias líneas celulares tumorales (Li y Witt-Enderby, 2000; Masana y Dubocovich, 2001; Von Gall *et al.*, 2002). Una distribución mucho más amplia en el organismo se ha mostrado para el subtipo MT<sub>3</sub>, que se expresa en tejidos tan dispares como el hígado, el riñón, el corazón, el tejido adiposo pardo, el músculo esquelético, el pulmón, el intestino, el testículo o el bazo (Stankov *et al.*, 1993; Nosjean *et al.*, 2001). Los melanóforos dérmicos de los anfibios han sido la diana clásica para las acciones de la melatonina, por lo que representan una herramienta idónea para el estudio de sus receptores, y de hecho la primera clonación fue posible a partir de líneas celulares inmortalizadas derivadas de cultivos primarios de melanóforos dérmicos de *Xenopus* (Ebisawa *et al.*, 1994).

La bibliografía referente a la caracterización de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en los tejidos periféricos de los peces es prácticamente inexistente, tan solo se ha publicado un trabajo realizado por Pang y colaboradores (1994c) en el corazón de salmónidos. Por este motivo consideramos que una contribución principal de esta Memoria es precisamente el estudio de la distribución y posterior caracterización de los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en tejidos periféricos de los peces.

De todos los tejidos periféricos estudiados en la tenca, las branquias, el corazón, el riñón y el intestino anterior son los que presentan las mayores densidades de sitios de unión por el radioligando. Esta localización de sitios de unión de melatonina en órganos clave para múltiples funciones no necesariamente vinculadas con la información fotoperiódica ambiental, plantea la consideración de una multiplicidad de funciones de la melatonina en los peces, como el control de la presión y la circulación sanguínea, el equilibrio hídrico-salino y la regulación de la ingestión-digestión del alimento. En este sentido la elevada capacidad de unión encontrada en el corazón de la tenca podría estar indicando que la melatonina está implicada en el funcionamiento del sistema circulatorio en los peces. Aparte de los estudios realizados en los mamíferos, en los que se describen acciones hipotensoras de la melatonina (Viswanathan *et al.*, 1993), existe un trabajo en el bacalao (*Gadus morhua*) en el que se sugieren alteraciones inducidas por la melatonina en los cambios de presión sanguínea producidos por arginina vasotocina (Kulczykowska, 1998). Necesariamente, es importante investigar esta posible funcionalidad de la melatonina, u otras relacionadas con la fisiología cardiovascular de los teleósteos, de cuyo conocimiento existen importantes lagunas.

En los peces, los órganos osmorreguladores más importantes son, en este orden, las branquias, el tubo digestivo y el riñón. En estas tres localizaciones hayamos una densidad relativamente relevante de sitios de unión de alta afinidad de melatonina en la tenca. La presencia de sitios de unión de melatonina en el riñón de varias especies de aves y mamíferos, incluyendo humanos, ha sugerido la posibilidad de acciones directas de la melatonina en el sistema renal (Song *et al.*, 1996a, b). En un estudio reciente en el que se revisan posibles acciones de la melatonina en la osmorregulación, se plantea que las relaciones entre esta hormona y los sistemas reguladores del balance de fluidos en las aves y los mamíferos son complejas y probablemente excedan a una simple acción directa de la melatonina sobre el riñón (Kulczykowska, 2002). Esta autora muestra, en esta misma revisión, datos preliminares de una primera aproximación a la existencia de sitios de unión de melatonina de alta afinidad en el riñón de *Oncorhynchus mykiss* y *Platichthys flesus*.

Las branquias son el principal lugar para el transporte activo de iones responsable de la homeostasis de electrolitos en los teleósteos, y en cuyas células de cloruro se localiza



una intensa actividad ATPásica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependiente, enzima clave para el control iónico-osmótico. Aunque no existen estudios de posibles acciones de la melatonina en la osmorregulación de los peces, resulta interesante la observación de cambios estacionales de la actividad de dicha ATPasa branquial en un salmónido (*Salvelinus alpinus*, Staurnes, 1993). Nuestro hallazgo de una significativa capacidad de unión de melatonina (alrededor de 3 fmol/mg prot) en las branquias estimula a investigar en profundidad el significado funcional de estos sitios de unión *in vivo*, estableciendo un punto de vista comparativo entre modelos de teleósteos dulceacuícolas y marinos, y especialmente en especies migratorias que demandan ajustes osmorreguladores importantes, con el fin de obtener una información lo más completa posible de la hipotética función de la melatonina en la regulación hídrico-salina.

En estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación describimos un efecto inhibitor del apetito por la melatonina exógena en el carpín, no tratándose de una acción central, sino periférica (Pinillos *et al.*, 2001). Los sitios de unión de melatonina que hemos encontrado en el tracto gastrointestinal podrían estar mediando dicha acción. De hecho, se ha detectado melatonina por radioinmunoensayo en distintos segmentos del tracto gastrointestinal de varios peces (Bubenik y Pang, 1997), aunque se cuestiona si se trata verdaderamente de una síntesis local, con lo que estaríamos ante posibles acciones paracrinas y/o autocrinas de la indolamina, o más bien de una acumulación de la melatonina circulante de origen pineal u ocular. Hasta la fecha no conocemos bien las posibles funciones de la melatonina en el tracto gastrointestinal, pero se han publicado indicios muy sólidos que apuntan a un papel relevante de esta hormona en la función gastrointestinal.

Teniendo en cuenta los altos valores de unión específica obtenidos en nuestras condiciones de ensayo, y la baja unión inespecífica que presentan el corazón y el riñón, elegimos ambos órganos como prototipo de dianas periféricas de melatonina en la tenca y en ellos se abordan los estudios posteriores cuyos resultados se presentan en esta Tesis Doctoral. Como modelos de tejidos centrales, y por razones similares, utilizamos la retina neural y el techo óptico.

## **2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE *Tinca tinca*:**

### **2.1. Tejidos centrales:**

Los resultados obtenidos en el presente estudio en el teleósteo *Tinca tinca* revelan la existencia de un tipo homogéneo de sitio de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina en la retina neural de esta especie, que cumple con los criterios requeridos para ser considerado un verdadero receptor: la unión del ligando es rápida, estable, saturable, reversible y de alta especificidad

(es inhibida por compuestos estructuralmente relacionados). Además, su densidad ( $B_{\max} = 48,1 \pm 0,9$  fmol/mg prot) así como su elevada afinidad ( $K_d = 17,2 \pm 1,2$  pM) por la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel parecen indicar que el receptor presente en las preparaciones de membranas de la retina neural de la tenca corresponde con un subtipo de receptor perteneciente a la subfamilia de receptores Mel-1 (o MT<sub>1</sub>). Resultados muy similares se han obtenido en el iris y en el epitelio pigmentado, con densidades que rondan los 20 fmol/mg prot y afinidades de alrededor de 20 pM. Existen dos estudios anteriores que analizan sitios de unión en la retina de peces (Iigo *et al.*, 1997c en el carpín; Bayarri *et al.*, 2004b en la lubina). En éste último estudio, realizado en colaboración con nuestro grupo de investigación, el subtipo de receptor caracterizado es muy similar al encontrado en la tenca ( $B_{\max} = 55,6$  fmol/mg prot y  $K_d = 22,1$  pM), lo que parece indicar una conservación del tipo de receptor de melatonina presente en la retina de distintas especies de teleósteos.

La linealidad de la representación de Scatchard y las curvas de inhibición monofásicas nos confirman que tanto en la retina neural como en el iris de la tenca existe una población homogénea de receptores. Este receptor de elevada afinidad por la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel también se encuentra presente en la retina de otros poiquiloterms, como en *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004a), con valores de  $K_d = 12,9$  pM, aunque las densidades son significativamente menores, encontrándose valores de 4,7 fmol/mg prot. En otras especies de anfibios, como *Rana pipiens*, se han publicado afinidades menores (125 pM; Wiechmann and Wirsig-Wiechmann, 1991), si bien estos ensayos se realizaron a temperatura baja (4°C) y con una metodología distinta, autorradiografía cuantitativa frente a nuestros ensayos de unión a radioligando, que pueden justificar estas diferencias.

En el techo óptico, al igual que ocurre en la retina neural de la tenca, nuestros resultados muestran la existencia de un único tipo de sitio de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel, que además cumple con todos los criterios mencionados para la retina neural, y requeridos para ser considerado un verdadero receptor. Las preparaciones de membranas de techo óptico presentan una capacidad de unión ligeramente más baja ( $B_{\max} = 33,8 \pm 0,7$  fmol/mg prot) y una afinidad ligeramente inferior ( $K_d = 22,3 \pm 1,6$  pM) a las de la retina, aunque encuadran perfectamente dentro del grupo de receptores de elevada afinidad por la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. Por tanto, el receptor presente en las preparaciones de membranas del techo óptico de la tenca se corresponde con un único subtipo de receptores perteneciente a la familia de receptores Mel-1 (o MT<sub>1</sub>). Este mismo subtipo se ha descrito previamente en homogeneizados de cerebro completo de otras especies de teleósteos, como el carpín (*Carassius auratus*,  $K_d \approx 30$  pM; Iigo *et al.*, 1994b), el lucio (*Esox lucius*,  $K_d$  100-300 pM; Gaildrat *et al.*, 1998), el pez gato (*Silurus asotus*,  $K_d$  30 pM, Iigo *et al.*, 1997b) y algunos salmónidos, como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*,  $K_d$  50 pM, Davies *et al.*, 1994), y el salmón masou

(*Oncorhynchus masou*, Kd 4-7 pM, Amano *et al.*, 2003a). El único estudio en teleóteos que caracteriza los sitios de unión en áreas encefálicas concretas, como el presente en la tenca, se ha realizado en la lubina (Bayarri *et al.* 2004b), encontrando valores de densidades y afinidades similares a las halladas en las distintas regiones cerebrales de la tenca. Estudios realizados por nuestro equipo de investigación en el techo óptico del anfibio *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004a) muestran una capacidad de unión menor ( $B_{max} = 6,6$  fmol/mg prot), pero con una afinidad ( $K_d = 10,5$  pM) muy similar a la descrita en el techo óptico de la tenca.

Esta elevada afinidad (del orden picomolar) con variaciones de pequeña magnitud entre especies sugiere que todas estas poblaciones de receptores pertenecen a una misma familia, que es la de los receptores de melatonina de alta afinidad ( $MT_1$ ). Afinidades en otro orden de magnitud, por ejemplo nanomolar, estarían indicando que dichos sitios de unión podrían pertenecer a otra familia diferente de receptores, de baja afinidad, lo que no ocurre en ninguno de los dos tejidos centrales estudiados en la tenca. Por el contrario, las densidades relativas de sitios de unión son más variables (entre 7 y 50 fmol/mg prot), llegando a apreciarse diferencias significativas entre especies, e incluso en una misma especie entre estudios diferentes (por ej., en el carpín). Estas diferencias, tanto en la  $K_d$  como en la  $B_{max}$  pueden estar correlacionadas con los distintos niveles endógenos de melatonina entre especies, y tendrían un evidente valor adaptativo al permitir ajustar la sensibilidad de los tejidos diana a las concentraciones circulantes de indolamina.

La asociación del ligando al receptor en la retina de la tenca es un proceso rápido, pero la disociación es más lenta, siendo las constantes de asociación y disociación ( $K_{+1}$  y  $K_{-1}$ ) similares a las determinadas en la retina de lubina (*Dicentrarchus labrax*, Bayarri *et al.*, 2004b) y de la *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004a). La cinética de la asociación ligando-receptor en el techo óptico de la tenca concuerda con lo descrito en el techo óptico de *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004a) y en homogeneizados de cerebro completo de la lubina (*Dicentrarchus labrax*, Bayarri *et al.*, 2004a), del salmón masou (*Oncorhynchus masou*, Amano *et al.*, 2003a), y del lucio (*Esox lucius*, Gaildrat *et al.*, 1998). El tiempo en el que se alcanza el equilibrio de asociación es constante (60 min) en todas las especies citadas. Sin embargo, la disociación es más variable, por ejemplo en el lucio es muy lenta, apareciendo dos componentes en la gráfica (Gaildrat *et al.*, 1998), situación que también parece darse en la dorada (*Sparus auratus*, Falcón *et al.*, 1996b). El significado de estas diferencias entre especies no lo conocemos, pero podrían revelar para el lucio y la dorada distintos estados de afinidad del receptor en función del grado de acoplamiento con las proteínas G (Gaildrat *et al.*, 1998). Las  $K_d$  cinéticas, obtenidas del cociente entre ambas constantes cinéticas ( $K_{+1}$  y  $K_{-1}$ ) son muy similares en la tenca, en el cerebro del pez gato

(*Silurus asotus*, Iigo *et al.*, 1997b) y en el salmón masou (*Oncorhynchus masou*, Amano *et al.*, 2003a).

Por un lado, los resultados muy similares obtenidos en la caracterización de los receptores de melatonina en la retina neural y el techo óptico de la tenca revelan la presencia en ambos tejidos de un subtipo homogéneo de receptores común. Por otro, el paralelismo existente entre las cinéticas de asociación y disociación para los receptores de melatonina en anfibios (*Rana perezi*) y en peces, podría sugerir la existencia de subtipos de receptores muy similares en ambos grupos de vertebrados poiquiloterms. En este momento de la investigación se impone la necesidad de discutir los resultados de los ensayos farmacológicos que nos permitirán confirmar o rechazar esta hipótesis.

Los estudios farmacológicos realizados en extractos de membranas procedentes tanto de la retina neural como del techo óptico de la tenca ponen de manifiesto que los sitios de unión de melatonina presentes en la tenca tienen una elevada especificidad por compuestos que presentan ambos sustituyentes, 5-metoxi y N-acetilo (como la 2-fenilmelatonina, la 2-iodomelatonina, la 6-cloromelatonina o la propia melatonina), y de todos éstos, los compuestos con la sustitución en la posición 2 (2-iodomelatonina y 2-fenilmelatonina) son los que presentan una afinidad máxima. En cambio, otros ligandos que no tienen sustituyentes en ambas posiciones (5-metoxi y N-acetilo) como la 5-MCA-NAT y el luzindol, presentan una menor potencia de inhibición de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel. Los órdenes de potencia de los análogos de la melatonina para inhibir la unión específica en la retina y el techo óptico de la tenca son muy similares entre sí, y al descrito para los receptores de melatonina del tipo MT<sub>1</sub> en el cerebro de otras especies de teleósteos, como *E. lucius* (Gaildrat *et al.*, 1998), *C. auratus* (Iigo *et al.*, 1994b), *O. masou* (Amano *et al.*, 2003a), y *D. labrax* (Bayarri *et al.*, 2004a), e incluso en otros grupos de poiquiloterms, como en el anfibio *R. perezi* (Isorna *et al.*, 2004a). Esta concordancia en la farmacología indica la existencia de un mismo tipo de receptor, perteneciente al subtipo MT<sub>1</sub>, en las distintas especies de teleósteos investigadas. Las constantes de inhibición en la retina de la tenca para la 2-IMel, la 2-Ph-Mel, la 6-Cl-Mel y la Mel son similares a las publicadas en varias especies de mamíferos (Reppert *et al.*, 1995a, b; Roca *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1999) y aves (Reppert *et al.*, 1995a). Por tanto, podemos afirmar que las características farmacológicas de los receptores de melatonina de alta afinidad parecen estar muy conservadas en la evolución.

En el techo óptico, a diferencia de lo que ocurre en la retina neural, la 6-Cl-Mel presenta una constante de inhibición ligeramente inferior a la de la Mel, siendo la potencia de inhibición de ambos fármacos de un mismo orden de magnitud. Esta diferencia entre tejidos, aunque podría sugerir una cierta variabilidad muy sutil entre los receptores

caracterizados en ambos tejidos centrales de la tenca, no parece muy probable que sea así, dado que la constante de inhibición para la 6-CI-Mel se encuentra dentro del intervalo descrito en la bibliografía para este subtipo de receptor (Reppert *et al.*, 1995b; Nonno *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 1999).

La mayor diferencia con los datos encontrados en la bibliografía la observamos en la curva de inhibición por la 5-MCA-NAT en la retina neural, único tejido en el que se ha empleado dicho fármaco. En la tenca, este compuesto no inhibe la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel al receptor a ninguna de las concentraciones utilizadas, aun a pesar de emplear concentraciones superiores a las que producen inhibición en humanos (Dubocovich *et al.*, 1997), lo que descarta la presencia de receptores del subtipo MT<sub>3</sub>, al menos en la retina neural de la tenca.

Estos ensayos farmacológicos de competición son muy útiles para diferenciar subtipos de receptores pero la verdadera identidad de los posibles distintos subtipos sólo se puede conseguir con una identificación molecular. En los mamíferos hay numerosos estudios de clonación y secuenciación de receptores de melatonina, pero en los vertebrados no mamíferos, este aspecto ha sido mucho menos investigado. En los peces se ha clonado un receptor de melatonina en el cerebro del lucio que muestra identidad del 80% con receptores de melatonina previamente aislados en diferentes grupos de vertebrados no mamíferos, y clasificados como receptores del subtipo MT<sub>2</sub>, si bien el grado de similitud que alcanza con este subtipo de receptores en humanos (única especie en la que se ha clonado entero) es sólo del 61% (Gaildrat *et al.*, 2002). Este receptor estaría constituido por 367 aminoácidos y presenta características estructurales típicas de la familia de receptores acoplados a proteínas G. El luzindol y el 4-P-PDOT son antagonistas de receptores de melatonina, y muestran una selectividad mucho mayor por el subtipo MT<sub>2</sub> que por el MT<sub>1</sub> en humanos (Dubocovich *et al.*, 1997). Ambos desplazan pobremente la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel al receptor del lucio, con lo que el subtipo de receptor implicado en la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el cerebro del lucio no sería el equivalente farmacológico del subtipo MT<sub>2</sub> de humanos, sugiriendo los autores que quizá se trata de un nuevo subtipo. La dificultad reside en que ambos fármacos son ligandos selectivos de receptores MT<sub>2</sub> en mamíferos (Masana y Dubocovich, 2001; Dubocovich *et al.*, 1997), pero desconocemos su farmacología en especies de vertebrados no mamíferos. Al igual que sucede en el lucio (Gaildrat *et al.*, 2002) y en otros poiquilotermos, como *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004a), en la retina neural de la tenca encontramos también una afinidad muy baja por estos ligandos (luzindol y 4-P-PDOT).

En el techo óptico de la tenca, el 4-P-PDOT y el luzindol también inhiben con muy baja potencia la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a los receptores, si bien las constantes de inhibición

son ligeramente mayores a las encontradas en la retina neural. Este resultado puede ser un indicador de la ausencia de receptores de tipo  $MT_2$  en ambos tejidos centrales de la tenca, ya que si existiera este subtipo la constante de inhibición de ambos fármacos debería encontrarse en el orden nanomolar bajo, es decir, de 100 a 1000 veces menor, por lo que es una prueba más a favor de la presencia de un subtipo de receptores  $MT_1$ , tanto en la retina neural como en el techo óptico de la tenca.

Finalmente, queremos insistir en el desconocimiento actual de la farmacología de los receptores de melatonina en los vertebrados poiquiloterms, y que podría ser muy diferente de la descrita para los receptores homólogos de los mamíferos, por lo que tiene gran interés lograr una identificación molecular y caracterización farmacológica de los receptores de melatonina en estos vertebrados, en los que se ha demostrado el papel clave desempeñado por esta hormona.

## **2.2. Tejidos periféricos:**

La caracterización de los sitios de unión de melatonina en el corazón de la tenca revela la existencia de un único tipo de sitio unión de 2-[ $^{125}$ I]-Mel. La unión del ligando es específica, saturable, reversible y es inhibida por compuestos estructuralmente relacionados, cumpliendo con los criterios necesarios para que sea considerado un verdadero receptor. Su densidad ( $B_{max} = 8,4 \pm 0,2$  fmol/mg prot) y elevada afinidad ( $K_d = 10,3 \pm 1,1$  pM) por la 2-[ $^{125}$ I]-Mel, la linealidad de la representación de Scatchard y las curvas de inhibición monofásicas indican que esta población de receptores podría corresponder con un único subtipo de receptor perteneciente a la familia de receptores Mel-1. Características similares se han observado en el tejido cardíaco de ciertas aves (Pang *et al.*, 1996, 2002), pero no en peces, grupo en el que únicamente existe un estudio previo que apunta la presencia de sitios de unión en el corazón de salmónidos, sin llegar a hacer una caracterización de los mismos (Pang *et al.*, 1994c).

Las tasas de asociación y disociación ( $K_{+1}$  y  $K_{-1}$ ) encontradas para los receptores del corazón de la tenca también son acordes con lo descrito por Pang y colaboradores (1996, 2002) para el corazón del pollo y de la codorniz, si bien las cinéticas de asociación y de disociación en estas aves son aproximadamente tres veces más rápidas que en el corazón de la tenca. Estos valores superiores pueden justificarse en base a la mayor temperatura utilizada en el ensayo de unión, 37°C en el pollo frente a 25°C en la tenca. Sin embargo, la  $K_d$  cinética de las aves (29 pM) no difiere significativamente de los valores obtenidos en el corazón de la tenca ( $K_d$  cinética = 36 pM), lo que apoyaría que la afinidad de la melatonina por sus sitios de unión específicos estudiados en el corazón se conserva, al menos en las dos especies.

El perfil farmacológico para los receptores de melatonina en el corazón de la tenca es muy similar al obtenido para los tejidos centrales en la tenca y al descrito previamente para el corazón del pollo (Pang *et al.*, 2002). Ya hemos planteado que la identificación molecular de los receptores centrales de melatonina es poco conocida en los vertebrados poiquilotermos, pero esta carencia es aún mucho más notable para los tejidos periféricos. Por tanto nuestros esfuerzos se centraron en la caracterización farmacológica del subtipo de receptores presentes en el corazón. El luzindol y el 4-P-PDOT, antagonistas mucho más selectivos para los receptores MT<sub>2</sub> que para los MT<sub>1</sub> en humanos (Dubocovich *et al.*, 1997) desplazaron pobremente la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel al receptor, con lo que el subtipo de receptor en el tejido cardíaco de la tenca no sería un homólogo del subtipo MT<sub>2</sub> de humanos. La baja afinidad por estos ligandos (luzindol y 4-P-PDOT) encontrada en el tejido cardíaco de la tenca podría interpretarse como ausencia de receptores del tipo MT<sub>2</sub> en este tejido, si bien sólo podemos sugerir que en el corazón de la tenca, al igual que ocurre en la retina neural y el techo óptico de esta especie, los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel pertenecen a la familia de receptores del tipo Mel-1, sin poder precisar más, debido al desconocimiento existente acerca de la farmacología de los receptores de melatonina en vertebrados ectotermos, y que podría ser muy diferente de la encontrada para los receptores homólogos de mamíferos. Otro resultado que apoya esta propuesta es el hecho de que tanto en el corazón como en los tejidos centrales estudiados, otros ligandos, como la 2-I-Mel, muestran constantes de inhibición muy similares a las descritas en la bibliografía para los receptores del tipo Mel-1 (Dubocovich *et al.*, 1997).

Con el fin de descartar la posible existencia de receptores del tipo MT<sub>3</sub> en el corazón de la tenca, empleamos un ligando con elevada afinidad para este subtipo de receptores, la N-acetilserotonina (NAS), observando una pobre inhibición de este fármaco en la unión del radioligando, e incluso con una potencia menor que la encontrada para el luzindol y el 4-P-PDOT. La constante de inhibición es de 7,08 µM, significativamente muy superior a lo descrito para los receptores del tipo MT<sub>3</sub> (del orden nanomolar). Por tanto, y a pesar de la limitación en los fármacos disponibles, la caracterización farmacológica realizada en la tenca nos permite sugerir que en el corazón, al igual que ocurre en la retina neural y en el techo óptico, los receptores presentes se corresponden farmacológicamente con el subtipo MT<sub>1</sub> de los mamíferos.

La caracterización de los sitios de unión de melatonina en el riñón de la tenca nos muestra resultados bastante diferentes. En primer lugar, observamos que la unión no es saturable a 25°C, por lo que todos los ensayos se han realizado a 4°C y con tiempos de incubación más cortos que los empleados en el resto de tejidos. Con estas nuevas condiciones de ensayo logramos una unión saturable, reversible e inhibida por compuestos

estructuralmente relacionados (Figura 4). No obstante, el riñón de la tenca muestra una capacidad de unión notablemente inferior ( $B_{max} = 1,12 \pm 0,20$  fmol/mg prot) a la observada tanto en los tejidos centrales como en el corazón, pero similar a la encontrada en otros tejidos periféricos de la tenca, como las branquias y los segmentos anterior y posterior del tracto gastrointestinal. Se han descrito densidades similares en otros grupos de vertebrados, si bien se carece de datos referentes a los peces. Song y colaboradores (1995) publican densidades de alrededor de 1,5 fmol/mg prot en el riñón de humanos y de 0,5 fmol/mg prot en el de cobaya (Song *et al.*, 1993). También en el riñón del pollo (*Gallus gallus*, Song y Pang, 1992) se miden densidades bajas ( $\approx 2$  fmol/mg prot), al igual que en el riñón del pato (4 fmol/mg prot, *Anas platyrhynchos*, Song *et al.*, 1992), sin embargo la capacidad de unión en el riñón del hámster sirio es mucho mayor, entre 70 y 80 fmol/mg prot (*Mesocricetus auratus*, Paul *et al.*, 1999).

La representación de Scatchard es lineal, indicando la existencia de una población homogénea de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el riñón de esta especie. Pero la afinidad de este sitio de unión en el riñón es notablemente inferior a la encontrada en la retina neural, el techo óptico, el iris y el corazón de la tenca, con valores de Kd del orden picomolar alto ( $Kd = 423,93 \pm 173,51$  pM), y también menor a la descrita en el riñón de otros vertebrados, humanos ( $Kd = 16$  pM), cobaya ( $Kd = 21,4$  pM), pollo ( $Kd = 24$  pM) y pato ( $Kd = 38,8$  pM). Esta gran diferencia en las afinidades nos indujo a pensar en la existencia de un subtipo diferente de receptor de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el riñón, respecto al MT<sub>1</sub>, propuesto para el resto de los tejidos estudiados en la tenca. Además, al presentar una afinidad muy baja, bien podría pertenecer a la subfamilia MT<sub>3</sub>, descrita en los mamíferos y caracterizada por una afinidad del orden nanomolar (Molinari *et al.*, 1996; Dubocovich *et al.*, 1998a; Paul *et al.*, 1999; Nosjean *et al.*, 2000, 2001).

El estudio cinético también tuvo que realizarse a 4°C, ya que a la temperatura habitual utilizada en ensayos de radioligando en poiquilotermos (25°C) no se logra el equilibrio. En estas condiciones, observamos que la cinética es muy rápida, alcanzándose el equilibrio en la asociación en tan solo 10 segundos, y completándose la disociación sólo 100 segundos después de la adición de NAS 10  $\mu$ M, lo que determina una constante cinética de disociación de 93,6 pM. Esta cinética es claramente distinta a la mostrada por los tejidos anteriormente descritos, y se asemeja bastante a la del riñón del hámster sirio (Paul *et al.*, 1999; Nosjean *et al.*, 2000) y del intestino de esta misma especie (Paul *et al.*, 1999), tejidos en los que se necesitan únicamente 20 segundos para que se produzca el equilibrio en la asociación en ensayos realizados, como nosotros, a 4°C. Por tanto, estas diferencias halladas en la cinética de interacción del ligando con los sitios de unión de melatonina en el riñón confirman la hipótesis de que nos encontramos ante un subtipo de



receptor diferente. Algunos ensayos preliminares realizados en otros tejidos periféricos de la tenca, como las branquias y el tracto gastrointestinal, apuntan también a un comportamiento muy similar al observado en el riñón de la tenca.

La farmacología de estos sitios de unión en el riñón de la tenca es notablemente diferente a la encontrada en el resto de tejidos estudiados. Se produce un aumento significativo de la constante de inhibición tanto para la 2-l-Mel ( $K_i = 111,30$  nM) como para la propia Mel ( $K_i = 1,25$   $\mu$ M), frente a los valores observados en los restantes tejidos (50-120 pM para la 2-l-Mel y 1,5-3,7 nM para la Mel). Sin embargo este resultado en la tenca discrepa de lo obtenido en el riñón de otros vertebrados, como el de cobaya (Song *et al.*, 1993), pollo (Song y Pang, 1992), pato (*Anas platyrhynchos*, Song *et al.*, 1992) e incluso en humanos (Song *et al.*, 1995) en los que la farmacología es clásica y corresponde al subtipo de receptores Mel-1. Una farmacología similar a la del riñón de la tenca se ha mostrado previamente en el riñón del hámster sirio, en el que aunque la constante de inhibición no aumenta tanto para ninguno de los dos ligandos ( $K_i = 0,6$  nM para la 2-l-Mel, y  $K_i = 54$  nM para la Mel), los autores proponen que el receptor muy probablemente pertenece al tipo  $MT_3$  (Mel-2). Con el fin de confirmar esta posibilidad también en el riñón de la tenca utilizamos dos análogos específicos de este subtipo de receptores, la 5-MCA-NAT y la NAS, que en ensayos de inhibición corroboraron la hipótesis. La 5-MCA-NAT produce una pobre pero significativa inhibición de la unión de radioligando, pero el efecto de la NAS es mucho más llamativo ya que su constante de inhibición pasa de tener un valor en el intervalo micromolar en el corazón ( $K_i = 7,08$   $\mu$ M) a un valor en el intervalo nanomolar en el riñón ( $K_i = 317,80$  nM).

Por tanto, a partir de todos estos resultados podemos afirmar que en el riñón de la tenca nos encontramos ante un sitio de unión de melatonina diferente, que muestra todos los indicios cinéticos y farmacológicos del subtipo de receptor  $MT_3$ . Muy posiblemente las branquias y el intestino también presenten este sitio de unión, ya que estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio con estos tejidos (resultados no mostrados) apuntan claramente hacia esta posibilidad. El receptor denominado  $MT_3$  ha sido clonado en el riñón del hámster, e identificado como el homólogo en dicha especie de la quinona reductasa 2, enzima con función detoxificante en el organismo (Nosjean *et al.*, 2000), datos que indican que en realidad no se trataría de un verdadero receptor de alta afinidad por la hormona, sino más bien de un sitio de unión de baja afinidad por la melatonina. Es necesario realizar estudios que permitan dilucidar esta posibilidad.

Es bien conocido que en la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteínas G la unión de un agonista al receptor disminuye en presencia de GTP o compuestos relacionados. En base a esta propiedad se utilizan análogos no hidrolizables

del GTP para determinar si un determinado tipo de receptor se encuentra funcionalmente acoplado a proteínas G. En todos los tejidos estudiados en la tenca los sitios de unión de melatonina son sensibles al GTP $\gamma$ S. Es decir, la adición de dicho análogo al medio de incubación reduce la unión específica de forma dependiente de la concentración. Este papel del GTP se ha investigado en otras especies de teleósteos encontrando resultados muy similares a los descritos para la tenca. En la dorada (*Sparus aurata*) se produce el 50% del desplazamiento de la unión del agonista con una concentración 200  $\mu$ M de GTP $\gamma$ S, y un desplazamiento total con una concentración 2 mM (Falcón et al., 1996b). En el lucio (*Esox lucius*) se requiere una concentración tan sólo 300 nM de GTP $\gamma$ S para obtener el 50% de la inhibición, y concentraciones del orden milimolar para alcanzar el 90% de la inhibición (Gaildrat et al., 1998). Iigo y colaboradores (1997b) describen en el pez gato (*Silurus asotus*) que el GTP $\gamma$ S (100  $\mu$ M) también reduce la densidad y la afinidad de los receptores, cuando se añade en el ensayo de saturación, y esta misma concentración de GTP también disminuye ambos parámetros en el cerebro de la lubina (*Dicentrarchus labrax*, Bayarri et al., 2004a).

En la tenca, la magnitud del descenso de la unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel producido por el GTP $\gamma$ S es variable dependiendo de los tejidos, así concentraciones de GTP $\gamma$ S de 0,06  $\mu$ M, 0,81  $\mu$ M, 9,79  $\mu$ M y 28,71  $\mu$ M desplazan el 50% de la unión del radioligando en la retina neural, el techo óptico, el corazón y el riñón, respectivamente. Además, la inhibición es sólo parcial en la retina neural (85%), el techo óptico (74%) y el corazón (77%), siendo prácticamente completa en el caso del riñón (96%), lo que determina potencias de inhibición (IC<sub>50</sub>) del GTP $\gamma$ S muy diferentes dependiendo del tejido.

Las diferencias de concentración de GTP $\gamma$ S que inducen inhibición en la tenca respecto al lucio y la dorada pueden justificarse en base a varias razones. Por un lado, al hecho de que en los estudios del lucio y la dorada se emplean homogeneizados de encéfalo completo, mientras que nosotros estudiamos áreas encefálicas concretas y tejidos periféricos. Por otro, es razonable considerar que en estado basal el número de receptores unidos a proteínas G puede ser variable, por lo que se necesita una mayor o menor concentración de GTP $\gamma$ S para conseguir el 50% de la inhibición, lo que justificaría las diferencias encontradas en la tenca respecto a otros teleósteos. Además, hay que tener en cuenta que hay varios tipos diferentes de proteínas G con distintas afinidades por el GTP, y cuya expresión puede ser muy distinta dependiendo del tejido.

En algún estudio, como por ejemplo en la retina de pollo, el análogo del GTP no es capaz de modular la unión del radioligando (Chong y Sugden, 1991), habiéndose sugerido que o bien están implicadas proteínas G diferentes, o bien están operando otros

mecanismos de acoplamiento (descenso de GMPc vía guanilato ciclasa, regulación de canales iónicos, o la ruta de los fosfoinositoles (Masana y Dubocovich, 2001). Por tanto, no debemos descartar la posibilidad de que existan proteínas G diferentes acopladas a los distintos receptores de melatonina, y especialmente en el riñón de la tenca. En la actualidad conocemos distintas clases de proteínas G ( $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_{i/o}}$ ,  $G_{\alpha_{q/11}}$  y  $G_{\alpha_{12/13}}$ ) que utilizan una variedad de rutas de transducción de la señal tras la activación por el agonista (Hamm, 1998; Branden y Tooye, 1999). Las diferencias observadas en la potencia de inhibición en los diferentes tejidos estudiados de la tenca podrían deberse a la presencia de proteínas G diferentes, o bien a una distinta cantidad de proteínas G en cada tejido. En este sentido, el hecho de que la inhibición sea total en el riñón, y parcial en el resto de tejidos estudiados nos puede estar indicando la presencia de proteínas G diferentes, al menos en el riñón, mientras que las diferencias observadas en la potencia de inhibición en la retina neural, el techo óptico y el corazón podrían deberse a la existencia de distintas concentraciones de proteínas G en estos órganos.

Además del GTP que actúa sobre las proteínas G que transducen la señal de la melatonina, el  $Na^+$  es una herramienta útil para obtener información adicional acerca del acoplamiento del receptor a la proteína G, ya que su unión al receptor modifica de forma directa la conformación del mismo, sólo en aquellos receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  (Reisine, 1995). En los receptores de melatonina de la tenca el  $Na^+$  inhibe la unión máxima en la retina neural, el corazón y el riñón de forma independiente al efecto del  $GTP\gamma S$ . En el caso concreto del riñón, la constante de inhibición de la 2-iodomelatonina aumenta 4 veces en presencia de  $Na^+$  (500 mM) y 5 veces en presencia de  $GTP\gamma S$  (100  $\mu M$ ). Efectos del  $Na^+$  sobre los receptores de melatonina no ha sido investigados con anterioridad en los peces, pero existen datos en otros vertebrados, por ej., en el corazón de la codorniz la adición de NaCl (150 mM) disminuye tanto la unión de la melatonina a su receptor como la afinidad (Pang *et al.*, 1996), y en el núcleo supraquiasmático de la rata la capacidad de unión se reduce hasta en un 50% tras la adición de  $Na^+$  (50 mM) (Laitinen y Saavedra, 1990a). En los poiquilothermos, el único estudio existente se ha realizado en la *Rana perezi*, donde este catión (500 mM) disminuye la capacidad de unión de 5,17 a 2,48 fmol/mg prot, sin cambios aparentes en la afinidad de los receptores (Isorna *et al.*, 2004a). En la tenca la unión de la melatonina a sus receptores es muy sensible a la adición de este catión monovalente, si bien, únicamente en el riñón se observan cambios en la afinidad de los receptores provocados tanto por el  $GTP\gamma S$  como por el  $Na^+$ .

Por tanto, a partir de nuestros resultados podemos sugerir que los sitios de unión de 2-[ $^{125}I$ ]-Mel en todos los tejidos caracterizados en la tenca muestran características propias de receptores acoplados a proteínas G y muy probablemente del subtipo  $G_{i/o}$ .

En el riñón de la tenca, el leve descenso de la afinidad de los receptores por el ligando podría deberse a la presencia en este tejido de otro tipo de proteínas G diferentes a las de los restantes tejidos estudiados. Este resultado vuelve a confirmar que los sitios de unión encontrados en el riñón son muy distintos a los receptores del resto de los tejidos, encontrándose más próximos a los receptores del subtipo MT<sub>3</sub>.

### **3. RITMICIDAD DIARIA Y ESTACIONAL DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE MELATONINA EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE LA TENCA.**

#### **3.1. Ritmicidad en tejidos centrales.**

Los receptores de melatonina en localizaciones centrales de la tenca muestran una ritmicidad diaria significativa en las estaciones frías del año, el techo óptico en el otoño y la retina neural en otoño e invierno. Estas variaciones rítmicas diarias se traducen en cambios en la densidad de los receptores, pero no en la afinidad, encontrando densidades más elevadas durante la fase luminosa del fotociclo diario y densidades menores durante la fase oscura en ambas estaciones. Este perfil rítmico diario es similar al descrito en otros vertebrados, por ejemplo, en la *pars tuberalis* y el núcleo supraquiasmático de mamíferos (Gauer *et al.*, 1993a, 1994a), en el cerebro de varias especies de aves (Brooks y Cassone, 1992; Yuan y Pang, 1991, 1992), en la retina de *Xenopus laevis* (Wiechmann y Smith, 2001) y en distintas regiones cerebrales de *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004b).

En los peces se han publicado datos de cambios diarios en densidades y/o afinidades de los receptores de melatonina en varias especies, si bien análisis a lo largo de ciclos de 24h sólo se ha realizado en homogeneizados de cerebro completo en el lucio (Gaildrat *et al.*, 1998) y en el carpín (Iigo *et al.*, 2003b) y en regiones encefálicas completas en la lubina (*Dicentrarchus labrax*, Bayarri *et al.*, 2004b). A partir de la información disponible en los peces, en principio podría deducirse que hay dos posibles opciones, especies en las que no existen diferencias día/noche en los receptores de melatonina, y especies en las que hay cambios diarios, principalmente de densidades. Así, en el primer grupo estarían incluidos varios salmónidos (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* y *Salvelinus fontinalis*, Pang *et al.*, 1994b) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*, Bayarri *et al.*, 2004b), y en el segundo se incluiría la dorada (*Sparus aurata*, Falcón *et al.*, 1996b), el lucio (*Esox lucius*, Gaildrat *et al.*, 1998), el pez gato (*Silurus asotus*, Iigo *et al.*, 1997b) y el carpín (*Carassius auratus*, Iigo *et al.*, 2003b). Existen excepciones en esta clasificación general, por ejemplo *Oncorhynchus masou*, que siendo salmónido presenta cambios diarios en la densidad de receptores en el cerebro (Amano *et al.*, 2003b), o la lubina, que no muestra variaciones diarias en distintas regiones cerebrales, pero sí en la retina neural (Bayarri *et al.*, 2004b).

Varias posibilidades pueden argumentarse en la justificación de este distinto patrón entre especies. Por un lado, puede atribuirse a la variabilidad biológica entre teleósteos, en este sentido resulta interesante que en las especies que presentan variaciones significativas en las densidades de sitios de unión de melatonina (dorada, lucio, carpín), la secreción pineal de melatonina está regulada por relojes circadianos intrapineales (Ekström y Meissl, 1997), pero aún no disponemos de información en un número suficientemente elevado de especies para poder trazar criterios filogenéticos que justifiquen esta dualidad.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que en estos estudios (salvo en la lubina) se utilizan homogeneizados de cerebro entero, lo que puede estar ocultando diferencias en regiones concretas. La importancia clave de analizar diferencias diarias en regiones concretas del encéfalo y no en homogeneizados de cerebro completo se pone de manifiesto con los estudios realizados en la lubina (*Dicentrarchus labrax*). En homogeneizados de cerebro completo no se encuentran diferencias diarias significativas ni en la densidad ni en la afinidad (Bayarri *et al.*, 2004a). Sin embargo, en un estudio posterior en esta misma especie, en el que ha participado nuestro equipo de investigación y se han analizado posibles variaciones diarias en la densidad de receptores en áreas encefálicas concretas (lóbulos olfatorios, telencéfalo, techo óptico, cerebelo y médula espinal), aunque aparentemente no existen diferencias luz/oscuridad significativas en la densidad de receptores, a partir de las curvas de inhibición del ligando 4-P-PDOT, capaz de distinguir farmacológicamente los subtipos MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, se ha podido demostrar un cambio diario en las densidades relativas de estos dos subtipos (Bayarri *et al.*, 2004b).

Además, y a partir de nuestros resultados en la tenca, se pone de manifiesto la importancia de conocer la estación del año en que se realiza el estudio, porque como hemos visto existen variaciones estacionales notables en la densidad de receptores de melatonina. Desafortunadamente, prácticamente en ninguno de los estudios previos en peces se indica la época del año en que se realizó la investigación. Por último, queremos enfatizar la importancia de realizar varios muestreos a lo largo del ciclo de 24h, y no únicamente en dos puntos del ciclo de 24h, ya que no se obtiene una información completa sobre posibles cambios diarios, pudiendo pasar desapercibidas diferencias existentes en otros momentos del ciclo.

En la tenca no encontramos en ningún tejido y en ninguna estación cambios diarios significativos en la afinidad de los sitios de unión, de acuerdo con los resultados obtenidos en la mayoría de los estudios realizados en otras especies de peces (Iigo *et al.*, 1994b, 2003b). Esta constancia diaria y estacional de los valores de Kd en varias especies puede estar indicando la importancia fisiológica de la conservación de este parámetro. Excepcionalmente, se han descrito variaciones en la afinidad en el lucio, con afinidades más

elevadas a lo largo de la fotofase y en mitad de la fase oscura ( $K_d = 100 \text{ pM}$ ) y con dos picos de menor afinidad, al comienzo y al final de la fase oscura del fotociclo diario ( $K_d = 225$  y  $330 \text{ pM}$  respectivamente), argumentando los autores que estos cambios de afinidad pueden ser un reflejo de posibles cambios diarios en el estado de acoplamiento de los sitios de unión a las proteínas G (Gaildrat *et al.*, 1998). Otra especie en la que también se han descrito alteraciones de la afinidad a medio día frente a media noche es el pez gato (*Silurus asotus*), si bien los propios autores argumentan que estos cambios pueden deberse a errores metodológicos, ya que al repetir el mismo diseño experimental no resultan significativos (Iigo *et al.*, 1997b). Según nuestro criterio, no ha de resultar sorprendente la constancia de la afinidad a lo largo del ciclo diario, ya que se trata de un parámetro indicativo de la sensibilidad del tejido diana frente a la hormona. En receptores funcionales la afinidad del receptor por el ligando endógeno ha de coincidir con el intervalo fisiológico de éste, situación que se da en la retina de la tenca (Guijarro, 2004).

El perfil diario de densidad de receptores es similar en la retina y el techo óptico de la tenca, siendo las horas centrales de la fotofase diaria las que muestran mayor densidad, como se pone de manifiesto con el valor estimado de la fase del ritmo ( $\varphi = 11:20 \pm 0,53$  y  $11:09 \pm 0:37$ , respectivamente). Este perfil diario coincide con el descrito en distintas áreas encefálicas y la retina de *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004b), sin embargo difiere del hallado en la retina de la lubina (*D. labrax*, Bayarri *et al.*, 2004b), donde la menor densidad se mide durante la fase luminosa del fotociclo. En esta especie, de forma excepcional, el ritmo diario de síntesis ocular de melatonina está invertido respecto al patrón característico de la mayoría de los vertebrados, con una producción significativamente superior durante la fotofase, y niveles mínimos durante la fase oscura del fotociclo diario (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997; García Allegue *et al.*, 2001; Bayarri *et al.*, 2002). Por tanto, la baja densidad de receptores en esta especie durante la fotofase se correlaciona con los niveles más altos de melatonina ocular, lo que resulta perfectamente coherente con la hipótesis de una regulación de los receptores por la propia melatonina. No obstante, no existen pruebas que permitan descartar un posible ritmo de expresión génica de los receptores controlado por un oscilador, como se ha descrito en *Xenopus laevis* (Wiechmann y Smith, 2001).

Si comparamos el perfil diario de sitios de unión de melatonina en la retina de la tenca (presente estudio) con el ritmo diario de melatonina ocular en esta especie (Guijarro, 2004) podemos afirmar que existe una relación inversa de fase entre ambos ritmos. Las concentraciones oculares de melatonina son elevadas durante la noche, cuando las densidades de sitios de unión de la indolamina son más bajas, y viceversa. Este resultado puede sugerir que la melatonina está ejerciendo una regulación negativa sobre su propio receptor, como sucede en numerosos receptores acoplados a proteínas G en los que el

ligando endógeno produce desensibilización de sus propios sitios de unión. Esta hipótesis se ha propuesto para la *pars tuberalis* y el núcleo supraquiasmático de algunas especies de mamíferos (Gauet *et al.*, 1993a; Masson-Pévet *et al.*, 1993) y para el cerebro de algunas aves (Yuan y Pang, 1992), especies en las que los ritmos diarios de receptores dependen de la melatonina circulante. No obstante, esta propuesta no es general en la bibliografía de vertebrados homeotermos ya que, en ciertos casos, los ritmos diarios de sitios de unión son independientes de melatonina, existiendo indicios de regulación por un oscilador circadiano (Duncan *et al.*, 1993; Siuciak y Dubocovich, 1993). Esta interesante cuestión no ha sido investigada en profundidad en los peces, tan solo en el lucio se ha observado que las variaciones diarias se mantienen tanto en luz constante como en oscuridad constante, sugiriendo que en esta especie, sin poder descartar que la melatonina desensibilice sus propios receptores, las variaciones diarias en número y afinidad de los sitios de unión de melatonina en el cerebro parecen estar controladas por osciladores circadianos sincronizados por el fotoperiodo, aunque se desconoce la localización de dichos osciladores (Gaildrat *et al.*, 1998).

En la tenca, la relación inversa de fase entre el ritmo de melatonina ocular y las variaciones de Bmax de los sitios de unión apoyaría la hipótesis de una desensibilización de los receptores. Sin embargo los resultados obtenidos en el experimento de exposición a oscuridad constante, en el que no se incrementa la capacidad de unión en la retina, a pesar de que la melatonina ocular disminuye hasta valores prácticamente basales, apoyan en la retina de la tenca la hipótesis de una posible regulación circadiana independiente de la melatonina. En la retina de *Xenopus laevis*, donde se ha demostrado que existe un reloj circadiano que regula la síntesis de melatonina, se han descrito variaciones rítmicas de expresión de los receptores MT<sub>2</sub> y Mel1c, con valores máximos durante la fotofase diaria (Wiechmann y Smith, 2001). De modo que cabrían, al menos, dos posibilidades. Por un lado, la melatonina podría ejercer su acción reguladora actuando directamente sobre la expresión génica de sus propios receptores. Por otro, la melatonina actuaría sobre el oscilador circadiano, que en último término controlaría la densidad de receptores, a la baja cuando la concentración de melatonina es elevada, y viceversa. A partir de los datos disponibles en este momento no podemos descartar ninguna de las dos posibilidades, siendo necesario realizar experimentación adicional para confirmar estas hipótesis.

El techo óptico y la retina de la tenca exhiben una notable variación estacional en la capacidad de unión de melatonina. Así, por ejemplo, la densidad de sitios de unión en la retina alcanza valores muy elevados en primavera (3 veces superiores a los mínimos anuales), que disminuyen drásticamente hasta mostrar los mínimos en verano. Durante otoño e invierno se observa una recuperación progresiva que conducirá nuevamente a los

valores máximos primaverales. A pesar de leves diferencias, no existe dimorfismo sexual en la densidad de receptores en las distintas estaciones del año. Estudios estacionales que analicen cambios rítmicos en los receptores de melatonina son muy escasos, y se han realizado casi de forma exclusiva en mamíferos, siendo la *pars tuberalis* es región cerebral más investigada. En machos de hámster europeo la *pars tuberalis* muestra variaciones en la capacidad de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a lo largo del año, con una mayor densidad en primavera y principio del verano y descensos notables durante el período invernal (Skene *et al.*, 1992). En el erizo y en el hámster sirio (Gauer *et al.*, 1994b) también se describen correlaciones estacionales de la Bmax y el desarrollo gonadal estacional (mayor densidad en animales sexualmente activos, en marzo). En machos de visón (*Mustela vison*) especie que, a diferencia de las anteriores, presenta su actividad sexual en otoño, la menor densidad de sitios de unión se observa en julio, y aumenta a partir de septiembre hasta ser máxima en octubre (Messenger *et al.*, 1997). En todos estos casos, y al igual que hemos observado en la tenca, los cambios estacionales se deben a variaciones en la densidad, pero no en la afinidad de los receptores.

A partir de todos estos estudios en los mamíferos se ha propuesto que existe una clara correlación entre el aumento estacional en la densidad de receptores de melatonina en la *pars tuberalis* y la época de madurez sexual, estando asociadas las bajas densidades a fotoperíodos cortos e inactividad sexual. Conociendo la importancia de la melatonina en la regulación de los ciclos reproductores estacionales en estas especies y el papel central desempeñado por la *pars tuberalis* hipofisaria como mediadora del efecto del fotoperíodo en funciones estacionales, como la hibernación y la reproducción, se ha planteado una relación causal entre descenso en la densidad de receptores de melatonina en la *pars tuberalis* e inactividad sexual, fortaleciendo la hipótesis de que la *pars tuberalis* podría ejercer un papel importante en la mediación del efecto estacional de la melatonina (Weaber y Reppert, 1990; Nakazawa *et al.*, 1991; Skene *et al.*, 1992; Gauer *et al.*, 1993c; Stankov *et al.*, 1993). Pruebas a favor de esta hipótesis las encontramos en el hecho de que otras regiones encefálicas, como el núcleo supraquiasmático, que no tienen correlación con el ciclo reproductor, tampoco muestra estas variaciones estacionales, al menos en los mamíferos investigados (Gauer *et al.*, 1993c).

El perfil estacional de las densidades de sitios de unión en la tenca es muy similar en ambos tejidos centrales estudiados, las densidades medias diarias o mesor ( $A_0$ ) son elevadas en primavera, coincidiendo con el comienzo de la freza, mientras que los valores más bajos se miden en verano, una vez finalizado el período de desove en esta especie (Pinillos *et al.*, 2003). Esta evolución estacional se asemeja bastante al perfil en los mamíferos con reproducción primaveral (asociada a fotoperíodos largos), por lo que en la



tenca podríamos especular que también puede existir una relación entre receptores de melatonina y el ciclo reproductor. El único estudio relacionado, que conozcamos nosotros, es el realizado por Amano y colaboradores (2003a) en el salmón masou, que muestra variaciones significativas de la Bmax en el cerebro en función del grado de madurez sexual, los machos precoces tienen capacidades de unión superiores a las de las hembras inmaduras, igualándose las densidades tras la freza.

En este sentido, se conocen bien los ciclos reproductores estacionales en numerosas especies de peces y hay algunos estudios sobre efectos de la melatonina en dicha función gonadal (Zachmann *et al.*, 1992), pero carecemos de datos que relacionen por ejemplo, la densidad de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel con los ciclos reproductores o con los esteroides gonadales, y tampoco se han identificado las posibles áreas encefálicas implicadas en dicha regulación estacional. Con técnicas de biología molecular se ha detectado expresión de los receptores Mel 1a y Mel 1b en el área pretectal, región talámica y techo óptico del cerebro de *Oncorhynchus mykiss*, regiones relacionadas con funciones visuales, pero no en la hipófisis (Mazurais *et al.*, 1999, 2000), por lo que estas áreas parecen ser las implicadas en la integración de la señal de la melatonina, al menos en la trucha. Por otro lado, mediante técnicas autorradiográficas, aunque se han localizado sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en la hipófisis del lucio (Gaildrat y Falcón, 1999), la unión se ha detectado sólo en la región anteroventral de la hipófisis, donde no parecen existir células gonadotropas. Estos mismos autores han clonado en el lucio dos fragmentos que presentan homologías con los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, con una fuerte expresión en el techo óptico, y de menor intensidad en la retina y la hipófisis (Gaildrat *et al.*, 2002). Estos resultados reafirman los nuestros, apoyando la hipótesis que señala al techo óptico y área pretectal, regiones relacionadas con fenómenos de integración visual, como diana de la información transmitida por la melatonina. Desafortunadamente, los datos obtenidos hasta la fecha en la hipófisis no revelan de forma evidente que la melatonina pueda utilizar esta diana para la transmisión de la señal, por lo que aún falta por establecer cuáles serían las regiones encefálicas que integrarían la información ambiental (vía melatonina) sincronizando cambios estacionales en los peces, entre otros el ciclo reproductor. En este sentido, en la actualidad, existen equipos de investigación cuyos trabajos van encaminados a la búsqueda y localización de los genes reloj en diferentes áreas encefálicas.

En cuanto a la posible correlación entre los cambios estacionales en la densidad de receptores y los niveles de melatonina circulante hay que indicar que únicamente existe un estudio en la tenca que determina los niveles plasmáticos de melatonina en esta especie (Vera *et al.*, 2004) no teniendo información sobre posibles ritmos estacionales de melatonina plasmática. En la retina la ritmicidad diaria de producción de melatonina muestra su máxima

amplitud en verano y se pierde en las estaciones frías (otoño e invierno), con una producción muy baja en la época invernal (Guijarro, 2004). Esta baja producción de melatonina podría ser la responsable del incremento lento pero progresivo en la densidad de receptores observada en ambos tejidos centrales en esta época del año. Es decir, la existencia de ritmos estacionales de melatonina invertidos respecto a los ritmos de receptores en la retina de esta especie apoya, nuevamente, la regulación de los receptores por la propia melatonina. Sin embargo, aún no podemos determinar el mecanismo por el que se produce esta regulación, por desensibilización, control de la expresión génica, o incluso una acción sincronizadora sobre el oscilador circadiano. No obstante, el hecho de que exista una ritmicidad diaria de densidad de sitios de unión en la retina de la tenca durante el invierno (presente Memoria), estación en la que no hay ritmo diario de melatonina ocular (Guijarro, 2004) implica que, en caso de que la melatonina regule la ritmicidad diaria de receptores en esta especie, no debe ser el único elemento responsable, por lo que se impone la necesidad de identificar estas vías de regulación independientes de melatonina.

Por otro lado, y teniendo presente un enfoque funcional *in vivo*, la relevancia de la estacionalidad de los ritmos diarios en la densidad de receptores se relativiza teniendo en cuenta que el efecto de la temperatura en la cinética de asociación y disociación de los receptores de melatonina es muy potente (presente Memoria). Dicha cinética, a la baja temperatura propia de otoño-invierno está ralentizada, con lo que la interacción de la melatonina con sus receptores es lenta, lo que debe afectar necesariamente a la transducción de la señal. Por el contrario, en las estaciones cálidas (primavera y verano), la cinética de la interacción de la melatonina con sus receptores es rápida, y aunque no haya ritmos diarios de receptores, como la indolamina se sintetiza con una marcada ritmicidad en esta época del año, podría ejercer su acción diaria reguladora de la fisiología ocular, independientemente de la cantidad de receptores presentes.

### **3.2. Ritmicidad en tejidos periféricos.**

La oscilación diaria en la densidad de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el corazón de la tenca muestra un ritmo significativo en ambos sexos en otoño, rozando la significación estadística en invierno. El momento del fotociclo en el que se observan las mayores densidades de receptores coincide con las horas centrales del día ( $\varphi = 12:49 \pm 1:08$  h), además la amplitud sinusoidal es elevada ( $A_1 = 1,15 \pm 0,33$  fmol/mg prot), dando lugar a unas diferencias entre el mínimo y el máximo diario de hasta casi dos veces en otoño. Estas densidades de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el tejido cardiaco de la tenca son similares en machos y hembras, al igual que ocurre en la retina neural y el techo óptico de esta misma especie. La ausencia de dimorfismo sexual en los sitios de unión de melatonina es

una característica que también se ha descrito en receptores centrales de los mamíferos (Piketty, 2001).

En la tenca no hemos encontrado diferencias en la  $K_d$  en ninguna de las estaciones, pero si observamos una marcada estacionalidad en la capacidad de los sitios de unión. Las densidades son significativamente más altas en las estaciones que no muestran perfil rítmico (primavera y verano) que en otoño e invierno, cuando las diferencias día/noche son significativas. Esta estacionalidad es paralela a la obtenida en los tejidos centrales estudiados. Nuevamente el valor más elevado de la densidad media o mesor ( $A_0$ ) se produce en primavera y desciende de forma considerable, hasta valores mínimos en otoño. La única diferencia con la retina neural y el techo óptico reside en que las densidades más bajas en el corazón no se detectan en verano sino en otoño.

Por tanto, podemos afirmar que, en líneas generales, los perfiles rítmicos diarios de sitios de unión de melatonina en el corazón de la tenca coinciden con los obtenidos en los tejidos centrales (techo óptico y retina neural) de esta misma especie. En la bibliografía apenas existen estudios de ritmos diarios de capacidad y afinidad de sitios de unión de melatonina en tejidos periféricos de vertebrados, y se limitan a un número muy reducido de mamíferos, no existiendo ninguna información previa en los peces. Así, en la glándula mamaria de ratones la unión específica de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel a extractos de membranas es máxima al final de la fase luminosa del fotociclo diario, y la afinidad de los receptores también varía, siendo elevada durante la escotofase (Recio *et al.*, 1994). Estudios recientes confirman esta oscilación diaria, si bien los autores apuntan a una mayor complejidad, sugiriendo la existencia de dos clases de sitios de unión en la glándula mamaria de esta especie, uno de elevada afinidad que se expresa durante la noche, y otro de baja afinidad expresado mayoritariamente durante la fotofase (Coto-Montés *et al.*, 2003).

Existen varios estudios que relacionan la melatonina con la función cardiovascular en mamíferos y humanos. Los niveles fisiológicos elevados de melatonina durante la noche coinciden con el descenso de la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca (Arendt, 1989; Lemmer, 1989). La melatonina por vía oral reduce la presión sanguínea, el índice de pulsatilidad en la carótida interna y los niveles de catecolaminas (Arangino *et al.*, 1999), ejerce una acción vasodilatadora en las arterias coronarias, pulmonares y marginales del colon en el cerdo, en la aorta de conejo, arteria caudal de rata y arterias umbilicales humanas (Satake *et al.*, 1991; Doolen *et al.*, 1998; Ting *et al.*, 2000; Okatani *et al.*, 2001). Es decir, la melatonina parece tener de forma global un efecto reductor de la actividad cardíaca y del tono vasomotor, si bien el mecanismo es bastante desconocido y complejo, ya que por ejemplo, la activación de los receptores  $MT_1$  produce vasoconstricción, y la de  $MT_2$  produce vasodilatación (Doolen *et al.*, 1999).

En la bibliografía consultada por nosotros hemos encontrado un único estudio que relaciona la actividad cardiovascular y la melatonina en poiquilotermos. La administración de melatonina a dosis fisiológicas durante la noche reduce la presión sanguínea en el bacalao, la trucha y la platija (resultados no publicados, Kulczykowska, 2001). El hecho de encontrar una distribución importante de sitios de unión en el corazón de la tenca, y que además muestran todas las características propias de receptores de melatonina, del subtipo MT<sub>1</sub>, nos anima a especular sobre posibles funciones de estos receptores. En la tenca, la elevada densidad de receptores encontrada en el corazón en primavera y verano podría estar indicando un mayor protagonismo de este tejido como diana de la melatonina en esta época del año. Por tanto, la melatonina intervendría en la regulación estacional del sistema cardiovascular en los peces. Hasta la fecha no existen datos en la bibliografía que apoyen esta hipótesis. Para poder investigar esta cuestión, una primera aproximación necesaria sería analizar el papel de la melatonina en la regulación de la función cardiovascular. En este sentido, los diseños experimentales *in vitro* incubando segmentos vasculares en baño de órganos representan una herramienta de gran utilidad para poder ensayar efectos de la melatonina.

El otro órgano periférico cuya posible ritmicidad en los sitios de unión de melatonina ha sido investigada en el presente trabajo es el riñón. Al igual que en otras localizaciones centrales y periféricas, existe un ritmo diario significativo únicamente en otoño. El momento del día con la máxima densidad de receptores corresponde a la transición oscuridad/luz ( $\varphi = 7:40 \pm 1:04$  h). Del mismo modo, la amplitud sinusoidal más elevada se detecta en esta estación, siendo los valores más bajos aproximadamente la mitad de los máximos.

En relación con las variaciones mediodía-medianoche de la B<sub>max</sub> y la K<sub>d</sub> de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel, no encontramos diferencias significativas ni en la capacidad de unión máxima ni en la afinidad de los receptores en ninguna de las estaciones del año. Estos resultados, aunque en un principio puedan resultar contradictorios con los descritos en el estudio de ritmicidad estacional de densidades, en donde sí se aprecian diferencias rítmicas diarias en otoño, se justifican por el hecho de que en el riñón la acrofase en otoño no se sitúa en las horas centrales de la fotofase. Por tanto, al conservar el diseño experimental utilizado para los otros tejidos, es decir la determinación de unión máxima en los dos puntos centrales de la fotofase y de la escotofase, no se detecta dicha ritmicidad. Esta situación ilustra claramente la importancia de realizar muestreos completos a lo largo de las 24 horas, a pesar de la mayor complejidad que entraña y el mayor número de animales necesario para abordar el estudio.

En los vertebrados terrestres se ha detectado presencia de sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel en el riñón de numerosas especies de mamíferos y aves, habiéndose sugerido la

posibilidad de una acción directa de la melatonina en la actividad renal (Richardson *et al.*, 1992; Song y Pang, 1993; Song *et al.*, 1993, 1995, 1996b), probablemente mediada por receptores de tipo MT<sub>1</sub> (Song *et al.*, 1997). No existen estudios en poiquilotermos que hayan investigado esta cuestión. Sin embargo, estudios pioneros mostraron que la melatonina plasmática se incrementa durante la adaptación de *Oncorhynchus kisutch* al agua marina (Gern *et al.*, 1984), y estudios posteriores revelaron que la concentración plasmática de melatonina en truchas aclimatadas a aguas salobres es significativamente superior que en las aclimatadas a agua dulce (Kulczykowska, 1999), apuntando a una posible funcionalidad de la melatonina en la adaptación de los peces a distintas salinidades. El riñón, como órgano osmorregulador, interviene activamente en la regulación iónica en los peces, habiéndose observado cambios diarios en la concentración plasmática de iones monovalentes en varias especies de peces (Carrillo *et al.*, 1986; Kühn *et al.*, 1986; Laidley y Leatherland, 1988; Pavlidis *et al.*, 1997), y variaciones estacionales en el contenido plasmático de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y en la osmolalidad en el bacalao y en la platija (Audet *et al.*, 1993). Necesariamente estos cambios diarios y estacionales son un reflejo de variaciones en el intercambio iónico a través del epitelio branquial e intestinal y/o cambios en la excreción urinaria de electrolitos, lo que podría implicar a la melatonina en la mediación de dichos cambios de adaptación osmótica. En este sentido, estudios recientes sugieren una posible interacción entre melatonina y arginina-vasotocina, hormona osmorreguladora neurohipofisiaria en peces (Kulczykowska *et al.*, 2001). Además de la influencia de la melatonina sobre los movimientos de electrolitos y agua en los túbulos renales, se podría considerar un posible efecto sobre la hemodinámica renal. Los cambios en la presión sanguínea supuestamente inducidos por la melatonina pueden llegar a afectar a la filtración glomerular renal en peces, donde, y a diferencia de los mamíferos, la tasa de filtración glomerular aumenta de forma inmediata al incrementar la presión de perfusión renal (Nishimura y Bailey, 1982).

Nuestro estudio es el primero que caracteriza sitios de unión de melatonina en el riñón de poiquilotermos, y que podría justificar algunas de las acciones descritas para la melatonina en la función renal de los peces. Sin embargo, en el riñón de la tenca, y a diferencia de las evidencias en homeotermos que apuntan hacia receptores de elevada afinidad del tipo MT<sub>1</sub>, la melatonina parece estar actuando a través de receptores del tipo MT<sub>3</sub>. De hecho, la clonación de este subtipo de receptor se ha logrado en el riñón del hámster sirio (Nosjean *et al.*, 2000), indicando que dicho receptor puede ser el mediador de las funciones reguladoras de la melatonina en la fisiología renal. No obstante debemos recordar la necesidad de una caracterización farmacológica exhaustiva de los receptores de

melatonina en vertebrados poiquilotermos que nos permita dilucidar los subtipos de receptores presentes en estos vertebrados.

Hay una última cuestión interesante relacionada con el elevado valor de la constante de inhibición de la propia melatonina en el riñón de la tenca, y que podría cuestionar el papel fisiológico desempeñado por esta indolamina en la función renal. Según este elevado valor, sólo en presencia de concentraciones muy altas de melatonina se produciría la unión al receptor y su activación funcional. Datos recientes de melatonina circulante (Vera *et al.*, 2004) y de cambios estacionales en la melatonina ocular en la tenca (Guijarro, 2004) indican que estas concentraciones elevadas sólo se hallarían en primavera y fundamentalmente en verano, con lo que el papel de la melatonina regulando la función renal mostraría una marcada estacionalidad.

Nuestros datos en las branquias e incluso en el tracto gastrointestinal, aún a pesar de ser limitados apoyarían una hipotética función de la melatonina en estas estructuras que, junto al riñón, participan en la regulación de la homeostasis hidrosalina en los peces. Uno de los objetivos próximos de nuestro equipo es profundizar en la caracterización de estos sitios de unión utilizando peces dulceacuícolas en comparación con especies marinas, con el fin de investigar posibles diferencias en las estrategias adoptadas por estos dos grupos de peces.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que la función de los sitios de unión de melatonina en el riñón no esté relacionada con la homeostasis hidrosalina sino que, si se confirma la naturaleza enzimática de dicho sitio de unión, es decir, si se trata del homólogo en peces de la quinona reductasa 2 (QR<sub>2</sub>) de los mamíferos, su función se podría restringir a una actividad detoxificadora en el organismo.

### **3.3. ¿Son endógenos los ritmos de densidad de sitios de unión de melatonina en *Tinca tinca*?**

Tras someter a los animales a condiciones de oscuridad durante 48 horas, comprobamos que ninguno de los tejidos encefálicos estudiados conserva el ritmo día/noche en la densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel observado tanto en tejidos centrales (retina neural y techo óptico) como periféricos (corazón y riñón). Es decir, aparentemente, los ritmos de densidad de receptores de melatonina en la tenca no son endógenos.

Se han realizado algunos estudios en tres especies de teleósteos (carpín, lucio y dorada) imponiendo a los animales condiciones de curso libre, 24D, y, dependiendo de la especie, se han obtenido las dos posibles respuestas, conservación y pérdida de los ritmos de Bmax. Una de las especies de las que se tiene más información es el carpín, en el que tanto la pinealectomía como la exposición a luz constante anulan el ritmo de densidad de

sitios de unión en el cerebro (Iigo *et al.*, 1994b), por lo que aparentemente la regulación se realizaría por la propia melatonina endógena de origen pineal. Sin embargo la exposición a 24D no altera ni la ritmicidad de la Bmax ni el ritmo diario de melatonina plasmática (Iigo *et al.*, 2003b), estando por tanto sujetos a una regulación endógena. De hecho, en ensayos *in vitro* en condiciones de oscuridad constante la producción rítmica de melatonina tanto en pineales (Iigo *et al.*, 1991) como en copas ópticas (Iigo *et al.*, 1997c) se conserva inalterada. Estos resultados aparentemente contradictorios son justificados por los autores en base a posibles cambios en la relación de fases entre los ritmos de melatonina plasmática y de capacidad de unión de los receptores en función de si los peces son sometidos a condiciones de LD (12L:12D) o de DD. Es decir, el incremento en los niveles plasmáticos de melatonina se corresponde con un descenso de la densidad de receptores cuando los animales se encuentran en condiciones LD (12L:12D), mientras que en 24D ambos parámetros discurren en paralelo, son máximos durante el día subjetivo y mínimos durante la noche subjetiva (Iigo *et al.*, 2003b). Por tanto, en el carpín, la ritmicidad diaria de densidades de sitios de unión podría estar regulada por un reloj circadiano, si bien los ritmos quedan enmascarados por la acción de la luz y la melatonina endógena.

En el lucio los ritmos diarios de receptores de melatonina en el cerebro parecen estar regulados por un reloj circadiano, su persistencia tanto en condiciones de luz constante como de oscuridad constante son prueba de ello (Falcón *et al.*, 1996a). No obstante, se desconoce cuáles son los osciladores circadianos implicados en este control, si bien la pineal es un buen candidato para albergar el oscilador que controla dichos ritmos, de forma independiente de la melatonina circulante. Asimismo, en esta especie se ha demostrado que la secreción de melatonina pineal está regulada por un reloj circadiano intrapineal (Falcon, 1998).

Por el contrario, en especies como la tenca y la dorada no hay indicios de dicha regulación circadiana. En la dorada (*Sparus aurata*), que presenta ritmos diarios tanto en la densidad como en la afinidad de los receptores encefálicos de melatonina, se anulan dichos ritmos cuando los peces son sometidos a oscuridad constante, de forma similar a los resultados obtenidos en la tenca. En un intento de correlacionar el carácter endógeno de la ritmicidad de los receptores con los ritmos de la propia melatonina en la tenca, podemos añadir que también en 24D se produce la pérdida de la ritmicidad de la síntesis ocular de melatonina (Guijarro, 2004), al igual que sucede con los receptores. Esta coincidencia podría estar indicando que en la tenca, al menos los receptores de la retina, dependen de la melatonina ocular. No obstante, el hecho de que la pérdida de los ritmos de melatonina no produzca un aumento en la capacidad de unión de sus propios receptores apuntaría más bien a que la melatonina ejerce un papel fundamental en la sincronización del oscilador circadiano, que a su vez controlaría los ritmos de receptores de la indolamina en esta especie.

#### **4. EFECTOS DE LA LUZ Y LA TEMPERATURA EN LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LA RETINA Y TECHO ÓPTICO DE *Tinca tinca*.**

##### **4.1. Efecto de la luz**

Para investigar si las distintas intensidades lumínicas recibidas por el animal modifican la afinidad o la densidad de los receptores de melatonina en la tenca, dos grupos de peces se aclimataron a fotoperíodos 12L:12D, con dos intensidades distintas durante la fotofase (20 y 1300 lux), manteniendo constante la temperatura ambiental. Esta diferencia de intensidad luminosa durante la fotofase no afecta a la densidad nocturna de receptores ni en la retina neural ni en el techo óptico de la tenca, pero sí modifica los receptores diurnos, determinando la presencia de una mayor densidad en peces expuestos a luz de elevada intensidad. En estos mismos animales los niveles circulantes de melatonina se modifican en el sentido de un aumento de la melatonina plasmática nocturna en el grupo expuesto a alta intensidad luminosa, sin verse afectada la concentración de melatonina circulante durante la fotofase (Vera *et al.*, 2004). Como se ha discutido con anterioridad en esta Memoria, la melatonina en la tenca podría ser responsable de una autorregulación diaria de sus propios receptores. Sin embargo, los resultados encontrados no parecen apoyar esta hipótesis, ya que distintas intensidades luminosas no modifican a la melatonina diurna, pero aumentan significativamente la densidad de los sitios de unión. Más aún, el aumento nocturno de melatonina circulante no se corresponde con una reducción de la capacidad máxima de unión de estos tejidos.

No existen estudios en la bibliografía que hayan investigado si la intensidad lumínica diurna afecta a los receptores de melatonina. En nuestro caso parece que sí tiene un efecto significativo, que se manifiesta tanto en la retina como en el techo óptico, a pesar de que hay una diferencia funcional evidente entre ambas estructuras. La retina neural posee células fotorreceptoras capaces de percibir la información lumínica de forma directa, y por tanto en este tejido la luz podría regular directamente la expresión de los receptores de melatonina intraoculares, de forma independiente de la melatonina. Sin embargo, en el techo óptico este hipotético efecto directo de la luz no se puede dar, por lo que la regulación de los sitios de unión por este factor ambiental debe estar mediada a través de otros mecanismos desconocidos hasta el momento.

En una aproximación experimental complementaria, estudiamos el posible efecto de la exposición durante 1 hora a luces de diferentes intensidades en mitad de la escotofase. Los resultados encontrados indican que la exposición durante 1 hora a un pulso de luz de baja intensidad (1 lux) provoca aumentos significativos en la densidad de receptores de 2-[<sup>125</sup>I]-Mel, sin que la afinidad de los mismos se vea afectada. Este efecto resulta llamativo, debido a que no se produce a intensidades luminosas superiores. La explicación más



sencilla que justificaría este efecto de la luz sobre los receptores cabría encontrarla en alteraciones de la producción de melatonina por la exposición a la luz, que en último término serían las responsables de los cambios de densidades de sitios de unión. En este mismo experimento, el equipo del Dr. Sánchez-Vázquez de la Universidad de Murcia cuantificó los niveles circulantes de melatonina en estos mismos peces, encontrando que la melatonina nocturna se reduce significativamente hasta alcanzar valores similares a los diurnos en los cuatro grupos de peces, no existiendo diferencias significativas en dicha reducción al comparar las distintas intensidades de luz (desde 0,3 a 1300 lux, Vera *et al.*, 2004). Este resultado justifica el aumento de la densidad en el grupo expuesto a 1 lux, pero no explica la falta de respuesta de los receptores en los restantes grupos.

En un estudio reciente realizado en el lábrido (*Halichoeres tenuispinnis*), se muestra que cambios agudos en la intensidad de luz durante la fotofase no modifican significativamente el contenido de melatonina ocular, y en un amplio intervalo de intensidades (0,13 a 1300 lux) la síntesis de melatonina no se ve significativamente afectada (Iigo *et al.*, 2003b). De forma complementaria, en un experimento similar al realizado por nosotros en la tenca, encuentran que la exposición aguda a luz de distintas intensidades durante la fase oscura del fotociclo reduce de forma significativa la melatonina ocular, descenso que a partir de 1,3 lux es de una magnitud similar en todos los grupos (1,3; 13; 130 y 1300 lux). Por tanto, en relación con el efecto de la exposición a la luz sobre la producción de melatonina parece que el efecto máximo se alcanza a partir de una determinada intensidad lumínica. En este estudio del Dr. Iigo no se analizan los receptores de melatonina, con lo que no podemos compararlo con nuestros resultados.

Efectos de la exposición aguda a la luz sobre los niveles de melatonina en plasma, en tejido ocular y en el complejo pineal se han descrito en varias clases de vertebrados. (Binkley, 1987; Max y Menaker, 1992; Yu y Reiter, 1993; Bolliet *et al.*, 1995; Ekström y Meissl, 1997), y de forma general puede afirmarse que la melatonina ocular es un buen indicador de fotorrecepción, estando su síntesis estrechamente relacionada con la fotorrecepción tanto ocular como pineal.

Un aspecto que ha sido también investigado en estos diseños experimentales es la ritmicidad de la actividad locomotora. La tenca es una especie cuyo hábitat natural son los fondos fangosos de charcas y cursos lentos, donde a pesar de su alta resistencia a condiciones ambientales adversas, muestra una elevada sensibilidad a agentes estresantes de distinto origen. Además, se trata de una especie estrictamente nocturna, que muestra ritmos robustos de actividad locomotora y alimentación vinculados a la fase oscura del fotoperiodo diario (Sánchez-Vázquez, comunicación personal). La exposición a la luz durante la noche reduce drásticamente su actividad locomotora, volviéndola a recuperar tras

la reanudación de la oscuridad (Vera *et al.*, 2004). Nuestros datos de aumentos en la densidad de receptores en peces expuestos a intensidades bajas (1 lux) constituyen una respuesta adaptativa a los resultados de supresión de la producción de melatonina y actividad locomotora. Es decir, en una especie estrictamente nocturna como la tenca, la luz de muy baja intensidad durante la noche es una señal percibida por el sistema de producción de melatonina (Vera *et al.*, 2004), pero que además modifica los receptores que van a transmitir la señal en el sentido de una mayor capacidad de transducción de este mensaje. No obstante, una exposición de corta duración, como la que hemos aplicado (1 hora) que es obviamente suficiente para inhibir tanto la síntesis nocturna de melatonina como la actividad locomotora, quizá sea un tiempo excesivamente breve para generar cambios significativos tanto en la densidad como en la afinidad de los receptores. Tanto el hipotético proceso de desensibilización como la inducción de la expresión génica de los receptores requieren tiempos más largos para poder manifestar variaciones estables en la capacidad de unión o en la afinidad. Nuestros resultados de variaciones diarias en la densidad de los receptores en tejidos centrales y periféricos de la tenca apoyan la posibilidad que acabamos de plantear.

En el techo óptico de la tenca, encontramos una respuesta adicional. La exposición durante 1 hora a una intensidad elevada (1300 lux) reduce ligeramente, pero de forma significativa la densidad máxima de receptores y la  $K_d$ . No tenemos una explicación a este efecto, pero es cierto que el techo óptico es el área cerebral de integración de la información lumínica, la luz es captada por las células fotorreceptoras, y esta información viaja al techo óptico, por lo que esta región podría proponerse como la zona encefálica implicada en la regulación de varias funciones rítmicas sincronizadas por el ciclo luz/oscuridad, entre las cuales la actividad locomotora constituye un excelente ejemplo en animales de comportamiento estricto, como es la tenca. Apenas existen estudios al respecto, y de nuevo, a partir de todos estos resultados queda abierta una vía de investigación en la que el diseño de nuevos experimentos permitirá completar el conocimiento actual del papel de la luz en la regulación de la ritmicidad de los receptores de melatonina.

#### **4.2. Efecto de la temperatura.**

La temperatura del ensayo no afecta a la afinidad de los receptores de melatonina por su ligando, como se deduce de los resultados obtenidos en los ensayos de saturación realizados tanto en la retina neural como en el techo óptico, siendo los valores de  $K_d$  muy similares a las 3 temperaturas ensayadas. Respecto a las densidades, se produce un descenso a 30°C en comparación con las otras dos temperaturas (15°C y 25°C), pero únicamente en la retina. Estos resultados coinciden con lo encontrado en distintas regiones

encefálicas de otro poiquilotermo, la *Rana perezi*, cuyos parámetros obtenidos del estudio de saturación ( $B_{max}$  y  $K_d$ ) no difieren en ensayos realizados a 15°C y a 25°C (Isorna *et al.*, 2004b). Por tanto, proponemos que la temperatura del ensayo no modifica significativamente ni la  $K_d$  ni la  $B_{max}$  en preparaciones de membranas de cerebro de poiquiloterms, y no encontramos un posible significado fisiológico al descenso de la  $B_{max}$  observado en la retina neural de la tenca.

Sin embargo, el estudio cinético revela claramente que las cinéticas de asociación y disociación dependen notablemente de la temperatura del ensayo en ambos tejidos, retina y techo óptico. Tal y como cabría esperar, a medida que aumenta la temperatura se acorta el tiempo necesario tanto para que se alcance el equilibrio en la asociación como para lograr la disociación completa. Así, a 15°C la tasa de asociación es aproximadamente la mitad que a 25°C, que a su vez también es la mitad de la medida a 30°C. Lo mismo ocurre con las tasas de disociación, obteniéndose los valores más bajos a 15°C, valores que aumentan de forma paralela al incremento de la temperatura del ensayo. Además, el hecho de que los valores de  $K_d$  cinéticas permanezcan inalterados a las distintas temperaturas evidencia que estos cambios cinéticos se producen de forma paralela en ambos procesos, asociación y disociación. Un resultado similar se ha descrito para la retina neural del anfibio *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2004b). En el techo óptico de la tenca encontramos una diferencia llamativa en relación con lo que ocurre en la retina neural, consistente en que el aumento de temperatura del ensayo de 25°C a 30°C no provoca un cambio tan drástico en las cinéticas de asociación y disociación como el observado en la retina, encontrando cinéticas muy similares a ambas temperaturas. En la actualidad no tenemos una explicación a esta diferencia entre tejidos, aunque no es la única diferencia encontrada a lo largo de esta Memoria, por lo que podría deberse a peculiaridades propias de los sitios de unión presentes en ambas regiones.

Por tanto, podemos afirmar que la unión de la melatonina a la retina neural de la tenca es un proceso muy termosensible, al igual que sucede en otros poiquiloterms, como *Rana perezi*. Temperaturas de 15°C o inferiores provocan que tanto la asociación como la disociación requieran bastantes horas para ser completadas y, en consecuencia, a estas temperaturas, las cinéticas de unión pueden llegar a ser demasiado lentas para ser capaces de seguir el patrón rítmico diario de melatonina. Sin embargo, el hecho de que se necesiten tiempos superiores a 24 horas para que se completen las cinéticas de asociación y disociación a bajas temperaturas (inferiores a 15°C) podría tener un significado fisiológico durante el invierno, apuntando a la temperatura como principal factor ambiental regulador de la transducción de la señal de la melatonina en diferentes poiquiloterms, la tenca (presente Memoria) y la rana (Isorna *et al.*, 2004b). En este sentido es cierto que en la

múltiples funciones estacionales, como el ciclo reproductor, la termorregulación, la osmorregulación, el desarrollo ontogénico, los ritmos de alimentación, etc, la temperatura es clave para la sincronización de la función con el momento del año más adecuado (Delgado *et al.*, 1983, 1987; Kupwade y Saidapur, 1986; Alonso-Bedate *et al.*, 1988; Alonso-Gómez *et al.*, 1990; Gancedo *et al.*, 1995).

El coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ) es un parámetro muy útil en fisiología que nos permite analizar las relaciones entre las velocidades de las funciones biológicas y la temperatura (Hill y Wyse, 1992). Los valores de la  $Q_{10}$  para la asociación en la retina neural y en el techo óptico son muy superiores a 1 en todos los intervalos térmicos medidos, lo que estaría indicando una compensación térmica completa, un aumento homogéneo y continuo de la tasa de asociación con la temperatura. Este comportamiento no se produce en la tasa de disociación de la retina neural, en la que el valor de la  $Q_{10}$  observado en el intervalo de 15-25°C es bastante superior al encontrado en el siguiente intervalo, 25-30°C, es decir, disminuye la sensibilidad térmica de la cinética de disociación a temperaturas de ensayo elevadas (superiores a 25°C), diferencia que también se manifiesta en los coeficientes aplicados a la  $K_d$  cinética. La justificación a esta diferencia entre asociación y disociación la encontramos en el descenso de sensibilidad térmica de la tasa de disociación a 30°C. En el caso de las enzimas, un mecanismo de modulación térmica positiva de este tipo se considera como una estrategia adaptativa efectiva para proporcionar una compensación inmediata de la actividad enzimática frente a los cambios de temperatura, como se ha demostrado para la actividad AA-NAT ocular, enzima limitante de la ruta biosintética de melatonina, en la *Rana perezi* (Alonso-Gómez *et al.*, 1992b). En el caso que nos ocupa de los receptores de melatonina, podemos encontrar un cierto paralelismo con lo descrito para la actividad enzimática. Así, en los ensayos de saturación realizados a distintas temperaturas, a partir de un mismo homogeneizado de membranas, una temperatura de ensayo de 30°C reduce significativamente la capacidad de unión, en comparación con las densidades obtenidas a temperaturas de ensayo inferiores (15°C y 25°C), pero no afecta a la afinidad de los receptores por la 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina. Es decir, la aceleración de la cinética de interacción de la melatonina con su ligando, provocada por el aumento de temperatura puede estar siendo contrarrestada con una disminución de su capacidad de unión.

En el riñón los ensayos cinéticos se realizaron únicamente a dos temperaturas distintas, 4°C y 25 °C, hallando resultados espectacularmente distintos a los que acabamos de discutir para los tejidos centrales. Así, a temperatura baja (4°C) se requieren tan sólo 10 segundos para que se alcance el equilibrio, diferencia notable con lo observado tanto en la retina neural como en el techo óptico de la tenca donde la menor temperatura de las

ensayadas (15°C) prolonga hasta en 120 minutos el tiempo requerido para que se alcance el equilibrio en la asociación. Esta diferencia se aprecia claramente en el valor de la tasa de asociación, que es aproximadamente 50 veces superior en el riñón. Una situación similar ocurre con la disociación, que se completa en 100 segundos, siendo la tasa de disociación más de 1000 veces superior en el riñón que en los tejidos centrales, retina neural y el techo óptico. En cambio, en las incubaciones de extractos de membranas renales realizadas a temperatura alta (25°C), a diferencia de lo que ocurre en la retina neural y el techo óptico de la tenca, no se alcanza el equilibrio en la asociación y, por supuesto, tampoco se produce la completa disociación. Este comportamiento cinético no se corresponde con el de un receptor típico, con lo que en el riñón de la tenca y, presumiblemente también en otros tejidos en los que hemos detectado sitios de unión con características similares a las del tejido renal, estos sitios de unión no serían tales receptores, sino que el radioligando podría estar uniéndose a una proteína con carácter enzimático.

En este sentido, Nosjean *et al.* (2000) han purificado mediante procedimientos bioquímicos clásicos el sitio de unión para la 2-[<sup>125</sup>I]-Mel denominado MT<sub>3</sub>, a partir de extractos de membranas procedentes de riñón del hámster, y se ha identificado mediante secuenciación parcial como el homólogo en el hámster de la quinona reductasa 2 (QR<sub>2</sub>) de humanos, presentando una elevada identidad entre ambas, 57 aminoácidos son idénticos de los 71 de los que consta esta enzima. Numerosos indicios sostienen esta hipótesis. El primero de ellos es que el sitio de unión denominado MT<sub>3</sub> muestra siempre cinéticas de asociación y disociación muy rápidas (Molinari *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 1999), y su caracterización farmacológica mediante técnicas clásicas así lo sugiere. En segundo lugar, tanto MT<sub>3</sub> como QR<sub>2</sub> presentan propiedades hidrofóbicas peculiares, no comportándose como genuinas proteínas de membrana. El MT<sub>3</sub> se puede separar de las membranas del riñón del hámster en ausencia de detergente, recuperándose la misma cantidad en el sobrenadante que en el precipitado tras la ultracentrifugación (Nosjean *et al.*, 2000). En tercer lugar, durante la purificación se aprecia una buena correlación entre la capacidad de unión de [<sup>125</sup>I]-5-MCA-NAT (ligando del MT<sub>3</sub>) y la reducción enzimática de la menadiona (sustrato de la QR<sub>2</sub>). Por último, se ha purificado QR<sub>2</sub> utilizando un ligando típico del receptor MT<sub>3</sub>, el 5-MCA-NAT, que presenta una muy reducida similitud estructural con los sustratos o inhibidores conocidos de la QR<sub>2</sub>. A pesar de todos estos indicios, se requiere la obtención de datos moleculares adicionales que demuestren la identidad entre MT<sub>3</sub> y QR<sub>2</sub>. En este sentido, tras la transfección del gen QR<sub>2</sub> a células CHO, estas células expresan el sitio de unión MT<sub>3</sub>, lo que conduce a una identificación sin duda posible de MT<sub>3</sub> como el homólogo en hámster de QR<sub>2</sub> humano (Nosjean *et al.*, 2000).

A fin de establecer posibles relaciones cruzadas interesantes, sería de gran utilidad comparar las propiedades de los ligandos  $MT_3$  (5-MCA-NAT, NAS, melatonina y S26533) con los ligandos melatoninérgicos específicos de receptores  $MT_1$  y  $MT_2$  (luzindol, serotonina y triptamina), así como con los compuestos QR-activos (menadiona, BNAH, dicumarol y estradiol) entre  $MT_3/QR_2$  de hámster y la  $QR_2$  de humanos. En este sentido, en el único estudio que se ha realizado, la unión de [ $^{125}I$ ]-5-MCA-NAT y los datos de actividad enzimática  $QR_2$  se corresponden, y los compuestos evaluados muestran afinidades relativas similares a  $MT_3/QR_2$  del hámster y a la  $QR_2$  de humanos (Nosjean *et al.*, 2001).

En el tejido renal de la tenca, los órdenes de afinidad obtenidos en la caracterización farmacológica son muy similares a los descritos para el riñón del hámster. Por otro lado, los estudios cinéticos muestran unas cinéticas de asociación y disociación extremadamente rápidas. Por estos motivos, así como por el hecho de que en el riñón del hámster se ha descrito la presencia de sitios de unión del tipo  $MT_3$ , clonados como  $QR_2$ , creemos que en el riñón de la tenca podría existir una población de sitios de unión descritos como  $MT_3$ , que se corresponderían posiblemente con el homólogo de la quinona reductasa  $QR_2$ . Por tanto, además de los receptores de melatonina acoplados a proteínas G ( $MT_1$  y  $MT_2$ ), y la AA-NAT, nos encontraríamos ante un cuarto tipo de estructura molecular involucrada en el control de algunas de las funciones reguladas por la melatonina, como podría ser, por ejemplo la osmorregulación, como hemos sugerido en la presente Memoria.

Otra posible explicación a los resultados que hemos obtenido podría ser la coexistencia en este tejido, y posiblemente también en otros tejidos periféricos (branquias y tracto gastrointestinal), de receptores y enzimas del tipo  $QR_2$ , ya que a partir del estudio del efecto del GTP sobre la unión de 2-[ $^{125}I$ ]-Mel se deduce la existencia en el riñón de receptores acoplados a proteínas G con características diferentes a las que presentan los receptores caracterizados tanto en los tejidos centrales como en el corazón de este teleósteo. La caracterización farmacológica obtenida en la presente Memoria también apoyaría esta posibilidad, con lo que no podemos excluir la existencia de un auténtico receptor.

Una última hipótesis que también explicaría las características tan especiales de los sitios de unión presentes en el riñón de la tenca, es que la enzima  $QR_2$  de esta especie de teleósteo puede estar interactuando con otra proteína que una GTP y sus análogos, es decir, algún tipo de proteína G no acoplada a receptor de membrana. En este sentido, se ha descrito que otra enzima de la misma familia, la NADH:Ubiquinona oxidoreductasa del Complejo I mitocondrial, interacciona específicamente con una proteína G, que además tiene una función reguladora del complejo (Hedge, 1998). Esta analogía podría extenderse al sitio de unión del riñón de la tenca ( $MT_3$ ). La clonación de estos sitios de unión permitirá

aclarar estas cuestiones y definitivamente confirmar o rechazar la hipótesis de la existencia de un nuevo subtipo de receptor denominado  $MT_3$  en determinados tejidos periféricos.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. Por primera vez se demuestra la existencia y se describe la distribución de sitios de unión de melatonina en el teleósteo *Tinca tinca*. La tenca posee una elevada densidad de receptores en tejidos oculares (retina neural, epitelio pigmentado e iris) y en un área del sistema nervioso central implicada en la integración visual, el techo óptico. Esta distribución apoya el papel clave que ejerce la melatonina en la regulación de las funciones visuales y su integración. El corazón, las branquias, el riñón y el tracto digestivo anterior muestran, entre los tejidos periféricos no neurales, la mayor densidad de sitios de unión de melatonina en esta especie.
2. Las curvas de saturación y el análisis de Scatchard revelan la existencia de un tipo homogéneo de sitio de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina de alta afinidad en la retina neural, el techo óptico y el corazón. En dichos sitios de unión el ligando se une de forma estable, saturable, reversible y específica, por lo que se cumplen los criterios requeridos para ser considerados verdaderos receptores.
3. Basándonos en la clasificación propuesta para los mamíferos, la caracterización farmacológica de los receptores en la retina neural, el techo óptico y el corazón indica claramente que la población de receptores presentes en estos tejidos de la tenca pertenecen a una misma familia, la de los receptores de melatonina de alta afinidad, denominados MT<sub>1</sub>.
4. El sitio de unión para melatonina caracterizado en el riñón de la tenca muestra una baja afinidad por el ligando, significativamente inferior a la encontrada en los restantes tejidos estudiados. Además, su farmacología es bastante más próxima al sitio de unión de baja afinidad, denominado MT<sub>3</sub>, propuesto para el riñón del hámster. Por tanto, sugerimos que en el riñón de la tenca nos encontramos ante un sitio de unión de melatonina diferente, que muestra todos los indicios cinéticos y farmacológicos del subtipo de receptor MT<sub>3</sub>.
5. El hecho de que los sitios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-Melatonina en todos los tejidos investigados en la tenca sean sensibles al sodio y a los análogos del GTP, nos permite proponer que, muy probablemente, estamos ante receptores de membrana acoplados a proteínas G, y en concreto de los subtipos G<sub>i/o</sub>. La potencia inhibitoria variable del GTPγS dependiendo del tejido, sugiere la existencia de diferencias cuantitativas y/o cualitativas en el contenido de proteínas G de los distintos tejidos diana para la melatonina.

6. La densidad de los receptores de melatonina, pero no la afinidad, muestra una clara ritmicidad tanto diaria como estacional, siendo el otoño y el invierno las estaciones en que existe una evidente ritmicidad día/noche. En todos los casos, el patrón rítmico diario es similar, con la acrofase situada durante la fotofase. Las densidades medias de receptores también se modifican significativamente a lo largo del ciclo anual, encontrando en algunos casos una correlación con la ritmicidad diaria de melatonina, que podría sugerir, una autorregulación de los receptores por su ligando endógeno.
  
7. La intensidad luminosa recibida durante la fotofase determina la densidad de los receptores de melatonina en la retina y el techo óptico de la tenca, produciendo la intensidad de luz elevada (1300 lux) un aumento significativo de la cantidad de receptores durante la fotofase. Sin embargo los receptores durante la fase oscura del fotociclo diario no parecen verse afectados de forma clara por la aplicación de pulsos de luz (1 hora) de intensidad variable en mitad de la escotofase.
  
8. La dinámica de la interacción del radioligando con el receptor es un proceso muy termosensible en la retina y el techo óptico de la tenca. Las tasas de asociación y disociación se aceleran notablemente con la temperatura del ensayo, y la constancia térmica de la  $K_d$  de los receptores en estos tejidos indica que este efecto de la temperatura es compensado de forma precisa. Estos resultados nos permiten proponer que la temperatura en la tenca es un factor clave en la regulación de la transducción de la señal diaria y estacional de la melatonina.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- ACUNA D., GARCÍA DEL RÍO C., GARCÍA-TORRES L., LUNA J. y OSORIO C. (1984). Role of pineal gland in kidney adrenal homeostasis. *Horm. Metab. Res.* **16**:589-592.
- ACUÑA-CASTROVIEJO D., REITER, R.J. y MENÉNDEZ-PELAEZ A. (1994). Characterization of high affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal Res.* **16**:100-112.
- ACUÑA-CASTROVIEJO D., ESCAMES G., MACÍAS M., MUÑOZ-HOYOS A., MOLINA-CARBALLO A., ARAUZO M., MONTES R. y VIVES F. (1995). Cell protective role of melatonin in the brain. *J. Pineal Res.* **19**:57-63.
- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. y WATSON J.D. (Eds.) (1995). Cell signaling, via G-protein-linked cell-surface receptors. En: *Molecular biology of the cell, Part III: Internal organization of the cell*. Garland Publishing. New York, London. pp. 734-759.
- ALONSO-BEDATE M., DELGADO M.J. y CARBALLADA R. (1988). In vitro effect of melatonin and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) on testicular function in *Rana temporaria*. *J. Pineal Res.* **5**:323-332.
- ALONSO-GÓMEZ A.L., TEJERA M., ALONSO-BEDATE M. y DELGADO M.J. (1990). Response to pinealectomy and blinding in vitellogenic female frog (*Rana perezii*) subjected to high temperature in autumn. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **68**:94-98.
- ALONSO-GÓMEZ A.L., ALONSO-BEDATE M. y DELGADO M.J. (1992b). Thermal sensitivity and effect of temperature acclimation on ocular serotonin N-acetyltransferase activity in *Rana perezii*. *Neurosci. Lett.* **142**:187-190.
- ALONSO-GÓMEZ A.L., DE PEDRO N., GANCEDO B., ALONSO-BEDATE M., VALENCIANO A.I. y DELGADO M.J. (1994). Ontogeny of ocular serotonin-N-acetyltransferase activity daily rhythm in four anuran species. *Gen. Comp. Endocrinol.* **94**:357-365.
- ALONSO-GÓMEZ A.L. y IUVOME P.M. (1995a). Role of calmodulin in the regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in cultured chick retinal photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**:S512.
- ALONSO-GÓMEZ A.L. y IUVOME P.M. (1995b). Melatonin biosynthesis in cultured chick retinal photoreceptor cells: calcium and cyclic AMP protect serotonin N-acetyltransferase from inactivation in cycloheximide-treated cells. *J. Neurochem.* **65**:1054-1060.
- ALONSO-GÓMEZ A.L., VALENCIANO A.I., ALONSO-BEDATE M. y DELGADO M.J. (2000). Melatonin synthesis in the greenfrog retina in culture: II. Dopaminergic and adrenergic control. *Life Sci.* **66**:687-695.

- AMANO M., IIGO M., IKUTA K., KITAMURA S. y YAMAMORI K. (2003a). Characterization and maturational differences of melatonin binding sites in the masu salmon brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* **131**:338-344.
- AMANO M., IIGO M., IKUTA K., KITAMURA S. y YAMAMORI K. (2003b). Daily variations in melatonin binding sites in the masu salmon brain. *Neurosci. Lett.* **350**:9-12.
- ANTOLIN I., OBST B., BURKHARDT S. y HARDELAND R. (1997). Antioxidative protection in a high-melatonin organism: the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin. *J. Pineal Res.* **23**:182-190.
- ARANGINO S., CAGNACCI A., ANGIOLUCCI M. VACCA A.M., LONGU G., VOLPE A. y MELIS G.B. (1999). Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am. J. Cardiol.* **83**:1417-1419.
- ARENDE J. (1985). Mammalian pineal rhythms. *Pineal Res. Rev.* **3**:161-213.
- ARENDE J. (1989). Melatonin and the pineal gland. En: Arendt J., Minors D.S., Waterhouse J.M. (Eds.). *Biological rhythms in clinical practice*. Butterworths. Boston. pp. 184-206.
- ASPLUND R., ABERG H. y WETTERBERG L. (1998). The seasonal interrelationship between melatonin, vasopressin, and serum osmolality in elderly subjects. *J. Pineal Res.* **25**:67-72.
- AUDET C., BESNER M., MUNROE J. y DUTIL J.-D. (1993). Seasonal and diel variations of various blood parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and american plaice (*Hippoglossides platessoides*). *Can. J. Zool.* **71**:611-618.
- AVENDANO G., BUTLER B.J. e IUVONE P.M. (1990). K<sup>+</sup> evoked depolarization increases serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched retinal cell cultures. Involvement of calcium influx through L-type calcium channels. *Neurochem. Int.* **17**:117-126.
- BARBAROSSA C., DeMARTINO C., PERUZY D. y TORLONIA G. (1960). The pituitary-pineal antagonism. *Acta Endocr.* **51**:79-80.
- BARRET P., MacLEAN A., DAVIDSON G. y MORGAN P.J. (1996). Regulation of the Mel 1a melatonin receptor mRNA and protein levels in the ovine pars tuberalis: evidence for a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-independent Mel 1a receptor coupling and an autoregulatory mechanism of expression. *Mol. Endocrinol.* **10**:892-902.
- BARTIANELLI E. y POCHET R. (1994). Calmodulin immunoreactivity in the chicken pineal gland: comparison with calbindin-D28K, calretinin, and S100. *Anat. Rec.* **238**:207-212.

- BAYARRI M.J., MADRID J.A. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J. (2002). Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin. *J. Pineal Res.* **32**:1-7.
- BAYARRI M.J., ROL DE LAMA M.A., MADRID J.A. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J. (2003). Both pineal and lateral eyes are needed to sustain daily circulating melatonin rhythms in sea bass. *Brain Res.* **969**:175-182.
- BAYARRI M.J., GARCÍA-ALLEGUE R., MUÑOZ-CUETO J.A., MADRID J.A., TABATA M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J. e IIGO M. (2004a). Melatonin binding sites in the brain of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Zool. Sci.* **21**:427-434.
- BAYARRI M.J., IIGO M., MUÑOZ-CUETO J.A., ISORNA E., DELGADO M.J., MADRID J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ J.A. y ALONSO-GÓMEZ A.L. (2004b). Binding characteristics of melatonin receptors in the retina and brain areas of the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Brain Res.* (En revisión).
- BEHAN W.M., McDONALD M., DARLINGTON L.G. y STONE T.W. (1999). Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br. J. Pharmacol.* **128**:1754-1760.
- BESANCON R., SIMONNEAUX V., JOUVET A., BELIN M.F. y FEVREMONTAGNE M. (1996). Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Mol. Brain Res.* **40**:136-138.
- BESHARSE J.C. y DUNIS D.A. (1983). Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. *Science* **219**:1341-1343.
- BESHARSE J.C., IUVONE P.M. y PIERCE M.E. (1988). Regulation of rhythmic photoreceptor metabolism: a role for post-receptor neurons. *Prog. Retinal Res.* **7**:21-61.
- BILBO S.D. y NELSON R.J. (2002). Melatonin regulates energy balance and attenuates fever in Siberian hamsters. *Endocrinology* **143**:2527-2533.
- BINKLEY S.A. (1987). The pineal: endocrine and nonendocrine function. *Prentice-Hall*. New Jersey.
- BIRAU N., PETERSSSEN U., MEYER C. y GOTTSCHALK J. (1981). Hipotensive effect of melatonin in essential hypertension. *IRCS Medical Science* **9**:906.
- BIRNBAUMER L., CODINA J., MATTERA R., CERIONE R.A., HILDEBRANDT J.D., SUNYER T., ROJAS F.J., CARON M.G., LEFKOWITZ R.J. y IYENGAR R. (1985). Regulation of hormone receptors and adenylyl cyclases by guanine nucleotide binding N protein. *Rec. Prog. Horm. Res.* **41**:41-99.
- BIRNBAUMER L., ABRAMOWITZ J. y BROWN A.M. (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1031**:163-224.

- BITTMAN E.L. (1993). The sites and consequences of melatonin binding in mammals. *Amer. Zool.* **33**:200-211.
- BITTMAN E.L. y WEABER D.R. (1990). The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe. *Biol. Reprod.* **43**:986-993.
- BLAZYNSKY C. y DUBOCOVICH M.L. (1991). Localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *J. Neurochem.* **56**:1873-1880.
- BOLLIET V., FALCÓN J. y ALI M.A. (1995). Regulation of melatonin secretion by light in the isolated pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*). *J. Neuroendocrinol.* **7**:535-542.
- BRANDEN C. y TOOYE J. (1999). Signal transduction. En: Introduction to protein structure, Part II: Structure, function and engineering. Garland Publishing, New York, London. pp. 251-281.
- BROOKS D.S. y CASSONE V.M. (1992). Daily and circadian regulation of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding in the chicken brain. *Endocrinology* **131**:1297-1304.
- BRYDON L., ROKA F., PETIT L., DE COPPET P., TISSOT M., BARRET P., MORGAN P.J., NANOFF C., STROSBURG A.D. y JOCKERS R. (1999). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol. Endocrinol.* **13**:2025-2038.
- BRYLINSKA M. y DLUGOSZ M. (1978). Variations of the egg diameter of tench (*Tinca tinca* L.) on the background of the annual macro- and microscopic changes occurring in the ovary of mature females. *Rocz. Nauk. Rol. Ser. H.* **99**:23-46.
- BRYLINSKA M., BRYLINSKI E. y MIECZKOWSKI K. (1979). The effect of individual features upon the fecundity of tench female (*Tinca tinca* L.) in several lakes of the Mazurian and Chelminsko-Dobrzynskie lake. *Districts. Rocz. Nauk Rol., Ser. H.* **99**:25-54.
- BUBENIK G.A. y PANG S.F. (1997). Melatonin levels in the gastrointestinal tissue of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* **106**:415-419.
- CAHILL G.M. (1996). Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res.* **708**:177-181.
- CAHILL G.M. y BESHARSE J.C. (1989). Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:1098-1102.
- CAHILL G.M. y BESHARSE J.C. (1990). Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: limitation by serotonin availability. *J. Neurochem.* **54**:716-719.
- CAHILL G.M. y BESHARSE J.C. (1991). Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J. Neurosci.* **11**:2959-2971.

- CAHILL G.M., GRACE M.S. y BESHARSE J.C. (1991). Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and the ocular circadian clock. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**:529-560.
- CARLSON L.L., WEABER D.R. y REPPERT S.M. (1989). Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology* **125**:2670-2676.
- CARRILLO M., ZANUY S., MONTORO R. y OLLEVIER F. (1986). Daily patterns of blood electrolytes in sea bass adapted to different osmotic media at different times of the year. *J. Interdisc. Cycle Res.* **17**:69-80.
- CASE J.D. y WRIGHT M.R. (1960). Effect of O-methoxylation and other substitutions of indoles on lightening of frog melanocytes (Abstract). *Federation Proc.* **19**:282.
- CASSONE V.M., CHESWORTH M.J. y ARMSTRONG S.M. (1986). Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.* **36**:1111-1121.
- CASSONE V.M., SPEH J.C., CARD J.P. y MOORE R.Y. (1988b). Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms.* **3**:71-91.
- CASSONE V.M., WARREN W.S., BROOKS D.S. y LU J. (1993). Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms.* **8**:573-581.
- CHAN A.S., LAI F.P., LO R.K., VOYNO-YASENETSKAYA T.A., STANBRIDGE E.J. y WONG Y.H. (2002). Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell. Signal.* **14**:249-257.
- CHONG N.W. y SUGDEN D. (1991). Guanine nucleotides regulate 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in chick retinal pigment epithelium but not in neural retina. *J. Neurochem.* **57**:685-689.
- COGBURN L.A., WILSON-PLACENTRA S. y LETCHER L.R. (1987). Influence of pinealectomy on plasma and extrapineal melatonin rhythms in young chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**:343-356.
- CONWAY S., CANNING S.J., BARRETT P., GUARDIOLA-LEMAITRE B., DELAGRANGE P. y MORGAN P.J. (1997). The roles of valine 208 and histidine 211 in ligand binding and receptor function of the ovine Mel1a beta melatonin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **239**:418-423.
- CONWAY S., DREW J.E., MOWAT E.S., BARRETT P., DELAGRANGE P. y MORGAN P.J. (2000). Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor. *J. Biol. Chem.* **275**:20602-20609.



- COON S., BÉGAY V., FALCÓN J. y KLEIN J.C. (1998). Expression of melatonin synthesis genes is controlled by a circadian clock in the pike pineal organ but not in the trout. *Biol. Cell.* **90**:399-405.
- COTO-MONTÉS A., TOMÁS-ZAPICO C., ESCAMES G., LEÓN J., RODRÍGUEZ-COLUENGA M.J., TOLIVIA D. y ACUÑA-CASTROVIEJO D. (2003). Specific binding of melatonin to purified cell nuclei from mammary gland of swiss mice: day-night variations and effect of continuous light. *J. Pineal Res.* **34**:297-301.
- COZZI B., STANKOV B., VIGLIETTI PANZICA C., CAPSONI S., ASTE N., LUCINI V., FRASCHINI F. y PANZICA G.C. (1993). Distribution and characterization of melatonin receptors in the brain of the Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Neurosci. Lett.* **150**:149-152.
- CSEMMUS V. y MESS B. (2003). Biorhythms and pineal gland. *Neuroendocrinol. Lett.* **24**:404-411.
- DANIOLOS A., LERNER A.B. y LERNER M.R. (1990). Action of light on frog pigment cells in culture. *Pigment Cell Res.* **3**:38-43.
- DAVIES B., HANNAH L.T., RANDALL C.F., BROMAGE N. y WILLIAMS L.M. (1994). Central melatonin binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **96**:19-26.
- DEARRY A. y BURNSIDE B. (1986). Dopaminergic regulation of cone retinomotor movement in isolated teleost retinas: II. Modulation by gamma-aminobutyric acid and serotonin. *J. Neurochem.* **46**:1022-1031.
- DELGADO M.J. y VIVIEN-ROELS B. (1989). Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**:46-53.
- DELGADO M.J., GUTIÉRREZ P. y ALONSO-BEDATE M. (1983). Effects of daily melatonin injections on the photoperiodic gonadal response of the female frog, *Rana ridibunda*. *Comp. Biochem. Physiol.* **76**:389-398.
- DELGADO M.J., GUTIÉRREZ P. y ALONSO-BEDATE M. (1987). Melatonin and photoperiod alter growth and larval development in *Xenopus laevis* tadpoles. *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**:417-421.
- DELGADO M.J., ALONSO-GÓMEZ A.L., GANCEDO B., DE PEDRO N., VALENCIANO A.I. y ALONSO-BEDATE M. (1993). Serotonin-N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin levels in the frog retina are not correlated during the seasonal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **92**:143-150.

- DELGADO M.J. ALONSO-GÓMEZ A.L., ISORNA E., DE PEDRO N. y ALONSO-BEDATE M. (2004). Melatonina ocular como marcador del sistema circadiano en los anfibios. En: Avances en endocrinología comparada. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Vol. 2 (en prensa).
- DEVESON S., HOWARTH J.A., ARENDT J. y FORSYTH I.A. (1992). In vitro autoradiographical localization of melatonin binding sites in the caprine brain. *J. Pineal Res.* **13**:6-12.
- DJAMGOZ M.B. y WAGNER H.J. (1992). Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem. Int.* **20**:139-191.
- DOOLEN S., KRAUSE D.N., DUBOCOVICH M.L. y DUCKLESS P. (1998). Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **345**:67-69.
- DOOLEN S., KRAUSE D.N., y DUCKLES S.P. (1999). Estradiol modulates vascular response to melatonin in rat caudal artery. *Am. J. Physiol.* **276**:1281-1288.
- DREW J.E., BARRETT P., WILLIAMS L.M., CONWAY S. y MORGAN P.J. (1998). The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. *J. Neuroendocrinol.* **10**:651-661.
- DUBOCOVICH M.L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* **306**:782-784.
- DUBOCOVICH M.L. (1985). Characterization of a retinal melatonin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **234**:395-401.
- DUBOCOVICH M.L. (1988). Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* **2**:2765-2773.
- DUBOCOVICH M.L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**:50-56.
- DUBOCOVICH M.L. y HENSLER J.G. (1986). Modulation of [<sup>3</sup>H]-dopamine-released by different frequencies of stimulation from rabbit retina. *Br. J. Pharmacol.* **88**:51-61.
- DUBOCOVICH M.L. y TAKAHASHI J.S. (1987). Use of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**:3916-3920.
- DUBOCOVICH M.L., MASANA M.I., IACOB S. y SAURI D.M. (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmie. Arch. Pharmacol.* **355**:365-375.

- DUBOCOVICH M.L., YUN K., AL-GHOUL W.M., BENLOUCIF S. y MASANA M.I. (1998a). Selective MT<sub>2</sub> melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances on circadian rhythms. *FASEB Journal* **12**:1211-1220.
- DUBOCOVICH M.L., CARDINALI D.P., GUARDIOLA-LEMAITRE B., HAGAN R.M., KRAUSE D.N., SUGDEN B., VANHOUTTE P.M. y YOCCA F.D. (1998b). En: *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*. IUPHAR Media. Londres. pp. 187-193.
- DUNCAN M.J. y DAVIS F.C. (1993). Developmental appearance and age related changes in specific 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the suprachiasmatic nuclei of female Syrian hamster. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **73**:205-212.
- DUNCAN M.J., TAKAHASI J.S. y DUBOCOVICH M.L. (1988). Characteristics and autoradiographic localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology* **122**:1825-1833.
- DUNCAN M.J., HELLER K.S., PURVIS C.C., MASSEY B.T. y STETSON M.H. (1993). Investigations of the regulation of specific 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in Siberian hamsters by endogenous and exogenous melatonin. *Brain Res.* **631**:107-113.
- EBISAWA T., KARNE S., LERNER M.R. y REPERT S.M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6133-6137.
- EHRET M., PÉVET P. y MAITRE M. (1991). Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J. Neurochem.* **57**:1516-1521.
- EKSTRÖM P. y MEISSL H. (1997). The pineal organ of teleost fishes. *Rev. Fish Biol. Fisheries* **7**:199-284.
- EKSTRÖM P. y VANECEK J. (1992). Localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Neuroendocrinology* **55**:529-537.
- ERŞAHİN Ç., MASANA M.I. y DUBOCOVICH M.L. (2002). Constitutively active melatonin MT<sub>1</sub> receptors in male rat caudal arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **439**:171-172.
- FALCÓN J. (1999). Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* **58**:121-162.
- FALCÓN J., BOLLIET V. y COLLIN J.P. (1996a). Partial characterization of serotonin N-acetyltransferases from northern pike (*Esox lucius*, L) pineal organ and retina. Effects of temperature. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **342**:386-396.
- FALCÓN J., MOLINA-BORJA M., COLLIN J.-P. y OAKNIK S. (1996b). Age-related changes in 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding sites in the brain of sea bass breams (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.* **15**:401-411.

- FALCÓN J., GALARNEAU K.M., WELLER J.L., RON B., CHEN G., COON S.L. y KLEIN D.C. (2001). Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the fish pineal organ: evidence for a role of proteasomal proteolysis. *Endocrinology* **142**:1804-1813.
- FUKUZAWA T. y IDE H. (1983). Proliferation in vitro of melanophores from *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* **226**:239-244.
- GAILDRAT P. y FALCÓN J. (1999). Expression of melatonin receptors and 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the pituitary of a teleost fish. *Adv. Exp. Med. Biol.* **460**:61-72.
- GAILDRAT P. y FALCÓN J. (2000). Melatonin receptors in the pituitary of a teleost fish: mRNA expression, 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding and cyclic AMP response. *Neuroendocrinology* **72**:57-66.
- GAILDRAT P., RON B. y FALCÓN J. (1998). Daily and circadian variations of 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding sites in the pike brain (*Esox lucius*). *J. Neuroendocrinol.* **10**:511-517.
- GAILDRAT P., BECQ F. y FALCÓN J. (2002). First cloning and functional characterization of a melatonin receptor in fish brain: a novel one?. *J. Pineal Res.* **32**:74-84.
- GANCEDO B., ALONSO-GÓMEZ A.L., DE PEDRO N., CORPAS I., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1995). Seasonal changes in thyroid activity in male and female frog, *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**:66-75.
- GANCEDO B., ALONSO-GÓMEZ A.L., DE PEDRO N., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1996). Daily changes in thyroid activity in the frog *Rana perezi*: variation with season. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **114**:79-87.
- GANCEDO B., ALONSO-GÓMEZ A.L., DE PEDRO N., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1997). Changes in thyroid hormone concentrations and total contents through ontogeny in three anuran species: evidence for daily cycles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **102**:240-250.
- GARCÍA ALLEGUE R., MADRID J.A. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J. (2001). Melatonin rhythms in european sea bass plasma and eye: influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J. Pineal Res.* **31**:68-75.
- GARRAT P.J., JONES R., TOCHER D.A. y SUGDEN D. (1995). Mapping the melatonin receptor. 3. Design and synthesis of melatonin agonists and antagonists derived from 2-phenyltryptamines. *J. Med. Chem.* **38**:1132-1139.
- GAUER F., MASSON-PÉVET M. y PÉVET P. (1992). Pinealectomy and constant illumination increase the density of melatonin binding sites in the pars tuberalis of rodents. *Brain Res.* **575**:32-38.

- GAUER F., MASSON-PÉVET M., SKENE D.J., VIVIEN-ROELS B. y PÉVET P. (1993a). Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* **57**:120-126.
- GAUER F., MASSON-PÉVET M. y PÉVET P. (1993b). Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res.* **602**:153-156.
- GAUER F., MASSON-PÉVET M., SABOUREAU M., GEORGE D. y PÉVET P. (1993c). Differential seasonal regulation of melatonin receptor density in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nuclei: a study in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*, L). *J. Neuroendocrinol.* **5**:685-690.
- GAUER F., MASSON-PÉVET M., STEHLE J. y PÉVET P. (1994a). Daily variations of melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res.* **641**:92-98.
- GAUER F., MASSON-PÉVET M. y PÉVET P. (1994b). Seasonal regulation of melatonin receptors in rodent pars tuberalis: correlation with reproductive state. *J. Neural. Transm.* **96**:187-195.
- GAUER F., SCHUSTER C., PAIREL V., PÉVET P. y MASSON-PÉVET M. (1998). Cloning experiments and developmental expression of both melatonin receptor Mel1a mRNA and melatonin binding sites in the Syrian hamster suprachiasmatic nuclei. *Mol. Brain Res.* **60**:193-202.
- GIBBS F.P. y VRIEND J. (1981). The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* **109**:1796-1798.
- GILLESPIE C.F., MINTZ E.M., MARVEL C.L., HUHMANN K.L. y ALBERS H.E. (1997). GABA (A) and GABA (B) agonist and antagonist alter the phase-shifting effects of light when microinjected into the suprachiasmatic region. *Brain Res.* **759**:181-189.
- GLEASON E., MOBBS P., NUCCITELLI R. y WILSON M. (1992). Development of functional calcium channels in cultured avian photoreceptors. *Visual Neurosci.* **8**:315-327.
- GODSON C. y REPPERT S.M. (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* **138**:397-404.
- GOLDMAN B.D., DARROW J.M. y YOGEV L. (1984). Effects of timed melatonin infusions on reproductive development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* **114**:2074-2083.
- GRACE M.S., CAHILL G.M. y BESHARSE J.C. (1989). Aryl acylamide in ocular melatonin metabolism: distribution among vertebrate classes. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci. Suppl.* **30**:123.

- GREEN C.B., CAHILL G.M. y BESHARSE J.C. (1995). Tryptophan hydroxylase is expressed by photoreceptors in *Xenopus laevis* retina. *Visual Neurosci.* **12**:663-670.
- GROSS D.S. (1984). The mammalian hypophysial pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**:283-298.
- GROSSE J., VELICKOVIC A. y DAVIS F.C. (1996). Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections. *Am. J. Physiol.* **270**:R533-R540.
- GUBITZ A.K. y REPERT S.M. (2000). Chimeric and point-mutated receptors reveal that a single glycine residue in transmembrane domain 6 is critical for high affinity melatonin binding. *Endocrinology* **141**:1236-1244.
- GUIJARRO A.I. (2004). Implicaciones funcionales de la ritmicidad diaria y estacional del teleosteo *T. tinca*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- GUIJARRO A.I., LÓPEZ PATIÑO M.A., PINILLOS M.L., ISORNA E., DE PEDRO N., ALONSO-GÓMEZ A.L., ALONSO-BEDATE M. y DELGADO M.J. (2003). Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. *J. Fish Biol.* **62**:803-815.
- GUNDUZ B. y STETSON M.H. (1994). Effects of photoperiod, pinealectomy and melatonin implants on testicular development in juvenile Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Biol. Reprod.* **51**:1181-1187.
- HAMM H.E. (1998). The many faces of G-protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**:669-672.
- HAMM H.E. y MENAKER M. (1980). Retinal rhythms in chicks: circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4998-5002.
- HARDELAND R., BALZER I., POEGGELER B., FUHRBERG B., URÍA H., BEHRMANN G., WOLF R., MEYER T.J. y REITER R.J. (1995). On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J. Pineal Res.* **18**:104-111.
- HEDGE R. (1998). The 24-kDa subunit of the bovine mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase is a G protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **244**:620-629.
- HELLIWELL R.J.A. y WILLIAMS LM. (1992). Melatonin binding sites in the ovine brain and pituitary: characterization during estrous cycle. *J. Neuroendocrinol.* **4**:287-294.
- HERRERA J., NAVA M., ROMERO F. y RODRÍGUEZ-ITURBE B. (2001). Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. *Am. J. Kidney Disord.* **37**:750-757.
- HILL R.W. y WYSE G.A. (1992). Fisiología Animal. Ediciones Akal S.A., Madrid.

- HO M.K., YUNG L.Y., CHAN J.S., CHAN J.H., WONG C.S. y WONG YH. (2001). Galpha(14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of the phospholipase C. *British Journal of Pharmacology* **132**:1431-1440.
- HOFFMANN K. (1973). The influence of photoperiod and melatonin in testis size, body weight and pelage colour in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J. Comp. Physiol.* **85**:267-282.
- HOFFMAN R.A. y REITER R.J. (1965). Pineal gland: influence on gonads of male hamster. *Science* **148**:1609-1611.
- HOLMES W.N. y McBEAN R.L. (1963). Studies of the glomerular filtration rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* **40**:335-341.
- HORVATH L., TAMAS G. y TÖLG I. (1984). Special methods in pond fish husbandry. Halver Corporation. Seattle.
- IIGO M., KEZUKA H., AIDA K. y ANYU I. (1991). Circadian rhythms of melatonin secretion from superfused goldfish (*Carassius auratus*) pineal glands *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**:152-158.
- IIGO M., KEZUKA H., SUZUKI T., TABATA M. y AIDA K. (1994a). Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **18**:563-569.
- IIGO M., KOBAYASHI M., OHTANI-KANEKO R., HARA M., HATTORI A., SUZUKI T. y AIDA K. (1994b). Characteristics, day-night changes, subcellular distribution and localization of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Brain Res.* **644**:213-220.
- IIGO M., FURUKAWA K., HATTORI A., HARA M., OHTANI-KANEKO R., SUZUKI T., TABATA M. y AIDA K. (1995). Effects of pinealectomy and constant light exposure on day-night changes of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.* **197**:61-64.
- IIGO M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J., MADRID J.A., ZAMORA S. y TABATA M. (1997a). Unusual response to light and darkness of ocular melatonin in european sea bass. *Neuroreport* **8**:1631-1635.
- IIGO M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J., HARA M., OHTANI-KANEKO R., HIRATA K., SHINOHARA H., TABATA M. y AIDA K. (1997b). Characterization, guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) modulation, daily variation, and localization of melatonin-binding sites in the catfish (*Silurus asotus*) brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* **108**:45-55.
- IIGO M., FURUKAWA K., HATTORI A., OHTANI-KANEKO R., HARA M., SUZUKI T., TABATA M. y AIDA K. (1997c). Ocular melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Biol. Rhythms.* **12**:182-192.

- IIGO M., SATO M., IKEDA E., KAWASAKI S., NOGUCHI F. y NISHI G. (2003a). Effects of photic environment on ocular melatonin contents in a labrid teleost, the wrasse *Halichoeres tenuispinnis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **133**:252-259.
- IIGO M., FURUKAWA K., TABADA M. y AIDA K. (2003b). Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.* **347**:49-52.
- ISORNA, E., GUIJARRO A., LÓPEZ PATIÑO M.A., GARCÍA A., DELGADO M.J., ALONSO-BEDATE M. y ALONSO-GÓMEZ A.L. (2003). Estudio ontogénico del receptor de melatonina en el anfibio anuro *Rana perezi*. *4º Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada*. Libro de Resúmenes. p. 62.
- ISORNA, E., GUIJARRO A., DELGADO M.J., ALONSO-BEDATE M. y ALONSO-GÓMEZ A.L. (2004a). Characterization of melatonin binding sites in the brain and retina of the frog *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135**:259-267.
- ISORNA E., DELGADO M.J., GUIJARRO A., LÓPEZ PATIÑO M.A., ALONSO-BEDATE M. y ALONSO-GÓMEZ A.L. (2004b). The importance of environmental temperature on melatonin signal in poikilotherm animals. A thermal characterization of 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding in the retina of the frog *Rana perezi*. *J. Pineal Res.* (En revisión).
- IUVONE P.M. y ALONSO-GÓMEZ A.L. (1995). Multiple roles of calmodulin in melatonin biosynthesis by photoreceptor cells: regulation of calcium influx and adenylylase activity. *Soc. Neurosci. Abs.* **21**:1036.
- IUVONE P.M. y ALONSO-GÓMEZ A.L. (1997). Melatonin in the vertebrate retina. En: Christen Y, Doly M, Droy M.-T. (Eds.) *Les Séminaires Ophtalmologiques d'IPSEN*. Lefaix. Irvin. Paris. Vol 9. pp. 49-62.
- IUVONE P.M. y ALONSO-GÓMEZ A.L. (1998). Melatonin in vertebrate retina. *Les Séminaires Ophtalmologiques d'IPSEN* **9**:49-62.
- IUVONE P.M. y GAN J. (1994). Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures. *J. Neurochem.* **63**:118-124.
- IUVONE P.M. y GAN J. (1995). Functional interaction of melatonin receptors and D<sub>1</sub> dopamine receptors in cultured chick retinal neurons. *J. Neurosci.* **15**:2179-2185.
- IUVONE P.M., AVENDANO G., BUTLE B.J. y ADLER R. (1990). Cyclic AMP-dependent induction of serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures: Characterization and inhibition by dopamine. *J. Neurochem.* **55**:673-682.



- JOVER M., PÉREZ L. y RUANO R. (1997). Growth of tench maintained on extruded feed of different protein and carbohydrate content: preliminary results. 2<sup>nd</sup> International Workshop on Biology and Culture of the Tench (*Tinca tinca*), Badajoz, Spain. Abstracts, 3. p.3.
- KARPPANEN H., LAHOVAARA S., MANNISTO P. y VAPAATALO H. (1975). Plasma renin activity and in vitro synthesis of aldosterone by the adrenal glands of rats with spontaneous, renal, or pinealectomy-induced hypertension. *Acta Physiol. Scand.* **94**:184-188.
- KAWASHIMA K., MIWA Y., FUJIMOTO K., OOHATA H., NISHINO H. y KOIKE H. (1987). Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* **9**:1121-1131.
- KOKKOLA T., WATSON M.A., WHITE J., DOWEL S., FOORD S.M. y LAITINEN J.T. (1998). Mutagenesis of human Mel1a melatonin receptor expressed in yeast reveals domains important for the receptor function. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **249**:531-536.
- KOOPMAN M.G., MINORS D.S. y WATERHOUSE J.M. (1989). Urinary and renal circadian rhythms. En: Arendt J., Minors D.S. and Waterhouse J.M. (Eds.), *Biological rhythms in clinical practice*, London, Wright, pp. 83-98.
- KRAUSE D.N., GEARY G.G., DOOLEN S. y DUCKLES S.P. (2000). Melatonin and cardiovascular function. En: Olcese J. (Ed.). *Melatonin after four decades: an assessment of its potential*. Kluwer Academic Publishing/Plenum Press. N.Y. pp. 299-310.
- KUBŮ F. y KOUŘIL J. (1985). The tench. *Vodnany. Cesk. Ryb. Svaz.* pp. 97.
- KÜHN E.R., CORNEILLIE S. y OLLEVIER F. (1986). Circadian variations in plasma osmolality, electrolytes, glucose and cortisol in carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**:459-468.
- KULCZYKOWSKA E. (1995). Arginine vasotocin-melatonin interactions in fish: a hypothesis. *Rev. Fish Biol. Fisheries.* **5**:96-102.
- KULCZYKOWSKA E. (1998). Effects of arginine vasotocin, isotocin and melatonin on blood pressure in the conscious Atlantic cod (*Gadus morhua*): hormonal interactions?. *Exp. Physiol.* **83**:809-820.
- KULCZYKOWSKA E. (1999). Diel changes in plasma arginine vasotocin, isotocin, and melatonin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Bioch.* **21**:141-146.
- KULCZYKOWSKA E. (2002). A review of the multifunctional hormone melatonin and a new hypothesis involving osmoregulation. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **11**:321-330.

- KULCZYKOWSKA E., WARNE J.M. y BALMENT R.J. (2001). Day-night variations in plasma melatonin and arginine vasotocin concentrations in chronically cannulated flounder (*Platichthys flesus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **130**:827-834.
- KUPWADE V.A. y SAIDAPUR S.K. (1986). Effect of melatonin on oocyte growth and recruitment, hypophyseal gonadotrophs, and oviduct of the frog *Rana cyanophlyctis* maintained under natural photoperiod during the prebreeding phase. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**:284-292.
- LAIDLEY C.W. y LEATHERLAND J.F. (1988). Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose, and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp. Biochem. Physiol.* **89**:459-503.
- LAITINEN J.T. y SAAVEDRA J.M. (1990a). Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology* **126**:2110-2115.
- LAITINEN J.T. y SAAVEDRA J.M. (1990b). The chick retinal melatonin receptor revisited: localization and modulation of agonist binding with guanine nucleotides. *Brain Res.* **528**:349-352.
- LAITINEN J.T., CASTREN E., VAKKURI O. y SAAVEDRA J.M. (1989). Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* **124**:1585-1587.
- LAITINEN J.T., VISWANATHAN M., VAKKURI O. y SAAVEDRA J.M. (1992). Differential regulation of the rat melatonin receptors: selective age-associated decline and lack of melatonin-induced changes. *Endocrinology* **130**:2139-2144.
- LARSON-PRIOR L.J., SIUCIAK J.A., y DUBOCOVICH M.L. (1996). Localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in visual areas of the turtle brain. *Eur. J. Pharmacol.* **297**:181-185.
- LEMMER B. (1989). Circadian rhythms in the cardiovascular system. En: Arendt J., Minors D.S., Waterhouse J.M. (Eds.). *Biological rhythms in clinical practice*. Butterworths. Boston. pp. 51-70.
- LERNER A.B. y CASE J.D. (1960). Melatonin. *Fed. Proc.* **19**:590-592.
- 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. Am. Chem. Soc.* **80**:2857-2858.
- LERNER A.B., CASE J.D. y HEINZELMAN R.V. (1959). Structure of melatonin. *J. Am. Chem. Soc.* **81**:6084-6092.
- LI P.K. y WITT-ENDERBY P.A. (2000). Melatonin receptors as potential targets for drug discovery. *Drug. Future* **25**:945-957.

- LINCOLN G.A. y CLARKE I.J. (1995). Evidence that melatonin acts in the pituitary gland through a dopamine-independent mechanism to mediate effects of day length on the secretion of prolactin in the ram. *J. Neuroendocrinol.* **7**:637-643.
- LINCOLN G.A. y MAEDA K.I. (1992). Reproductive effects of placing microimplants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *J. Neuroendocr.* **132**:201-215.
- LINDROOS O.F., VEILAHTI J., LEIONEM L.M. y LAAKSO M.L. (1993). Characterization of melatonin binding to the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **250**:161-163.
- LOTUFO C.M., LOPES C., DUBOCOVICH M.L., FARSKY S.H. y MARKUS R.P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur. J. Pharmacol.* **430**:351-357.
- LUKOWICZ M. y PROSKE C. (1979). Production and reproduction of tench. *Riv. Ital. Piscic. Ittiopat.* **14**:109-112.
- MackENZIE R.S., MELAN M.A., PASSEY D.K. y WITT-ENDERBY P.A. (2002). Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem. Pharmacol.* **63**:587-595.
- MALPAUX B., DAVEAU A., MAURICE F., GAYRARD V. y THIERY J.C. (1993). Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol. Reprod.* **48**:752-760.
- MARTIN J.E., McKEEL D.W. Jr. y SATTLER C. (1982). Melatonin directly inhibits rat gonadotroph cells. *Endocrinology* **110**:1079-1084.
- MARTINOLI M.G., WILLIAMS L.M., KAH O., TITCHENER L.T. y PELLETIER G. (1991). Distribution of central melatonin binding sites in the goldfish (*Carassius auratus*). *Mol. Cell. Neurosci.* **2**:78-85.
- MASANA M.I. y DUBOCOVICH M.L. (2001). Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci. STKE* **107**: PE39.
- MASON R. y RUSAK B. (1990). Neurophysiological responses to melatonin in the SCN of short-day sensitive and refractory hamsters. *Brain Res.* **533**:15-19.
- MASON R., HARRINGTON M.E. y RUSAK B. (1987). Electrophysiological responses of hamster suprachiasmatic neurones to neuropeptide Y in the hypothalamic slice preparation. *Neurosci. Lett.* **80**:173-179.

- MASSON PÉVET M., GAUER F. y PÉVET P. (1993). Melatonin regulation of melatonin receptor density in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei. En: Touitou Y., Arendt J. and Pévet P. (Ed.). Melatonin and the pineal gland, from basic science to clinical application. *Excerpta medica*. Amsterdam. pp. 99-104.
- MAX M. y MENAKER M. (1992). Regulation of melatonin production by light, darkness, and temperature in the trout pineal. *J. Comp. Physiol.* **170**:479-489.
- MAYER I., BORNESTOF C. y BORG B. (1997). Melatonin in non-mammalian vertebrates: physiological role in reproduction?. *Comp. Biochem. Physiol.* **118A**:515-531.
- MAYWOOD E.S. y HASTINGS M.H. (1995). Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology*. **136**:144-153.
- MAYWOOD E.S., BITTMAN E.L., EBLING F.J., BARRETT P., MORGAN P. y HASTINGS M.H. (1995). Regional distribution of iodomelatonin binding sites within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster and Siberian hamster. *J. Neuroendocrinol.* **7**:215-223.
- MAZURAS D., BRIERLEY I., ANGLADE I., DREW J., RANDALL C., BROMAGE N., MICHEL D., KAH O. y WILLIAMS L.M. (1999). Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J. Comp. Neurol.* **409**:313-324.
- MAZURAS D., LE DREAN G., BRIERLEY I., ANGLADE I., BROMAGE N., WILLIAMS L.M. y KAH O. (2000). Expression of clock gene in the brain of rainbow trout: comparison with the distribution of melatonin receptors. *J. Comp. Neurol.* **422**:612-620.
- McARTHUR A.J., HUNT A.E. y GILLETTE M.U. (1997). Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* **138**:627-634.
- McCORD C.P. y ALLEN F.P. (1917). Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* **23**:207-224.
- McCORMACK C.A. y BURNSIDE B. (1992). A role for endogenous dopamine in circadian regulation of retinal cone movement. *Exp. Eye Res.* **55**:511-520.
- McGOOGAN J.M. y CASSONE V.M. (1999). Circadian regulation of chick electroretinogram: effects of pinealectomy and exogenous melatonin. *Amer. J. Physiol. (Regul. Integr. Comp. Physiol.)* **277**:R1418-R1427.
- McNULTY S., ROSS A.W., BARRETT P., HASTINGS M.H. y MORGAN P.J. (1994). Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* **6**:523-532.

- McNULTY S., ROSS A.W., SHIU K.Y., MORGAN P.J. y HASTINGS M.H. (1996). Phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis is regulated both by cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms. *J. Neuroendocrinol.* **8**:635-645.
- MESSAGER S., CAILLOT M., GEORGE D. y MARTINET L. (1997). Seasonal variation of melatonin binding sites in the pars tuberalis of the male mink (*Mustela vison*). *J. Neuroendocrinol.* **9**:523-528.
- MOLINARI E.J., NORTH P.C. y DUBOCOVICH M.L. (1996). 2-[<sup>125</sup>I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML<sub>2</sub> binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* **301**:159-168.
- MOORE R.Y. (1973). Retinohypothalamic projections in mammals: a comparative study. *Brain Res.* **49**:403-409.
- MOORE R.Y. (1983). Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.* **42**:2783-2789.
- MORAWSKA, (1981). Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench *Tinca tinca* (L.). Part V. Method of fecundity stimulation. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **28**:217-227.
- MORGAN P.J., LAWSON W., DAVIDSON G. y HOWELL H.E. (1989a). Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology* **50**:359-362.
- MORGAN P.J., LAWSON W., DAVIDSON G. y HOWELL H.E. (1989b). Melatonin inhibits cyclic AMP in cultured ovine pars tuberalis cells. *J. Mol. Endocrinol.* **5**:R3-R8.
- MORGAN P.J., DAVIDSON G., LAWSON W. y BARRET P. (1990). Both pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins link melatonin receptor to inhibition of adenylate cyclase in the ovine pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* **2**:773-776.
- MORGAN P.J., KING T.P., LAWSON W., SLATER D. y DAVIDSON G. (1991). Ultrastructure of melatonin-responsive cells in the ovine pars tuberalis. *Cell Tissue Res.* **263**:529-534.
- MORGAN P.J., BARRET P., DAVIDSON G. y LAWSON W. (1992). Melatonin regulates the synthesis and secretion of several proteins by pars tuberalis cells of the ovine pituitary. *J. Neuroendocrinol.* **4**:557-563.
- MORGAN P.J., BARRETT P., HAZLERIGG D., MILLIGAN G., LAWSON W., MACLEAN A. y DAVIDSON G. (1995). Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. *J. Neuroendocrinol.* **7**:361-369.

- MOUJIR F., REITER R.J., RODRÍGUEZ C. y YAGA K. (1992). Beta-adrenergic and peptide N-terminal histidine and C-terminal isoleucine stimulation of N-acetyl-transferase activity and melatonin production in the cultured rat pineal gland. *Endocrinology* **130**:2076-2082.
- MSEEH F., GERDIN M. y DUBOCOVICH M.L. (2002). Identification of cysteines involved in ligand binding to the human melatonin MT(2) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **449**:29-38.
- NAKAZAWA K., MARUBAYASHI U. y McCANN S.M. (1991). Mediation of the short-loop negative feedback of luteinizing hormone (LH) on LH-releasing hormone release by melatonin-induced inhibition of LH release from the pars tuberalis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**:7576-7579.
- NASH M.S. y OSBORNE N.N. (1995). Pertussis toxin-sensitive melatonin receptors negatively coupled to adenylate cyclase associated with cultured human and rat retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **36**:95-102.
- NAVA F., CALAPAI G., FACCIOLA G., CUZZOCREA S., GIULIANI G., DE SARRO A. y CAPUTI A.P. (1997). Melatonin effects on inhibition of thirst and fever induced by lipopolysaccharide in rat. *Eur. J. Pharmacol.* **331**:267-274.
- NAVAJAS C., KOKKOLA T., POSO T., HONKA N., GYNTER J. y LAITINEN J.T. (1996). A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **304**:173-183.
- NEER E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**:249-257.
- NEU J.M. y NILES L.P. (1997). A marked diurnal rhythm of melatonin ML1A receptor mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **49**:303-306.
- NILES L.P. (1989). High affinity binding sites for melatonin in hamster spleen. *Med. Sci. Res.* **17**:179-180.
- NISHI G. (1989). Locomotor activity rhythm in two wrasses, *Halichoeres tenuispinnis* and *Pteragogus flagellifera*, under various light conditions. *Jpn. J. Ichthiol.* **36**:350-356.
- NISHI G. (1991). The relationship between locomotor activity rhythm and burying behavior in the wrasse, *Suezichthys gracilis*. *Jpn. J. Ichthiol.* **37**:402-409.
- NISHI G. y ABE H. (1990). Relationship between the habit of burying itself in sand and locomotor activity rhythm in the wrasse, *Halichoeres tenuispinnis*. *J. Fac. Marine Sci. Technol. Tokai Univ.* **31**:69-75.
- NISHIMURA H. y BAILEY J.R. (1982). Intrarenal renin-angiotensin system in primitive vertebrates. *Kidney Int.* **12**:185-192.

- NONNO R., LUCINI V., PANNACCI M., MAZZUCHELLI C., ANGELONI D., FRASCHINI F. y STANKOV B.M. (1998). Pharmacological characterization of the human melatonin Mel(1a) receptor following stable transfection into NIH3T3 cells. *Br. J. Pharmacol.* **124**:485-492.
- NOSJEAN O., FERRO M., COGÉ F., BEAUVERGET P., HENLIN J-M., LEFOULON F., FAUCHÈRE J-L., DELAGRANGE P., CANET E. y BOUTIN J.A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* **275**:31311-31317.
- NOSJEAN O., NICOLAS J.P., KLUPSCH F., DELAGRANGE P., CANET E. y BOUTIN J.A. (2001). Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2, tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol.* **61**:1369-1379.
- NOVALES R.R. (1963). Responses of cultured melanophores to the synthetic hormones alpha-MSH, melatonin, and epinephrine. *Ann. NY Acad. Sci.* **100**:1035-1045.
- NOWAK J.C. (1990). Control of melatonin formation in vertebrate retina. *Adv. Pineal Res.* **4**:81-90.
- OKATANI Y., WAKATSUKI A., WATANABE K. *et al.* (2001). Melatonin counteracts potentiation by lysophosphatidylcholine of serotonin-induced vasoconstriction in human umbilical artery: relation to calcium influx. *J. Pineal Res.* **30**:116-122.
- OSBORNE N.N. y CHIDLOW G. (1994). The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye. *Exp. Eye Res.* **59**:3-9.
- PANG C.S. y PANG S.F. (1992). High affinity specific binding of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken. *J. Pineal Res.* **12**:167-173.
- PANG C.S., TSANG K.F.L., BROWN G.M. y PANG S.F. (1994a). Specific 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the duck adrenal gland. *Neurosci. Lett.* **165**:55-58.
- PANG C.S., ALI M.A., REDDY P.K., LETHERLAND J.F., BROWN G.M, y PANG F.S. (1994b). 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding in the brains of four salmonids. *Biol. Signals* **3**:230-238.
- PANG C.S., ALI M.A. y REDDY P.K. (1994c). A comparative study of picomolar affinity 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding sites in the hearts of three salmonid species. *Fish Physiol. Biochem.* **13**:371-378.
- PANG C.S., TANG P.L., PANG S.F. y BROWN G.M. (1995). Comparison of the pharmacological characteristics of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites of the lung, spleen, brain and kidney of chicken. *Biol. Signals* **4**:311-324.

- PANG C.S., TANG P.L., SONG Y., BROWN G.M. y PANG S.F. (1996). 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding sites in the quail heart: characteristics, distribution and modulation by guanine nucleotides and cations. *Life Sci.* **58**:1047-1057.
- PANG C.S., XI S.C., BROWN R., PANG S.F. y SHIU S.Y.W. (2002). 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding and interaction with  $\beta$ -adrenergic signaling in chick heart/coronary artery physiology. *J. Pineal Res.* **32**:243-252.
- PANG S.F. y YEW D.T. (1979). Pigment aggregation by melatonin in the retinal pigment epithelium and choroid of guinea pigs, *Cavia porcellus*. *Experientia* **35**:231-233.
- PANG S.F., WOO N.Y.S., TANG P.L. y ALLEN A.E. (1987). Differential effects of bilateral enucleation on serum melatonin: evidence for an endocrine retina in the fish and the hypothesis of a sensori-hormonal transducer. *Chin. J. Physiol. Sci.* **3**:341-349.
- PARKINSON D. y RANDO R.R. (1983). Effects of light on dopamine metabolism in the chick retina. *J. Neurochem.* **40**:39-46.
- PAUL P., LAHAYE C., DELAGRANDE P., NICOLAS J.P., CANET E. y BOUTIN J.A. (1999). Characterization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**:334-340.
- PAUTLER E.L. y HALL F.L. (1987). Movement of melatonin across the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* **45**:351-355.
- PAVLIDIS M., BERRY M., DIVANACH P. y KENTOURI M. (1997). Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. *Aquacult. Int.* **5**:237-247.
- PELLETIER J., GASTRO B., ROBLLOT G., WYLDE R. y DE REVIERS M.M. (1990). Characterization of melatonin receptors in the ram pars tuberalis: influence of light. *Acta Endocrinol.* **123**:557-562.
- PENNINGTON S.R. (1995). GTP-binding proteins 1: heterotrimeric G proteins. *Protein Profile CCQ 2*. pp. 167-315.
- PETIT L., LACROIX I., DECOPPET P., STROSBERG A.D. y JOCKERS R. (1999). Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem. Pharmacol.* **58**:633-639.
- PÉVET P. (1998). Melatonin and biological rhythms. *Thérapie* **53**:411-420.
- PÉVET P. (2003). Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J. Neuroendocrinol.* **8**:422-426.
- PICKERING H., SWORD S., VONHOFF S., JONES R. y SUGDEN D. (1996). Analogues of diverse structure are unable to differentiate native melatonin receptors in the chicken retina, sheep pars tuberalis and *Xenopus* melanophores. *Br. J. Pharmacol.* **119**:379-387.



- PIERCE M.E. y BESHARSE J.C. (1985). Circadian regulation of retinomotor movements I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length. *J. Gen. Physiol.* **86**:671-689.
- PIERCE M.E. y BESHARSE J.C. (1987). Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity. *Brain Res.* **405**:400-404.
- PIKETTY V. (2001). Absence of sexual dimorphism in pars tuberalis [<sup>125</sup>I]-Melatonin binding sites of lambs slaughtered in June and October. *J. Pineal Res.* **30**:50-55.
- PIKETTY V. y PELLETIER J. (1993). Melatonin receptors in the lamb pars tuberalis/median eminence throughout the day. *Neuroendocrinology* **58**:359-365.
- PIMPICKA E. (1981). Fecundity of tench (*Tinca tinca* L.) in lake Patryki. *Acta Ichthiol. Piscatoria* **11**:3-20.
- PINILLOS M.L., DE PEDRO N., ALONSO-GÓMEZ A.L., ALONSO-BEDATE M. y DELGADO M.J. (2001). Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol. Behav.* **72**:629-634.
- PINILLOS M.L., DELGADO M.J. y SCOTT A.P. (2003). Seasonal changes in plasma gonadal steroid concentrations and gonadal morphology of male and female tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture Res.* **34**:1-9.
- POON A.M.S., CHOW P.H., MAY A.S.Y. y PANG S.F. (1997). Autoradiographic localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J. Pineal Res.* **23**:5-14.
- POON A.M.S., KRAVTSOV G.M. y PANG S.F. (2002). Receptor-mediated modulation of avian caecal muscle contraction by melatonin: role of tyrosine protein kinase. *J. Pineal Res.* **32**:199-208.
- QUIRÓS M. y ALVARIÑO J.M.R. (2000). Growth and survival of tench larvae under different feeding strategies. *J. Appl. Ichthiol.* **16**:32-35.
- RANDALL C.F., BROMAGE N.R., THORPE J.E., MILES M.S. y MUIR J.S. (1995). Melatonin rhythms in Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained under natural and out-of-phase photoperiods. *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**:73-86.
- RECIO J., MEDIAVILLA M.D., CARDINALI D.P. y SÁNCHEZ-BARCELÓ E.J. (1994). Pharmacological profile and diurnal rhythmicity of 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding sites in murine mammary tissue. *J. Pineal Res.* **16**:10-17.
- REDBURN D.A. y MITCHELL C.K. (1989). Darkness stimulates rapid synthesis and release of melatonin in rat retina. *Visual Neurosci.* **24**:294-300.
- REDMAN J., ARMSTRONG S. y NG K.T. (1983). Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* **219**:1089-1091.

- REFINETTI R. (2000). Circadian physiology. Ed. CRC press. New York.
- REISINE T.D. (1995). Somatostatin inhibition of cyclic AMP acumulation and adrenocorticotropin release from mouse anterior pituitary tumor cells: mode of action and self-regulation. *Adv. Cyclic Nucleot. Prot. Phosphor. Res.* **19**:169-177.
- REITER R.J. (1984). Pineal indoles: production, secretion and actions: En: Muller R.M. y McLeod R.M. (Eds.). Neuroendocrine perspectives. Elsevier. Amsterdam. Vol. 2. pp. 347-377.
- REITER R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev.* **12**:151-180.
- REITER R.J., GUERRERO J.M., ESCAMES G., PAPPOLLA M.A. y ACUÑA-CASTROVIEJO D. (1997). Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **825**:70-78.
- REITER R.J. y TAN D.X. (2002). Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann. NY. Acad. Sci.* **957**:341-344.
- REITER R.J., TAN D.X., ORUNA C. y GITTO E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.* **7**:444-458.
- REITER R.J., TAN D.X. y ALLEGRA M. (2002). Melatonin: reducing molecular pathology and disfunction due to free radicals and associated reactants. *Neuroendocrinol. Lett.* **1**:3-8.
- REPERT S.M. (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptor. *J. Biol. Rhythms.* **12**:528-531.
- REPERT S.M., WEABER D.R., RIVKEES S.A. y STOPA E.G. (1988). Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* **242**:78-81.
- REPERT S.M., WEABER D.R., CASSONE V.M., GODSON C. y KOLAKOWSKI L.F. (1995a). Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* **15**:1003-1015.
- REPERT S.M., GODSON C., MAHLE C.D., WEABER D.R., SLAUGENHAUPT S.A. y GUSELLA J.F. (1995b). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel (1b) melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:8734-8738.
- REPERT S.M., WEABER D.R., EBISAWA T., MAHLE C.D. y KOLAKOWSKY L.F. Jr. (1996a). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett.* **386**:219-224.
- REPERT S.M., WEABER D.R. y GODSON C. (1996b). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends. Pharmacol. Sci.* **17**:100-102.

- REY P., ROZAS G., ANDRES M.D., ALDEGUNDE M. y REBOLLEDO E. (1991). Intestinal ATPase activities in domesticated rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at different times of the year. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* **22**:261-270.
- RIBELAYGA C., WANG Y. y MANGEL S.C. (2004). A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors. *J. Physiol.* **554**:467-482.
- RICHARDSON B.A., STUDIER E.H., STALLONE J.N. y KENNEDY C.M. (1992). Effects of melatonin on water metabolism and renal function in male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J. Pineal Res.* **13**:49-59.
- RIVKEES S.A., CARLSON L.L. y REPPERT S.M. (1989a). Guanine nucleotide-binding protein regulation of melatonin receptors in lizard brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:3882-3886.
- RIVKEES S.A., CASSONE V.M., WEABER D.R. y REPPERT S.M. (1989b). Melatonin receptors in chick brain: characterization and localization. *Endocrinology* **125**:363-368.
- ROCA A.L., GODSON C., WEABER D.R. y REPPERT S.M. (1996). Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel(1a) melatonin receptor. *Endocrinology* **137**:3469-3477.
- ROLLAG M.D. y LYNCH G.R. (1993). Melatonin-induced desensitization in amphibian melanophores. *J. Exp. Zool.* **265**:488-495.
- RUBIO A., GUERRERO J.M., REITER R.J. y OSUNA C. (1993). Involvement of alpha- and beta-adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase activity during development. *Endocrinology* **132**:393-398.
- SAMEJIMA M., SHAVALI S., TAMOTSU S., UCHIDA K., MORITA Y. y FUKUDA A. (2000). Light- and temperature-dependence of the melatonin secretion rhythm in the pineal organ of the lamprey, *Lampetra japonica*. *Japan. J. Physiol.* **50**:437-442.
- SAMMAK P.J., ADAMS S.R., HAROOTUNIAN A.T., SCHLIWA M. y TSIEN R.Y. (1992). Intracellular cyclic AMP not calcium, determines the direction of the vesicle movement in melanophores: direct measurement by fluorescence ratio imaging. *J. Cell Biol.* **117**:57-72.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J., IIGO M., MADRID J.A., ZAMORA S. y TABATA M. (1997). Daily cycles in plasma and ocular melatonin in demand-fed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J. Comp. Physiol.* **167B**:409-415.
- SATAKE N., OE H., SAWADA T. y SHIBATA S. (1991). The mode of vasorelaxing action of melatonin in rabbit aorta. *Gen. Pharmacol.* **22**:219-221.

- SCHER J., WANKIEWICZ E., BROWN G.M. y FUJIEDA H. (2002). MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **43**:889-897.
- SCHUSTER C., GAUER F., MALAN A., RECIO J., PÉVET P. y MASSON-PÉVET M. (2001). The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt(1) melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinology* **74**:55-68.
- SELDENRIJK R., HUP D.R.W., DE GRAAN P.N.E. y VAN DE VEERDONK F.C.J. (1979). Morphological and physiological aspects of melanophores in primary culture from tadpoles of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* **198**:397-409.
- SHIBATA S. y MOORE R.Y. (1987). Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **431**:311-315.
- SHIBATA S., CASSONE V.M. y MOORE R.Y. (1989). Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci. Lett.* **97**:140-144.
- SHIBATA S., HAMADA T., TOMINAGA K. and WATANABE S. (1992a). An in vitro circadian rhythm of protein synthesis in the suprachiasmatic nucleus under tissue culture conditions. *Brain Res.* **584**:251-256.
- SHIBATA S., TSUNEYOSHI A., HAMADA T., TOMINAGA K. and WATANABE S. (1992b). Effect of substance P on circadian rhythms of firing activity and the 2-deoxyglucose uptake in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.* **597**:257-263.
- SIERRA A., SÁEZ-ROYUELA M., CARRAL J.M., CELADA J.D., GAUDIOSO V.R., MUÑOZ C. y PÉREZ J.R. (1995). Response of tench [*Tinca tinca* (L.)] fed five different diets under intensive conditions. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **42**:207-210.
- SIUCIAK J.A. y DUBOCOVICH M.L. (1993). Effect of pinealectomy and the light/dark cycle on 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding in the chick optic tectum. *Cell. Mol. Neurobiol.* **13**:193-202.
- SIUCIAK J.A., FANG J.M. y DUBOCOVICH M.L. (1990). Autoradiographic localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the brains of C3H/HeN and C57BL/6J strains of mice. *Eur. J. Pharmacol.* **16**:387-390.
- SKENE D.J., MASSON-PÉVET M. y PÉVET P. (1992). Seasonal changes in melatonin binding sites in the pars tuberalis of male European hamsters and the effect of testosterone manipulation. *Endocrinology* **132**:1682-1686.
- SONG C.K. y BARTNESS T.J. (2001). CNS sympathetic outflow neurons to white fat that express MEL receptors may mediate seasonal adiposity. *Am. J. Physiol.* **281**:666-672.

- SONG Y. y PANG S.F. (1992). [<sup>125</sup>I]iodomelatonin-binding sites in the chicken kidney: characterization and comparison to other avian species. *Biol. Signals*. **1**:313-321.
- SONG Y., AYRE E.A. y PANG S.F. (1992). The identification and characterization of <sup>125</sup>I-labelled iodomelatonin-binding sites in the duck kidney. *J. Endocrinol.* **135**:353-359.
- SONG Y., POON A.M.S., LEE P.P.N. y PANG S.F. (1993). Putative melatonin receptors in the male guinea pig kidney. *J. Pineal Res.* **15**:153-160.
- SONG Y., TAM P.C., POON A.M.S., BROWN G.M. y PANG S.F. (1995). 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin-binding sites in the human kidney and the effect of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**:1560-1565.
- SONG Y., LEE P.P.N., CHAN C.W.Y., BROWN G.M. y PANG S.F. (1996a). Recent advances in renal melatonin receptors. En: Tang P.L., Pang S.F. and Reiter R.J. (Eds.), Melatonin: a universal photoperiodic signal with diverse actions. *Front. Horm. Res.* **21**:115-122.
- SONG Y., PANG C.S., AYRE E.A., BROWN G.M. y PANG S.F. (1996b). Melatonin receptors in the chicken kidney are upregulated by pinealectomy and linked to adenylate cyclase. *Eur. J. Endocrinol.* **135**:128-133.
- SONG Y., CHAN C.W.Y., BROWN G.M., PANG S.F. y SILVERMAN M. (1997). Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB J.* **11**:93-100.
- STANKOV B., COZZI B., LUCINI V., FUMAGALLI P., SCHAGLIONE F. y FRASCHINI F. (1991). Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. A comparative in vitro binding study. *Neuroendocrinology* **53**:214-221.
- STANKOV B., CAPSONI S., LUCINI V., FAUTECK J., GATTI S., GRIDELLI B., BIELLA G., COZZI B. y FRASCHINI F. (1993). Autoradiographic localization of putative melatonin receptors in the brains of two old world primates: *Cercopithecus aethiops* and *Papio ursinus*. *Neuroscience* **52**:459-468.
- STARKEY S.J., WALKER M.P., BERESFORD I.J.M. y HAGAN R.M. (1995). Modulation of the rat suprachiasmatic circadian clock by melatonin *in vitro*. *Neuroreport* **6**:1947-1951.
- STAURNES M. (1993). Difference between summer and winter in gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and hypoosmoregulatory ability of seafarmed anadromus arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **105**:475-477.
- STEFFENS W. (1995). The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **42**:161-180.

- STEHLE J., VANECEK J. y VOLLRATH L. (1989). Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an *in vitro* iontophoretic study. *J. Neural Transm.* **78**:173-177.
- STEINLECHNER S., HELDMAIER G. y BECKER H. (1983). The seasonal cycle of body weight in the Djungarian hamster: photoperiodic control and the influence of starvation and melatonin. *Oecologia (Berl)* **60**:401-405.
- STENKAMP D.L., IUVONE P.M. y ADLER R. (1994). Photomechanical movements of cultured embryonic photoreceptors: regulation by exogenous neuromodulators and by a regulable source of endogenous dopamine. *J. Neurosci.* **14**:3083-3096.
- SUGDEN D. (1991). Aggregation of pigment granules in single cultured *Xenopus laevis* melanophores by melatonin analogues. *Br. J. Pharmacol.* **104**:922-927.
- SUGDEN D. (1994a). N-acyl-3-amino-5-methoxychromans: a new series of non-indolic melatonin analogues. *Eur. J. Pharmacol.* **254**:271-275.
- SUGDEN D. (1994b). Melatonin: binding site characteristics and biochemical and cellular responses. *Neurochem. Int.* **24**:147-157.
- SUGDEN D. y CHONG N.W. (1991). Pharmacological identity of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res.* **539**:151-154.
- SUGDEN D., PICKERING H., TEH M.-T. y GARRAT P. (1997). Melatonin receptor pharmacology: toward subtype specificity. *Biol. Cell* **89**:531-537.
- SUMOVA A. y VANECEK J. (1997). Melatonin inhibits GnRH-induced increase of c-Fos immunoreactivity in neonatal rat pituitary. *J. Neuroendocrinol.* **9**:135-139.
- TAKAHASI J.S., MURAKAMI M., NIKAIDO S.S., PRATT B.L. y ROBERTSON L.M. (1991). The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: cellular regulation of circadian rhythm by light, second messengers, and macromolecules synthesis. *Rec. Prog. Horm. Res.* **45**:279-352.
- TAN D.X., CHEN L.D., POEGGELER B., MANCHESTER L.C. y REITER R.J. (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* **1**:57-60.
- TAN D.X., HARDELAND R., MANCHESTER L.C., POEGGELER B., LÓPEZ-BURILLO S., MAYO J.C., SAINZ R.M. y REITER R.J. (2003). Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with ABTS cation radical. *J. Pineal Res.* **34**:249-259.
- THIBAUT C., FALCÓN J., GREENHOUSE S.S., LOWERY C.A., GERN W.A. y COLLIN J.P. (1993). Regulation of melatonin production by pineal photoreceptor cells: role of cyclic nucleotides in the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neurochem.* **61**:332-339.

- TILLET Y., PELLETIER J., TRAMU G. y DE REVIERS M.M. (1990). The sheep pars tuberalis: an immunohistochemical study. Demonstration of the presence of glycoprotein and lipoprotein hormones. *Histochemistry* **94**:403-408.
- TING N., THAMBYRAJA A., SUGDEN D. *et al.* (2000). Pharmacological studies on the inhibitory action of melatonin and putative melatonin analogues on porcine vascular smooth muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **361**:327-333.
- TSUDA T., IDE M. e IIGO M. (1995). Influences of season and of temperature, photoperiod, and subcutaneous melatonin infusion on the glomerular filtration rate of ewes. *J. Pineal Res.* **19**:166-172.
- UNDERWOOD H. (1994). The circadian rhythm of thermoregulation in Japanese quail. I. Role of the eyes and pineal. *J. Comp. Physiol. A* **175**:639-653.
- UNDERWOOD H., BINKLEY S., SIOPEs T. y MOSHER K. (1984). Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies, and blood of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**:70-91.
- VALENCIANO A.I. (1998). Triptófano hidroxilasa en los fotorreceptores de la retina de *Xenopus laevis*: regulación de la expresión y de la actividad enzimática por el fotoperíodo y mensajeros intracelulares y extracelulares. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- VALENCIANO A.I., ALONSO-GÓMEZ A.L., ALONSO-BEDATE M. y DELGADO M.J. (1997). Effect of constant and fluctuating temperature on daily melatonin production by eyecups from *Rana perezi*. *J. Comp. Physiol.* **167**:221-228.
- VANECEK J. (1988a). Melatonin binding sites. *J. Neurochem.* **51**:1436-1440.
- VANECEK J. (1988b). The melatonin receptors in rat ontogenesis. *Neuroendocrinology* **48**:201-203.
- VANECEK J. (1995). Melatonin inhibits increase of intracellular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways. *Mol. Cell Endocrinol.* **107**:149-153.
- VANECEK J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* **78**:687-721.
- VANECEK J. y JANSKY L. (1989). Short days induce changes in specific melatonin binding in hamster median eminence and anterior pituitary. *Brain Res.* **477**:387-390.
- VANECEK J. y KLEIN D.C. (1992a). Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* **130**:701-707.
- VANECEK J. y KLEIN D.C. (1992b). Sodium dependent effects of melatonin on membrane potential of neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* **131**:939-946.

- VANECEK J. y KLEIN D.C. (1995). Melatonin inhibition of GnRH-induced LH release from neonatal rat gonadotroph: involvement of  $Ca^{2+}$  not cAMP. *Am. J. Physiol.* **269**:E85-E90.
- VANECEK J. y KOSAR E. (1994). Ontogenesis of melatonin receptors in anterior pituitary and pars tuberalis of golden hamsters. *Physiol. Res.* **43**:379-382.
- VANECEK J. y VOLLRATH L. (1989). Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res.* **505**:157-159.
- VANECEK J. y VOLLRATH L. (1990). Melatonin modulates diacylglycerol and arachidonic acid metabolism in the anterior pituitary of immature rats. *Neurosci. Lett.* **110**:199-203.
- VANECEK J., KOSAR E. y VORLICEK J. (1990). Daily changes in melatonin binding sites and the effect of castration. *Mol. Cell. Endocrinol.* **73**:165-170.
- VERA L.M., LÓPEZ-OLMEDA J.M., BAYARRI M.J., MADRID J.A. y SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J. (2004). Influence of light intensity on plasma melatonin and locomotor activity rhythms in tench. *Physiol. Behav.* (en revisión).
- VERNADAKIS A.J., BEMIS W.E. y BITTMAN E.L. (1998). Localization and partial characterization of melatonin receptors in *Amphioxus*, hagfish, lamprey, and skate. *Gen. Comp. Endocrinol.* **110**:67-78.
- VISWANATHAN M., LAITINEN J.T. y SAAVEDRA J.M. (1990). Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6200-6203.
- VISWANATHAN M., LAITINEN J.T. y SAAVEDRA J.M. (1993). Vascular melatonin receptors. *Biol. Signals* **2**:221-227.
- VIVIEN-ROELS B., ARENDT J. y BRADTKE J. (1979). Circadian and circannual fluctuations of pineal indoleamines (serotonin and melatonin) in *Testudo hermanni* Gmelin (Reptilia, Chelonia). *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**:197-210.
- VON GALL C., STEHLE J.H. y WEABER D.R. (2002). Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* **309**:151-162.
- VON LUKOWICZ M., TAMAS G., y HORVATH L. (1986). Aquaculture of tench. En: Billard R., Marcel J. (Eds.). *Aquaculture of cyprinids*. INRA. Paris, pp. 357-367.
- WADE G.N. y BARTNESS T.J. (1984). Effects of photoperiod and gonadectomy on food intake, body weight and body composition in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* **246**:26-30.
- WAN Q. y PANG S.F. (1993). [ $^{125}I$ ]iodomelatonin binding sites in the chicken spinal cord: binding characteristics and diurnal variation. *Neurosci. Lett.* **163**:101-104.



- WARREN W.S., HODGES D.B. y CASSONE V.M. (1993). Pinealectomized rats entrain and phase-shift to melatonin injections in a dose-dependent manner. *J. Biol. Rhythms*. **8**:233-245.
- WEABER D.R. y REPERT S.M. (1990). Melatonin receptors are present in the ferret pars tuberalis and pars distalis, but not in brain. *Endocrinology* **127**:2607-2609.
- WEABER D.R. y REPERT S.M. (1996). The Mel(1a) melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* **8**:109-112.
- WEABER D.R., LIU C. y REPERT S.M. (1996). Nature's knockout: the Mel(1b) receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamster. *Mol. Endocrinol.* **10**:1478-1487.
- WEABER D.R., RIVKEES S.A. y REPERT S.M. (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. Neurosci.* **9**:2581-2590.
- WELSH D.K., LOGOTHETICS D.E., MEISTER M. y REPERT S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**:697-706.
- WHITE B.H., SEKURA R.D. y ROLLAG M.D. (1987). Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores. *J. Comp. Physiol. B* **157**:153-159.
- WIECHMANN, A.F. (1986). Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Exp. Eye. Res.* **42**:507-527.
- WIECHMANN A.F. y CRAFT C.M. (1993). Localization of mRNA encoding the indoleamine synthesizing enzyme, hydroxyindole-O-methyltransferase, in the chicken pineal gland and retina by *in situ* hybridation. *Neurosci. Lett.* **150**:207-211.
- WIECHMANN A.F. y SMITH A.R. (2001). Melatonin receptor RNA is expressed in photoreceptors and displays a diurnal rhythm in *Xenopus* retina. *Mol. Brain Res.* **91**:104-111.
- WIECHMANN A.F. y WIRSIG-WIECHMANN C.R. (1991). Localization and quantification of high-affinity melatonin binding sites in the *Rana pipiens* retina. *J. Pineal Res.* **10**:174-179.
- WIECHMANN A.F. y WIRSIG-WIECHMANN C.R. (1993). Distribution of melatonin receptors in the brain of the frog *Rana pipiens* as revealed by *in vitro* autoradiography. *Neuroscience* **52**:469-480.
- WIECHMANN A.F. y WIRSIG-WIECHMANN C.R. (1994). Melatonin receptor distribution in the brain and retina of a lizard, *Anolis carolinensis*. *Brain. Behav. Evol.* **46**:26-33.

- WIECHMANN A.F., BOK D. y HORWITZ J. (1985). Localization of hydroxyindole-O-methyltransferase in mammalian pineal gland and retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**:253-265.
- WIECHMANN A.F., YANG X.L., WU S.M. y HOLLYFIELD J.G. (1988). Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Res.* **453**:377-380.
- WIECHMANN A.F., CAMPBELL L.D. y DEFOE M. (1999). Melatonin receptor RNA expression in *Xenopus* retina. *Mol. Brain. Res.* **63**:297-303.
- WILLIAMS L.M. (1989). Melatonin-binding sites in the rat brain and pituitary mapped by in vitro autoradiography. *J. Mol. Endocrinol.* **3**:71-75.
- WILLIAMS L.M. y MORGAN P.J. (1988). Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J. Endocrinol.* **119**:1-3.
- WILLIAMS L.M., MORGAN P.J., HASTINGS M.H., DAVIDSON G. y HOWELL H.E. (1989). Melatonin receptor sites in the Syrian hamster brain and pituitary. Localization and characterization using [<sup>125</sup>I]iodomelatonin. *J. Neuroendocrinol.* **1**:315-329.
- WITT-ENDERBY P.A., JARZYŃKA M.J. y MELAN M.A. (2001). Microtubules modulate melatonin receptor function. *Neuroscience* **27**:142.
- WITT-ENDERBY P.A., BENNETT J., JARZYŃKA M.J., FIRESTINE S. y MELAN M.A. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* **72**:2183-2198.
- WITTKOWSKI W., BERGMANN M., HOFFMANN K., PERA F. (1988). Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell. Tissue Res.* **251**:183-187.
- WOLNICKI J. y GÓRNY W. (1995). Suitability of two commercial dry diets for intensive rearing of larval tench (*Tinca tinca* L) under controlled conditions. *Aquaculture* **129**:256-258.
- WOLNICKI J. y MYSZKOWSKI L. (1998). Evaluation of four commercial diets for intensive production of tench *Tinca tinca* L. juveniles under controlled conditions. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **45**:453-458.
- WOLNICKI J., MYSZKOWSKI L. y KAMINSKI R. (2003). Effect of supplementation of a dry feed with natural food, condition and size distribution of juvenile tench *Tinca tinca* L. *J. Appl. Ichtiol.* **19**:157-160.
- WRIGHT M.L. (2002). Melatonin, diel rhythms, and metamorphosis in anuran amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* **126**:251-254.

- YOUNGSTROM T.G. y BARTNESS T.J. (1995). Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in the Siberian hamster. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol* **268**:744-751.
- YOUS S., ANDRIEUX J., HOWELL H.E., MORGAN P.J., RENARD P., PFEIFFER B., LESIEUR D. y GUARDIOLA-LEMAITRE B. (1992). Novel naphthalenic ligands with high affinity for the melatonin receptor. *J. Med. Chem.* **35**:1484-1486.
- YU H.S. y REITER R.J. (1993). (Eds.). Melatonin. Biosynthesis, physiological effects and clinical application. *CRC Press*. Boca Raton, FL.
- YU H.S., PANG S.F., TANG P.L. y BROWN G.M. (1981). Persistence of circadian rhythms of melatonin and N-acetylserotonin in the serum of rats after pinealectomy. *Neuroendocrinology* **32**:262-265.
- YU Z.H., YUAN H., LU Y. y PANG S.F. (1991). [<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. *Neurosci. Lett.* **125**:175-178.
- YUAN H. y PANG S.F. (1990a). Binding characteristics, regional distribution and diurnal variation of [<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the chicken brain. *J. Pineal. Res.* **9**:179-191.
- YUAN H. y PANG S.F. (1990b). [<sup>125</sup>I]Melatonin binding sites in membrane preparations of quail brain: characteristics and diurnal variations. *Acta Endocrinol.* **122**:633-639.
- YUAN H. y PANG S.F. (1991). [<sup>125</sup>I]iodomelatonin-binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variation. *J. Endocrinol.* **128**:475-482.
- YUAN H. y PANG S.F. (1992). [<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the chicken brain: diurnal variation and effects of melatonin injection or pinealectomy. *Biol. Signals* **1**:208-218.
- YUAN H., TANG F. y PANG S.F. (1990). [<sup>125</sup>I]Melatonin binding sites in membrane preparation of quail brain: characteristics and diurnal variations. *Acta Endocrinol.* **122**:633-639.
- YUAN H., LU Y. y PANG S.F. (1991). Binding characteristics and regional distribution of [<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in the brain of the human fetus. *Neurosci. Lett.* **130**:229-232.
- ZACHMANN A., ALI M.A. y FALCÓN J. (1992). Melatonin and its effects in fishes: an overview. En: Ali M.A. (Ed.). Rhythms in fishes. *NATO-A51 Ser A*. Plenum Press. New York: Vol 236. pp. 149-165.
- ZEMKOVA H. y VANEVEK J. (1997). Inhibitory effect of melatonin on gonadotropin-releasing hormone-induced Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in pituitary cell of newborn rats. *Neuroendocrinology* **65**:276-283.

ZHAO H., PANG S.F. y POON A.M.S. (2002).  $mt_1$  receptor-mediated antiproliferative effects of melatonin in the rat uterine antimesometrial stromal cells. *Mol. Reprod. Dev.* 61:192-199.