Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Hans G. Richter
Instituto de Histología y Patología
Facultad de Medicina

ACCION DE MELATONINA SOBRE LA PRODUCCION DE CORTICOSTERONA INDUCIDA POR ACTH EN LA GLANDULA ADRENAL DE RATA EN CULTIVO

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de ***Licenciado en Bioquímica*** y Título Profesional de ***Bioquímico***

JOCELYN NATALIA GARCIA SESNICH

VALDIVIA – CHILE

2007

Esta Tesis fue realizada en el Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, y fue financiada a través de subsidios otorgados por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, (proyecto FONDECYT 1050389) y DID-UACh S-200433 al grupo de investigación.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a quienes estuvieron presentes:

A mis profesores patrocinantes Dr Hans Richter y Dra Claudia Torres por los conocimientos entregados durante el desarrollo de la Tesis, por mostrarme que en ciencia todo es díficil , pero con perseverancia se obtiene lo deseado.

A mis queridísimos compañeros de laboratorio, Fernando Gaete y Lorena Abarzúa, por su ayuda desinteresada durante todo el trabajo realizado, sin importar la hora ni las condiciones. Por las largas horas de "filosofía, discusión y risas".

A la Sra Auristela Rojas por su ayuda en la realización de los RIAs y por esas horas de conversación interminables.

A Don Genaro Alvial por enseñarme generosamente las técnicas histológicas aquí utilizadas.

A quienes en algunos momentos de dificultad me ayudaron a discutir y discernir; Dr José Sarmiento, MgSc Federico Batiz y Dr César Gónzalez.

A la beca DAEL que me permitió terminar con éxito mis estudios.

A mi Madre.

A mi Padre.

A ambos.

Por forjarme con un corazón fuerte, por regalarme esta íncreible familia y por darme a través de su amor todas las herramientas que he necesitado.

A mis "guachitos pelaos" Cristian y Felipe por estar siempre tan cerquita, regaloneándonos sin importar la distancia.

A mi Nina y Tío Nico por apoyarme e incentivarme a seguir.

A Franco por la incondicionalidad, por la compañía, por la entrega, por el amor.

A Quena por mostrarme un nuevo camino, por enseñarme y guiarme en la danza, por hacerme conciente, por acompañarme y quererme.

A mis amigotas más queridas, casi hermanas Yael y Marce, porque para ellas las palabras sobran.

INDICE DE CONTENIDOS

		Página
1	**RESUMEN**	1
1.1	Abstract	3
2	**INTRODUCCION**	5
3	**RACIONAL DE LA PRESENTE INVESTIGACION**	13
3.1	Objetivo General	14
3.2	Objetivos Específicos	14
4	**MATERIALES Y METODOS**	15
4.1	Animales	15
4.2	*Western blot* de los receptores de melatonina MT1 y MT2	15
4.2.1	Extracción de proteínas de membrana	15
4.2.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	17
4.2.3	Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF	19
4.2.4	Análisis inmunoquímico de las proteínas transferidas a membranas de PVDF	20
4.3	Tinción de los geles con Azul de Coomasie	21
4.4	Obtención de cortes de para análisis histológico	21
4.5	Inmunohistoquímica	23
4.6	Tinción con hematoxilina eosina y con azul de toluidina	24
4.7	RT-PCR semicuantitativo	25
4.7.1	Extracción de RNA total	25
4.7.2	Amplificación mediante RT-PCR	27
4.7.3	Diseño de partidores de PCR	28
4.7.4	Análisis semicuantitativo de los cDNAs mediante PCR	31
4.8	Cultivo de explantes de glándula adrenal de rata	32
4.9	Medición de la producción de corticosterona por explantes de adrenal de rata	36
4.10	Obtención de muestras de plasma de rata	39

4.11	Medición de la concentración plasmática corticosterona en rata.	39
4.12	Medición de la concentración plasmática de melatonina en rata.	40
4.13	Análisis de datos	43
5	**RESULTADOS**	44
5.1	Estandarización de la extracción de proteínas de membrana	44
5.2	*Western blot* de receptores de melatonina	46
5.3	Inmunohistoquímica de los receptores de melatonina	48
5.4	Evaluación de los extractos de RNA total de glándula adrenal mediante espectrofotometría, electroforesis y amplificación de gen constitutivo	50
5.5	Amplificación de los mRNAs de los receptores de melatonina MT1 MT2 y RZRα mediante RT-PCR semi-cuantitativo	54
5.6	Análisis de viabilidad celular de glándula adrenal de rata en cultivo. Tinción hematoxilina-eosina y azul de toluidina.	56
5.7	Concentraciones plasmáticas de melatonina y corticosterona	59
5.8	Efecto de melatonina sobre la producción de corticoesterona estimulada por ACTH en cultivo de glándula adrenal de rata	61
6	**DISCUSION**	64
7	**BIBLIOGRAFIA**	75
8	**ANEXOS**	86
8.1	Vía de síntesis de corticosterona en la glándula adrenal de rata	86
8.2	Vías de señalización intracelular activadas por la isoforma 1 del receptor de membrana de melatonina acoplado a proteína G (MT1)	87
8.3	Vías neuroendocrinas y neurales que sitúan a la glándula adrenal en el contexto de integración de ritmos circadianos	88

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1: Resumen de los partidores de PCR utilizados 30

Tabla 2: Tratamientos aplicados a los explantes de glándula adrenal de rata 35

Tabla 3: Protocolo de radioinmunoensayo para corticosterona 38

Tabla 4: Protocolo de radioinmunoensayo para melatonina. 42

Tabla 5: Muestras de RNA total de adrenal de rata luego de 12 horas de cultivo. 51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evaluación de los extractos de proteínas de membrana 45

Figura 2: *Immunoblot* del receptor MT1 en diversos tejidos de rata 47

Figura 3: Cortes de adrenal de rata inmunoteñidos con anticuerpo policlonal anti-MT1 49

Figura 4: Análisis de cantidad relativa, posible degradación y contaminación por DNA genómico de las muestras de adrenal de rata cultivada por 12 h 52

Figura 5: Análisis de calidad de los cDNAs obtenidos a partir de RNA total de adrenal de rata cultivada por 12 h 53

Figura 6: Expresión de receptores de melatonina MT1, MT2 y RZRα en glándula adrenal de rata *ex-vivo* y luego de 12 h de cultivo 55

Figura 7: Preservación histológica de explantes de adrenal de rata cultivados en DMEM-HAM F12 por 12 horas 57

Figura 8: Preservación histológica (tinción con HE) de explantes de adrenal de rata cultivados por 0 a 48 horas 58

Figura 9: Concentraciones plasmáticas de melatonina y corticosterona a diferentes horas del día 60

Figura 10: Efecto de ACTH y ACTH + melatonina sobre la producción de corticosterona en explantes de adrenal de rata a 2 horas del día 63

INDICE DE ABREVIATURAS

3β-HSD	3 beta hidroxiesteroide deshidrogenasa
ACTH	Adrenocorticotrofina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
B máx	Capacidad máxima de unión
BSA	Albúmina de suero bovino
CRH	Factor liberador de corticotrofina
DAB	Diaminobencidina
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
GnRH	Factor liberador de gonadotrofina
HEPES	Acido N-2 hidroxietilpiperazino-N´2 etanosulfónico
HPA	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG	Inmunoglobulina G
Kd	Constante de disociación
kDa	kiloDalton
MT1	Isoforma 1 del receptor de melatonina
MT2	Isoforma 2 del receptor de melatonina
NSB	Unión no específica (*Non specific binding*)
NSQ	Núcleo Supraquiásmatico
P450scc	*P450 side-chain cleavage enzyme*
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
PKA	Proteína quinasa A

PKC	Proteína quinasa C
PLP	Paraformaldehído-lisina-peryodato
PM	Peso molecular
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PVDF	Polifluoruro de Vinilideno
RIA	Radioinmunoensayo
RNA	Acido ribonucleico
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a reacción de polimerasa en cadena
RZR α	Isoforma α del receptor nuclear de ácido retinoico
RZR β	Isoforma β del receptor nuclear de ácido retinoico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
StAR	*Steroidogenic acute regulatory protein*
TC	Cuentas totales (*Total counts*)
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
Tm	Melting point
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

1 RESUMEN

La posibilidad que melatonina contribuya a la regulación de la producción de glucocorticoides en adrenal ha sido extensamente debatida. Diversos autores han sometido ratas a un amplio arreglo de condiciones experimentales ya sea *in vivo* o *in vitro*; algunos han concluído que no existe un acoplamiento evidente entre melatonina y corticosterona plasmática, mientras otros han aportado evidencia para inhibición de la producción y liberación de glucocorticoides. Sorprendentemente, todas estas publicaciones no entregan evidencia de la expresión de receptores funcionales de melatonina en la adrenal de rata. Recientemente, nuestro laboratorio abordó exitosamente este problema usando varias metodologías, lo que nos permitió investigar acciones directas de melatonina sobre la producción de corticosterona inducida por ACTH en explantes (cuartos) de adrenal de rata en el presente trabajo. Por otra parte, considerando que melatonina circulante es una fuerte señal circadiana exploramos diferencias respecto de la hora del día en potenciales interacciones melatonina/ACTH para modular producción de corticosterona en la adrenal de rata. Con esta finalidad, cuartos de adrenal de rata colectados a las 08:00 am fueron sometidos a tratamiento durante la tarde sobreviniente, mientras aquellos colectados a las 10:00 pm fueron tratados durante la mañana siguiente. Los tratamientos incluyeron diferenters combinaciones de DMEM, ACTH, melatonina y luzindole, un antagonista de receptores MT1/MT2 de melatonina. Los valores de corticosterona al final de las incubaciones fueron determinados por radioinmunoensayo en 96 supernadantes. Por análisis estadístico de la razón corticosterona (ng)/tejido (mg), demostramos que la producción de corticosterona estimulada por ACTH en glándula adrenal de rata adulta bajo condiciones *in vitro*, es inhibida por 1-100 nM melatonina, pero no por 100 nM más 1 µM luzindol. Además, se observó que esta

inhibición depende de la hora del día. Estos resultados sugieren que la inhibición directa de melatonina sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH, depende de la hora del día (i.e., solamente después de administrar melatonina durante la tarde). Queda por investigar qué extensión de esta potencial nueva acción de melatonina plasmática en roedores nocturnos, resulta enmascarada por señales reguladoras superpuestas, derivadas en su mayor parte del sistema nervioso central.

1.1 ABSTRACT

The possibility of adrenal glucocorticoid production being under the influence of melatonin has been long debated. Several authors have subjected rats to a wide arrange of either *in vivo* or *in vitro* experimental conditions; some of them concluded that there is no evident coupling between plasma melatonin and corticosterone, whereas others provided evidence for melatonin inhibition of adrenal glucocorticoid production and release. Of note, all these reports fail to provide evidence accounting for expression of functional melatonin receptors in the rat adrenal. Recently, our laboratory successfully addressed this issue using several methods, so in the present investigation we looked for direct actions of melatonin on ACTH-stimulated corticosterone production by rat adrenal quarters. Besides, considering that circulating melatonin is a strong circadian signal we also sought after time-of-the-day differences in potential melatonin/ACTH interactions to modulate rat adrenal corticosterone production. To this end, rat adrenal quarters collected at 08:00h were subjected to treatment during the ensuing evening, whereas those collected at 2200 h were treated during the ensuing morning. The treatments included different combinations of DMEM, ACTH, melatonin, and the MT1/MT2 melatonin receptor antagonist luzindole. Endpoint corticosterone values were determined by radioimmunoassay in 96 incubation media. By statistical analyses of the corticosterone (ng)/tissue (mg) ratio, we demonstrate that the adult rat adrenal gland under *in vitro* conditions, exhibits time-of-the-day-dependent inhibition of ACTH-stimulated corticosterone production by 1-100 nM melatonin but not by 100 nM melatonin plus 1 μM luzindole. These results suggest that melatonin directly inhibits ACTH-stimulated (but not basal) corticosterone production in a time-of-the-day-dependent manner (i.e., only after challenge during evening time). It remains to

be elucidated to what extent this potential novel action of plasma melatonin in nocturnal rodents is masked by overlapping signals derived for the most part from the central nervous system.

2 INTRODUCCION

La glándula adrenal forma parte del sistema endocrino secretando hormonas esteroidales y catecolaminas. Son de forma triangular aplanada y se encuentran en el polo superior de cada riñón incluidas en el tejido adiposo que los rodea. Están cubiertas por una cápsula de tejido conectivo desde donde nacen tabiques hacia el interior de la glándula donde van lo vasos sanguíneos y nervios. El parénquima se organiza en dos regiones principales: médula y corteza. En la médula se encuentran las células cromafines productoras de noradrenalina y adrenalina. La corteza a su vez se subdivide en tres zonas: zona glomerular o externa que constituye aproximadamente el 15% de la corteza y secreta mineralocorticoides principalmente aldosterona cuya función es controlar la homeostasis electrolítica; zona fasciculada o media que constituye el 80% de la corteza y secreta glucocorticoides principalmente cortisol (humanos, oveja, etc) y corticosterona (ratas y ratones), que regulan el metabolismo de glucosa y ácidos grasos, preparan a los distintos sistemas para la respuesta lucha/huida propia de la respuesta al estrés y suprimen la respuesta inflamatoria; zona reticular o interna que constituye sólo entre el 5-7% de la corteza y secreta andrógenos débiles como dehidroepaindosterona y su sulfato, precursores de la síntesis de estradiol y testosterona en la gónada (*Ross et al 2005*).

La producción y secreción de glucocorticoides por parte de la zona fasciculada está bajo el retrocontrol del eje HPA (hipotálamo-hipófisis-adrenal). La hormona liberadora de adrenocorticotropina (CRH) es un péptido de 41 aminoácidos secretado por el hipotálamo que estimula la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) por parte de la células corticotrófas del lóbulo anterior de la hipófisis. La adrenocorticotropina es un polipéptido de 39 aminoácidos que mantiene la morfología de la glándula adrenal y estimula la secreción de glucocorticoides

(cortisol en humanos y corticosterona en ratas; *Ulrich-Lai et al, 2006*) elevando los niveles intracelulares de AMPc (*Bucley y Ramachandran, 1981*) lo que induce rápidamente un aumento en la actividad de la enzima *Steroidogenic Acute Regulatory* (StAR) incrementando la entrada de colesterol a la mitocondria. Por otro lado ACTH, incrementa la actividad de otras enzimas involucradas en la síntesis de corticosterona contribuyendo a un aumento neto de la producción de corticosterona.

Los niveles plasmáticos de glucocorticoides actúan directamente sobre la hipófisis o sobre neuronas del hipotálamo ejerciendo una retroalimentación negativa sobre su secreción. (*Arlt y Stewart, 2005*).

Los ritmos circadianos de glucocorticoides circulantes se caracterizan por un máximo al comienzo del período de actividad siendo esto a primeras horas del día para los animales diurnos incluido el hombre (*Ross et al, 2005; Torres-Farfan et al 2003 y 2004*) y al anochecer en animales nocturnos (*Ulrich-Lai et al, 2006*). El ritmo de corticosterona circulante en ratas presenta diferencias de 5 a 10 veces entre el máximo nocturno y el nivel mínimo diurno, mientras el ritmo circadiano de secreción de ACTH sólo alcanza una diferencia de 2 veces (*Orth y Kovacs, 1998*) y no presenta diferencias tan pronunciadas durante el día como el ritmo de corticosterona (*Dallman et al, 1978*).

El ritmo secreción de ACTH depende de conexiones neurales entre el núcleo supraquismático (NSQ) y el núcleo paraventricular que regulan la secreción del CRH y vasopresina, sin embargo el modesto ritmo circadiano de ACTH no da cuenta completamente de la fuerte oscilación circadiana de la producción de glucocorticoides en la rata, ya que en ratas hipofisectomizadas sometidas a infusión continua de ACTH se mantiene un ritmo de secreción de corticosterona (*Meier, 1976*). La secreción de corticosterona por la glándula adrenal de la rata

presenta una respuesta a ACTH que es mayor en la tarde que en la mañana, lo que indica una diferencia de sensibilidad a esas horas del día (*Dallman et al, 1978*). Esta diferencia se mantiene en ratas tratadas con dexametasona, tratamiento que inhibe la ACTH endógena, lo que indica que los cambios en la sensibilidad de la glándula adrenal son independientes de ACTH. Tanto el ritmo circadiano de corticosterona como la sensibilidad de la respuesta de la corteza adrenal a ACTH dependen del NSQ, dado que mediciones del ritmo de corticosterona en ratas sometidas a lesión del NSQ, demuestran que las diferencias mañana/tarde de sensibilidad a ACTH desaparecen. Sin embargo, en estas ratas se observan diferencias en la magnitud de la respuesta a ACTH cuando los animales se agrupan según la concentración basal de corticosterona, lo que podría implicar que la glándula adrenal mantiene una capacidad intrínseca de responder diferencialmente a ACTH (*Sage et al, 2002*). Según algunos autores (*Dijkstra et al, 1996*), pero no todos (*Ulrich-Lai et al, 2006*) en ratas con el NSQ intacto, la diferencia mañana/tarde de sensibilidad a ACTH desaparece cuando se denerva la glándula adrenal. En esta especie, se ha descrito una vía de inervación que utiliza al sistema nervioso autónomo para conectar al NSQ con la corteza adrenal. La funcionalidad de esta vía se demostró al aplicar un pulso de luz en la noche; tratamiento que disminuyó la concentración plasmática de corticosterona en ratas con el NSQ intacto pero no en ratas sometidas a lesión del NSQ (*Buijs et al, 1999*). Cabe hacer notar que la administración de un pulso de luz durante la noche también disminuye la concentración plasmática de melatonina (*Ganguly et al, 2002*). En hamsters, lesiones del NSQ suprimen el ritmo circadiano de cortisol y corticosterona (ambos esteroides son sintetizados por la corteza adrenal en esta especie), generando una alta dispersión de los valores plasmáticos de estos esteroides. Los ritmos circadianos de estos esteroides no se recuperan a pesar de transplantar los animales lesionados con NSQ de animales normales (*Meyer-Berstein et al, 1999*).

Este conjunto de resultados sugiere fuertemente que el ritmo circadiano de secreción de glucocorticoides por la corteza adrenal está regulado no sólo por el control del NSQ sobre los niveles plasmáticos de ACTH, sino también por una vía de inervación directa demostrada por Buijs et al (1999). Sin embargo, estos resultados no excluyen una capacidad intrínseca de la corteza adrenal para generar funciones rítmicas.

Una capacidad oscilatoria intrínseca de la función adrenal en cultivo (condición experimental que implica ausencia de ACTH e inervación; i.e. influencia del NSQ), podría explicarse por la presencia de un reloj periférico, con un cierto grado de autonomía, en este tejido. Dentro de este contexto, es importante considerar que desde 1998 a la fecha se ha logrado demostrar expresión oscilatoria de genes reloj en diversos tejidos de mamíferos, y que en los últimos dos años estas investigaciones han incluido la glándula adrenal de primates diurnos y roedores nocturnos (ver detalles en la discusión).

Sakamoto et al (1998) presentaron evidencia que una lesión del NSQ suprime la oscilación pero no la expresión de genes reloj en diversos tejidos periféricos de rata, observación que es consistente con el concepto que el sistema circadiano es un ordenamiento jerárquico de relojes biológicos. Una señal humoral controlada por el NSQ es el ritmo circadiano de melatonina plasmática que proviene de la glándula pineal (Lewy et al, 1980; Ganguly et al, 2002).

La glándula pineal es un órgano fotosensible y un importante regulador del ciclo día/noche (ritmo circadiano), que obtiene información acerca de los ciclos de luz y oscuridad desde los fotorreceptores de la retina a través del haz retinohipotalámico, que se comunica con el NSQ, cuyos haces nerviosos simpáticos llegan hasta la pineal.*(Ross et la 2005; Ganguly et al, 2002*).

La melatonina es una hormona de tipo indolamina que es sintetizada en forma rítmica principalmente por la glándula pineal (*Reiter, 1991*). En mamíferos su mayor concentración plásmatica se alcanza durante las primeras horas de la noche y se mantiene en bajas concentraciones durante las horas del día (luz) (*Lewy et al, 1980; Ganguly et al, 2002*). La duración del alza de melatonina es proporcional a las horas de oscuridad, por lo que no sólo es una señal que potencialmente indica la transición día/noche, sino también indica la estación del año. El ritmo de melatonina como señal estacional está claramente establecido tanto en mamíferos diurnos como nocturnos (*Reiter, 1993*)**.** Entonces, según los antecedentes mencionados en animales diurnos los picos de glucocorticoides y melatonina se encuentran en antifase, mientras que en animales nocturnos estos se encuentran en fase.

La presencia o síntesis de melatonina se ha detectado también en otros tejidos periféricos como retina (*Zawilska et al, 1991*), glándula de Harderian (*Djeridane et al, 2001*), tracto intestinal (*Bubenik et al, 2002*), testículo (*Tijmes et a,l 1996*) y linfocitos humanos (*Carrillo-Vico et a,l 2004*).

La biosíntesis de melatonina en la glándula pineal comienza con la hidroxilación de triptófano por la 5-triptofanohidroxilasa, seguido de su descarboxilación (para producir serotonina) por parte de la hidroxitriptófanodescarboxilasa para continuar con la acetilación de serotonina por la enzima acetilserotonina dando a lugar a la N-acetilserotonina que finalmente es metilada por Indol-O-metiltransferasa para formar melatonina (*Klein et al, 1997*).

Melatonina regula distintas funciones en una variedad de tejidos y especies a través de la activación de receptores específicos para esta hormona. En mamíferos se han descrito principalmente dos isoformas de alta afinidad denominados MT1 y MT2 (*Dubocovich et al, 2003; Masana et al 2001*) con una Kd del orden picomolar (*Morgan et al, 1994)*, siendo MT1 de

350 amino ácidos y MT2 de 362 aminoácidos con un peso molecular entre 37-40 kDa (*Song et al 1997, Rivera-Bermudez et al 2004*). Estas isoformas corresponderían a receptores de siete dominios transmembrana compuestos de 2 exones y un gran intrón de unos 13 kb (*Reppert et al, 1994, 1995*), y se están acoplados a proteínas heterotriméricas Gi , las que están formadas por las subunidades α, β y γ (*Dubocovich et al, 2003; Masana et al, 2001*). La activación de estos receptores por la unión de melatonina provocaría la disociación en subunidad α y el dímero βγ, los que interactúan con las moléculas efectoras en la transmisión de señales intracelulares (*Gilman, 1995*). Melatonina actúa a través de señales intracelulares que incluyen: inhibición de la adenilato ciclasa (disminución de los niveles intracelulares de cAMP), fosfolipasa C y A2, guanidil ciclasa y canales iónicos de sodio(Na^+) y potasio (K^+) (*Dubocovich et al, 2003; Masana et al 2001; Vanecek, 1998)*

La secuencia peptídica de MT1 es altamente conservada en diferentes especies como humano, rata, hamster y oveja (*Song et al, 1997; Reppert et al, 1996*) y contiene motivos estructurales que se han observado en otros receptores acoplados a proteínas G como: potenciales sitios de glicosilación en su extremo aminoterminal, sitios de fosforilación para PKC, PKA y caseínas quinasas 1 y 2, los cuales participarían directamente en su regulación funcional. A nivel de DNA posee un promotor sin caja TATA lo que es común en genes con múltiples sitios de transcripción (*Reppert et al, 1996*), posee un zona rica en AT que podría dar inicio a la transcripción y una zona con alto contenido de GC como en otros receptores acoplados a proteínas G (*Ikuyama et al, 1992*).

A nivel nuclear se ha encontrado el complejo RZR:ROR el cual pertenece a una familia de receptores huérfanos de ácido retinoico; a los cuales se le han atribuido potenciales sitios de unión a melatonina *(Calberg y Wiesenberg 1995; Vanecek, 1998*).

Para la ubicación y caracterización de los receptores de melatonina se han utilizado diferentes técnicas como: uso de 2-[I^{125}]melatonina para autoradiografía en cortes y para determinar parámetros farmacológicos en extractos de proteínas de membrana; RT-PCR convencional y a tiempo real para identificar la presencia del RNAm en diversos tejidos y el uso de anticuerpos específicos para identificar la proteína tanto por *Western-blot* como en inmunohistoquímica en cortes.

En rata se ha observado unión de 2-[I^{125}]melatonina en cerebro (*Mc Artur et al, 1997*), arteria caudal, pars tuberalis, pars distalis, NSQ (*Morgan et al, 1994*), glándula de Harderian, intestino (*Lopez-Gonzalez et al, 1991*) y ovario (*Soares et al, 2003*).

Por RT-PCR convencional Poirel et al (2003) detectaron RNAm de la isoforma MT1 en 37 de 39 tejidos periféricos estudiados donde se incluyen corazón, hígado, glándula de Harderian y glándula adrenal; además Pozo et al 1997 lo encontró en timo y páncreas. RNAm de la isoforma MT2 se ha descrito en: glándula de Harderian (*Poirel et al, 2003*) e hipotálamo (*Sudgen et al, 1999*).

Utilizando PCR en tiempo real Sallinen et al (2005) encontraron RNAm de ambas isoformas en hipotálamo, retina e intestino delgado y RNAm de la isoforma MT2 en corazón e hígado. Por otra parte, mediante *Western-blot* se ha encontrado la isoforma MT1 en ovario (*Soares et al, 2003*) y cerebro (*Song et al, 1997*).

Según los antecedentes entregados melatonina podría servir de nexo entre el NSQ y osciladores periféricos como la glándula adrenal. En la glándula adrenal de mono capuchino, se ha demostrado la expresión y caracterizado farmacológicamente receptores MT1 de melatonina (*Torres-Farfan et al, 2003b, 2004*). En esta especie ha sido reportado que el mecanismo por el cual melatonina inhibe directamente la producción de glucocorticoides involucraría al menos la

inhibición de una de las enzimas involucradas en la síntesis de cortisol, la enzima 3β-hidroxiesteroide dehidrogenasa (3β-HSD; *Torres-Farfan et al 2004*). Además melatonina inhibe la producción de cortisol estimulada por ACTH en la glándula adrenal de especímenes fetales y adultos de mono capuchino, a través de activación del receptor de melatonina MT1 expresado en la corteza de esta glándula (*Torres-Farfan et al, 2003 y 2004*). Esta fue la primera evidencia de expresión de receptores funcionales de melatonina en la glándula adrenal de mamíferos.

3 RACIONAL DE LA PRESENTE INVESTIGACION

En rata, existe evidencia contradictoria respecto de si melatonina regula la producción de corticosterona estimulada por ACTH. En base a las evidencias presentadas, melatonina es un posible modulador neuroendocrino entre el NSQ y la glándula adrenal. Debido a que en rata no existen evidencias sólidas de la presencia de receptores de melatonina en glándula adrenal, se investigó la expresión de estos receptores mediante: caracterización farmacológica de receptores de melatonina por estudios de unión -Bmax- y desplazamiento -Kd-, en preparaciones de membrana y cortes utilizando 2-[I^{125}] melatonina (tesis paralela), se determinó la presencia de mRNA de las isoformas MT1 y MT2 y del receptor nuclear RZRα *ex-vivo* (tesis paralela) e *in-vitro* por RT-PCR semi-cuantitativo utilizando partidores publicados por otros autores.

Se determinó la presencia del receptor MT1 *ex-vivo* utilizando anticuerpos comerciales específicos mediante *western-blot* e inmunohistoquímica.

Teniendo como antecedente que la isoforma MT1 del receptor de melatonina se expresa en glándula adrenal de rata, se cultivaron cuartos de adrenal por un período de 12 horas (condición experimental que implica ausencia de ACTH e inervación; i.e. influencia del NSQ), para determinar la interacción de melatonina con ACTH en la regulación de la producción de corticosterona. Dado que en la rata los picos de corticosterona y melatonina son concurrentes en las 24-h, se postula que a diferencia de lo observado en el mono capuchino, melatonina no afecte o incluso sinergize con la respuesta a ACTH en la rata.

3.1 Objetivo General

"Investigar el efecto de melatonina sobre la producción de corticosterona inducida por ACTH en la glándula adrenal de rata en cultivo".

3.2 Objetivos Específicos

(1) Determinar la presencia de receptores de melatonina en glándula adrenal de rata *in vivo* mediante RT-PCR semicuantitativo, *Western-blot* e inmunohistoquímica.

(2) Estandarizar condiciones de cultivo en explantes de glándula adrenal de rata mediante tinciones histológicas básicas.

(3) Determinar si existe interacción de melatonina con ACTH en la regulación de la producción de corticosterona en explantes de glándula adrenal de rata.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 2 a 3 meses de edad, peso promedio 250 gramos, mantenidas bajo un fotoperíodo de 14 horas luz-10 horas oscuridad, con humedad y temperatura (18-20°C) controladas y un régimen de pellet y agua *ad-libitum*. Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile y del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

4.2 *Western blot* de receptores de melatonina MT1 y MT2

4.2.1 Extracción de proteínas de membrana:

Materiales

Centrífuga a 4°C, *Hettich, Zentrifugen MIKRO 200R. Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL, IKA-Labortechnik).*Sonicador *Ultrasonic Homogenizer* (Cole-Palmer Instrument Corporation). Ultracentrífuga a 4°C *Beckman Optima LE-80K* con rotor 70 Ti. Espectrofotómetro *Meterterk SP830* (ARQUIMED). Lupa y lámpara *Nikon. Vortex Genie 2 (*Scientific Industries*).* Cubeta de plástico de 1ml.Tubos de policarbonato de 5 ml (para uso con *Ultra-Turrax*). Puntas de micropipetas. Microtubos de 1,5 ml. Placas *Petri.* Material quirúrgico estéril (Pinzas, hojas de afeitar, tijeras).Lámpara de luz roja. (<0.2 lux).

Reactivos

NaCl 0.9% (Merck), Reactivo de Bradford 1X (Biorad), Albúmina de suero bovino BSA (Sigma), Tampón de lisis pH =7.4 que contiene: Hepes 50 mM, NaCl 150mM, EGTA 1mM,

$MgCl_2$ 2mM, Glicerol 10%, Tritón X-100 1%, PMSF 1mM.Cóctel inhibidor de proteasas 10ul por cada 1ml de tampón de lisis Todos los reactivos del tampón de lisis fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Corp.

Procedimiento

Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se obtuvieron las glándulas adrenales, las cuales fueron desprovistas de tejido adiposo (con la ayuda de una lupa), lavadas con suero fisiológico y cortadas en bloques (utilizando una hoja de afeitar estéril), encima de una placa petri ubicada sobre una fuente con hielo. El procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril. En las horas de oscuridad los animales fueron sacrificados bajo luz roja.(< 0.2lux)

A continuación las piezas del tejido se traspasaron a tubos de policarbonato, se agregó 3ml de tampón de lisis y se homogenizó en Ultraturrax, 3 veces por 15 segundos con reposo en hielo entre las rotaciones. Luego se sonicó 3 veces por 15 segundos con descanso en hielo entre rondas. Se incubó por 10 min a 4°C, agitando en vortex cada 2 min. Se traspasó el homogenizado a microtubos de 1,5 ml y se microcentrifugó a media potencia por 10 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 45000 rpm (rotor 70TI) por 45 min a 4°C y luego el pellet fue resuspendido en 500µl de tampón de lisis.

Se construyó una curva de calibración para medir concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976). Para ello se preparó una solución de 4 ug BSA/ul y se dispuso de 6 microtubos de 1,5 ml con 500ul de agua destilada cada uno. Se agregó sobre el primer tubo 500ul de la solución 4 ug BSA/ul , se homogenizó por pipeteo obteniéndose una solución 2 ug BSA/ul, se traspasó 500ul de esta solución al segundo tubo y se continúo en forma sucesiva hasta el tubo

seis. De esta forma la curva comprendió los puntos:4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 ug BSA/ul., como blanco se utilizó tampón de lisis.

La medición de concentración proteica se realizó en duplicado tanto para las muestras como para los puntos de la curva, para ello se agregó 1ml de reactivo de Bradford a microtubos de 1,5 ml y 5ul de la muestra previamente diluida 10 veces en agua destilada, se agitó en vortex y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se midió absorbancia a 595nm. Se construyó mediante regresión lineal la curva de calibración y se calculó la concentración proteica interpolando en la curva y multiplicando por el factor de dilución de la muestras.

4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

Materiales

Centrífuga a 4°C *Hettich, Zentrifugen MIKRO 200R. Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL, IKA-Labortechnik).* Estufa termoregulada (Boekel Scientific). Fuente de poder *Consort E833* (Arquimed).Cámara de electroferesis *Mini-PROTEAN 3 Cell (*Biorad). *pH meter CG840* (Schott). 2 placas de vidrio para mini geles con espaciadores de 1,5mm de grosor. Peineta de 10 pocillos

Reactivos

Tampón TRIS-HCl 1.5 mM pH = 8.8 para el gel espaciador, Tampón TRIS-HCl 0.5 mM pH = 6,8 para el gel apilador, Acrilamida /bisacrilamida 30%T, 2,67%C (Ambas de Sigma-Aldrich Corp.), SDS 10% (Sigma-Aldrich Corp.), Persulfato de amonio al 10 % (Sigma Aldrich Corp.), TEMED 99% (Sigma-Aldrich Corp.), Tampón de muestra para electroforesis, conteniendo Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), glicerol 12,5 %, SDS 5 % y DTT 10% y azul de bromofenol al 0,2 % para identificar el frente iónico. Tampón de corrida Tris-HCl 0,025 M (pH

8,3), Glicina 0,192 M y SDS 0,1 % (P/V) (Sigma-Aldrich Corp.) TRIS y Glicina de Biorad Laborartories, Inc. Marcador de peso molecular *Dual color prestained Precision Plus Protein Standards* (Biorad Laborartories, Inc.).

Procedimiento

El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas mediante su unión alrededor de la cadena de aminoácidos, confiriéndole al polipéptido una carga negativa proporcional a su longitud. En su presencia la migración de las proteínas está determinada por su peso molecular

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles en placa (8 x 7,3 cm y 1,5 mm de espesor) con un gel espaciador al 4 % y un gel separador al 10%. Se sembró por surco un volumen total de 30 µl correspondiente a 200ug de proteínas de membrana, para ello el volumen correspondiente a 200ug se microcentrifugó por 45 min a máxima potencia a 4°C, el sobrenadante fue eliminado y el pellet se resuspendió en 30 µl de tampón de muestra. Las muestras se calentaron en estufa a 37°C durante 1hora y posteriormente se sembraron sobre el gel espaciador, en uno de los surcos se sembraron 10ul del marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó a 160V durante 1 h. Concluída la electroforesis el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie o se electrotransfirió a membranas de PDVF, como se describe posteriormente.

4.2.3 Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF

Materiales

Fuente de poder *Consort E833* (Arquimed). Cámara Tranferencia *Mini Trans-Blot Electrophretic Transfer Cell (*Biorad). Papel filtro *Watman* n° 8

Reactivos

Tampón de transferencia, conteniendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM, y SDS 0,1 % (P/V). TRIS y Glicina fueron obtenidos de Biorad Laborartories, Inc; Membrana de PVDF: *Inmobilon-P Transfer Membrane PVDF* (Millipore Corporation); Metanol absoluto (Merck)

Procedimiento

Se cortó la membrana del tamaño necesario, se sumergió en metanol por 15 segundos y luego se equilibró en tampón de transferencia por 20 min.

Finalizada la electroforesis los geles se equilibraron durante 5 min en el tampón de transferencia. Posteriormente el gel se colocó sobre papel de filtro y sobre este se ubicó la membrana del mismo tamaño del gel eliminando cuidadosamente todas las burbujas de aire entre el gel y la membrana. Sobre la membrana se colocó nuevamente papel de filtro y el "*sandwich*" resultante se aprisionó entre dos placas de acrílico cubiertas con esponjas en sus dos caras interiores asegurándose que el gel quede hacia el catódo y la membrana hacia el anódo, de modo que las proteínas cargadas negativamente se tranfieran a la membrana. La transferencia se realizó a 75 mA durante 6 h . Para verificar la transferencia a las membranas, finalizado el periodo de transferencia los geles de poliacrilamida-SDS se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250.

4.2.4 Análisis inmunoquímico de las proteínas transferidas a membranas de PVDF:

Materiales

Estufa termoregulada (Boekel Scientific), Transiluminador de luz blanca, Cámara digital *OLYMPUS Camedia C4000*, Software *DocIt (UVP, Inc. Upland, CA)*

Reactivos

Metanol absoluto (Merk), PBS 1X pH =7,4 (Sambrok et al.,1999), Tampón dilución del anticuerpo 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich Corp.), 2% BSA (Sigma-Aldrich Corp.) en PBS 1X pH =7.4 , Anticuerpo anti MT1 dilución 1:100 *MEL -1A-R(R-18)* (Santa Cruz Biotecnology), Anticuerpo anti MT2 dilución 1:100 *MEL –1B-R(T-18)* (Santa Cruz Biotecnology), Anticuerpo anti IgG de cabra hecho en conejo diluido 1:50000 (Sigma-Aldrich Corp.), Anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:50000 (Pierce), Luminol *:SuperSignal West Pico chemiluminiscent substrate(Pierce), Película BioMax MR-1 8G (Kodak)*, Solución reveladora D-72 (Kodak) Solución fijadora U3 (Kodak).

Procedimiento

Finalizada la transferencia la membrana fue retirada, sumergida en metanol absoluto por 15 segundos y se secó en estufa a 37°C. Luego se incubó por 18 horas a 37°C con el primer anticuerpo (anti MT1 o MT2 según corresponda) Luego se lavó 4 veces por 5 min con PBS 1X pH =7,4 y se dejó secar en estufa a 37°C. Se incubó con el segundo anticuerpo (anti IgG de cabra), por 40 min a 37°C y nuevamente se lavó 4 veces por 5 min con PBS 1X pH 7,4, se dejó secar en estufa a 37°C y finalmente se incubó con el tercer anticuerpo (anti IgG de conejo) por 30 min 37 °C. Se repitieron los lavados de igual manera. Se incubó con luminol por 10 min en oscuridad (Luminol/solución intensificadora: solución de peroxidasa estable, 1:1). Posterior a la incubación con el sustrato SuperSignal, las membranas se expusieron inmediatamente a película

BioMax durante períodos de tiempo variable (5 seg - 5 min). Las películas se revelaron con solución D-72 y se fijaron con solución fijadora U3. El control de la inmunotinción se realizó sin incubar la membrana con el primer anticuerpo. Las imágenes de la películas fueron capturadas usando el *software DocIt (UVP, Inc. Upland, CA)* conectado a una cámara digital (*Olympus Camedia Master 4.1*), la cual se utilizó a una velocidad de 1/400 segundos y se usó como fondo un transiluminador de luz blanca.

4.3 Tinción de los geles con Azul de Coomasie

Para verificar la calidad de los extractos proteicos y la eficiencia de la electrotransferencia, concluida la electroforesis y la transferencia según corresponda, los geles se tiñeron con una solución de azul brillante de *Coomasie* R-250 0,1 % (P/V) (Merck), metanol 50 % (V/V) (Winkler Ltda.) y ácido acético 7,5 % (V/V) (Winkler Ltda.) durante30 min y luego se lavaron en una solución de metanol 30 % (V/V) (Winkler Ltda.) y ácido acético 10 % (V/V) (Winkler Ltda.) para eliminar el exceso de colorante.

4.4 Obtención de cortes de para análisis histológico

Materiales

Micrótomo *R Jung A.G. Heidelberg*. Portaobjetos y cubreobjetos. Cámara de extracción para la batería de alcoholes. Estufa termoregulada *Forma Scientific Inc.*.Moldes metálicos para bloques de parafina. Lámpara de luz roja (<0.2 lux).

Reactivos

Fijadores: PLP (paraformaldheído lisisna peryodato), parafolmaldheído al 4% o bouin, Parafina en pastillas *Histosec* (Merck), Xilol (Baker), Etanol (Winkler Ltda.), Butanol (Winkler Ltda.).

Procedimiento

Los animales fueron sacrificados por decapitación, se obtuvieron las glándulas adrenales, las cuales fueron desprovistas de tejido adiposo y cortadas en mitades utilizando una hoja de afeitar estéril, encima de una placa petri ubicada sobre una fuente con hielo. El procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril. En las horas de oscuridad los animales fueron sacrificados bajo luz roja.

Las glándulas fueron procesadas ex-vivo o cultivadas por 12 a 48 horas y luego procesadas (ver protocolo cultivo más adelante). A continuación fueron fijadas en el fijador correspondiente a cada caso por 24 horas, luego se deshidrataron pasando sucesivamente por alcohol 70%, alcohol 96%, alcohol 96%, alcohol 100%, alcohol 100%, solución alcohol: butanol 1:1, butanol, butanol dejando 40 min en cada uno de ellos La inclusión se realizó dejando sucesivamente 1hora en solución butanol-histosec 1:1 (1 vez) e histosec (3 veces). El histosec se aplica líquido calentando previamente hasta 60°C. Se dejó a temperatura ambiente para que solidifique la parafina y se realizaron cortes en micrótomo con un grosor 6 micras, los cuales son montados sobre porta objetos.

Los cortes fueron desparafinados pasando sucesivamente 10 min por xilol (2 veces), alcohol 100%, alcohol 96%, alcohol 70%, agua. Posteriormente los cortes se utilizaron para el análisis histológico de los mismos mediante inmunocitoquímica y tinción con hematoxilina-eosina y azul de toluidina (ver más adelante).

4.5 Inmunohistoquímica

Materiales

Cortes desparafinados de glándula adrenal de rata de 6 micras fijados en PLP, Cámara húmeda (Thelco Precision Scintific Corporation), Sistema digital de captación de imagen: utilizando *el software MR GRAB* conectado cámara digital Axiocam MRc Zeiss, Cubreobjetos

Reactivos

Metanol (Winkler Ltda.), Peróxido de hidrógeno (Merck), Solución PBS 1X , 1% BSA (para bloqueo y dilución del anticuerpo), Tampón Tris-HCl 0.01M pH= 7,8 (Biorad Ltda.), Anticuerpo anti MT1 dilución 1:250: *MEL -1A-R(R-18)* (Santa Cruz Biotecnology), Anticuerpo anti MT2 dilución 1:250: *MEL –1B-R(T-18)* (Santa Cruz Biotecnology), Kit DAKOCytomation, Diaminobencidina (DAB) (Sigma) , Bálsamo de Cánada.

Procedimiento

Luego de desparafinar los cortes, se inactivaron las peroxidasas endógenas incubando 10 min con solución 1:1 de metanol: agua oxigenada a temperatura ambiente. Se bloqueó por 45 min con solución PBS 1X , 1% BSA a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con TRIS-HCl 0,01M pH= 7,8 por 5 min cada vez. Se incubó por toda la noche en cámara húmeda con el primer anticuerpo 1:250 (anti-MT1 o anti-MT2 hecho en cabra)**.** Los lavados fueron repetidos de igual manera y se incubó por 20 min con reactivo 1 de kit DAKOCytomation (anti IgG cabra biotinilado), se lavó nuevamente y se incubó por 20 min con reactivo 2 (estreptavidina-HRP), se lavó por última vez y se reveló con DAB (sustrato cromogénico de HRP) incubando 15 min en oscuridad.

Se deshidrataron los cortes dejando sucesivamente 5 min en agua, alcohol 70%, alcohol 96%, alcohol 100%. Luego los cortes fueron montados utilizando bálsamo de Cánada y

posteriormente fotografiados utilizando un sistema digital de captación de imagen usando el *software MR GRAB* conectado a una cámara digital (Zeiss)

4.6 Tinción con hematoxilina eosina y con azul de toluidina

Materiales

Cortes desparafinados e hidratados de glándula adrenal de rata de 6 micras fijados en PLP, parafolmaldheído o bouin, Cubreobjetos, Sistema digital de captación de imagen: utilizando *el software MR GRAB* conectado cámara digital Axiocam MRc Zeiss.

Reactivos

Hematoxilina de Harris (Lerner Laboratorios), Solución acuosa de eosina al 1% (Merck), Solución de borato de sodio al 1% (Merck), Solución de azul de toluidina (Merck) al 0,5% , 20% de etanol (Winkler Ltda.) pH=4,6, previamente filtrada, Batería de alcoholes para desparafinar, deshidratar e hidratar. (Detalladas en obtención de cortes de para análisis histológico), Bálsamo de Cánada

Procedimiento

Para el caso de la tinción con azul de toluidina una vez desparafinados e hidratados los cortes, estos se lavaron con agua y se trataron con la solución de tinción por 10 min, luego se lavaron nuevamente con agua, se deshidrataron utilizando alcohol de 95º y alcohol absoluto, ambos 2 veces por un minuto. Luego los cortes se deshidrataron y se montaron utilizando bálsamo de Cánada.

Para el caso de la tinción con Hematoxilina-Eosina, luego de desparafinados, hidratados y lavados con agua, los cortes se incubaron por 5 min con Hematoxilina de Harris, se lavaron con agua por 10 min y con solución de borato de sodio al 1% por 2 min. Luego se incubó con

solución acuosa de eosina por 5 min. Se lavaron nuevamente con agua por 1 minuto, para luego ser deshidratados y montados. Los cortes fueron fotografiados utilizando un sistema digital de captación de imagen usando el *software MR GRAB* conectado a una cámara digital.

4.7 Análisis semicuantitativo de mRNAs usando *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

4.7.1 Extracción de RNA total

Materiales

Centrífuga a 4°C, *Hettich, Zentrifugen MIKRO 200R. Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL, IKA-Labortechnik).* Tubos de policarbonato de 5 ml (para uso con *Ultra-Turrax*). *Vortex*. Puntas de micropipetas estériles con filtro y libres de nucleasas. Microtubos de 1,5 ml. *Termoblock* (o baño termorregulado a 55-65°C, para resuspender el RNA). Material quirúrgico estéril (Pinzas, hojas de bisturí, tijeras). Balanza analítica. Lámpara de luz roja(<0.2 lux).

Reactivos

Cloroformo ($CHCl_3$) (Winkler Ltda.). Etanol absoluto (Merck). Iso-2-Propanol (alcohol isopropílico) (Winkler Ltda.) Agua libre de nucleasas (Winkler Ltda.). *Trizol (Invitrogen).*

Procedimiento

Los animales fueron sacrificados por decapitación en horarios diferentes 10:00 am y 10:00pm (sacrificio bajo luz roja), se obtuvieron las glándulas adrenales las cuales fueron lavadas 3 veces en suero fisiológico estéril frío a 4°C y procesadas ex–vivo (tesis paralela) o luego de 12 horas de cultivo. Cada 4 glándulas (aproximadamente 100 mg de tejido) se utilizó 1 ml de solución de extracción (Trizol) en un tubo de policarbonato estéril de 5 ml.

Las muestras se homogenizaron en Ultraturrax, alternando rotaciones de 15 segundos con reposo en hielo. Los homogenizados se dejaron 5-10 min a temperatura ambiente para la inactivación de las RNAsas y destrucción de las membranas celulares. Por cada mL de Trizol se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezclaron en *vortex* a máxima potencia por 15 segundos. Luego se incubaron a temperatura ambiente por 5 min, se traspasaron a microtubos de 1,5 mL y se microcentrifugaron a 4°C, a máxima potencia, 15 min. La fase superior que contiene el RNA-total se traspasó a un microtubo nuevo (máximo 600 µL por tubo). Las fases inferiores fueron eliminadas (contienen las proteínas, lípidos y el DNA). Se agregaron 500 µL de alcohol isopropílico por cada 500 µL de fase acuosa, mezclando los tubos varias veces por inversión y posteriormente se incubaron 10 min a temperatura ambiente (precipitación del RNA). Se microcentrifugó a: 4°C, máxima potencia, 10 min; los sobrenadantes fueron eliminados y los *pellet* se lavaron con 500 µL de Etanol pro-análisis al 75%, seguido de agitación breve en *vortex* y microcentrifugaron a 4 °C, máxima potencia, por 5 min, se repite el lavado un a vez más. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* de RNA a 37°C por 10 min en *Termoblock* con la tapa del microtubo abierta. Los *pellets* fueron resuspendidos cuidadosamente en H_2O libre de nucleasas (30 µL-50 µL-100 µL, según el tamaño del *pellet*), mediante pipeteo repetido. Las resuspensiones de RNA total resultantes fueron incubadas a 55°C por 5 min en *Termoblock* para disolver mejor el RNA. Finalmente para determinar concentración del RNA se midió absorbancia, a 260 nm (ácidos nucleicos) y 280 nm (proteínas), considerando como óptima una relación $A_{260/280}$ en la lectura de las absorbancias de entre 1,8 a 2,0. Cada muestra se midió en dos diluciones distintas (por ejemplo: 1:50 y 1:100). Luego se promedió y se obtuvo la concentración final.

Para RNA existe la relación: **1 OD $_{260}$ = 40 µg/mL**

Entonces para el cálculo de concentración se utiliza:

A_{260} de la muestra x 40 x factor de dilución de la muestra = µg/mL de RNA

Se hicieron diluciones en agua libre de nucleasas para llevar el RNA a una concentración de trabajo de 1 µg/µL.

Se determinó la integridad del RNA por medio de un gel de agarosa no denaturante al 1,5% teñido con bromuro de etidio, en corrida de electroforesis lenta 45 *Volts*, 25 *mA*. (Ver Figura 3) Este experimento permite un chequeo rápido y eficiente de la calidad de muestras de RNA total, obviando el uso de paraformaldehído y temperatura. Los parámetros medidos en el gel son: probable contaminación con DNA genómico, eventual degradación de la muestra y cantidad de RNA total relativa entre las muestras existiendo correspondencia con las concentraciones medidas espectrofotométricamente.

4.7.2 Amplificación mediante transcripción reversa acoplada a reacción de polimerasa en cadena RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*)

Materiales

Termociclador Perlkin Elmer GeneAmp 2400 System; microtubos de pared delgada de 0,2 ml; micropipetas y puntas de micropipeta estériles, con filtro, certificadas como libres de nucleasas, proteasas y pirógenos (AXYGEN).

Transcripción Reversa

Se sintetizó la primera hebra de cDNA por transcripción reversa a partir de muestras seleccionadas de RNA glándula adrenal de rata luego de un cultivo de 12 horas.

Se usó transcriptasa reversa y reactivos para síntesis de primera hebra de cDNA comprados a INVITROGEN (BiosChile). La transcripción reversa se realizó a partir de 5 μg de RNA (5 μl de diluciones de trabajo a 1 μg/μl), utilizando 100 ng de partidores al azar (hexámeros), tampón de síntesis de primera hebra 5X (1X), DTT 0,1 M (10 mM), dNTPs 10mM cada uno (0.5mM) y *SuperScript II RNase H*¯ 10 U, en un volumen final de 20 μL. Las muestras de RNA total fueron llevadas a 10 μl en DEPC-H_2O y denaturadas a 70ºC durante 10 min. Enseguida la reacción de transcripción reversa fue montada en hielo e incubada en el termociclador con el siguiente programa: 25 ºC durante 10 min, 42ºC durante 60 min, 90ºC durante 5 min y 4 ºC indefinidamente.

4.7.3 Diseño de partidores de PCR

En el presente trabajo, se usaron partidores (**Tabla 1**) publicados por otros investigadores y modificados levemente, chequeados en cuanto a la calidad de bandas y parámetros termodinámicos para ello se consideró el cumplimiento de las siguientes exigencias mínimas:

- tamaño óptimo del fragmento de PCR entre150-300 pb.
- tamaño mínimo de cada partidor 20 bases.
- rango de Tm 45 -60 ºC.
- estabilidad de extremos “internos” media-alta.
- formación teórica de dímeros y *loops* igual a 2 configuraciones como máximo.
- la secuencia de los partidores no debe aparear significativamente con otras secuencias publicadas en *GeneBank*.

Por otra parte, se enviaron a sintetizar partidores para el gen constitutivo β-actina que se expresa de forma estable en diferentes tipos celulares.

Por otra parte, se enviaron a sintetizar partidores para el gen constitutivo ß-actina que se expresa de forma estable en diferentes tipos celulares.

Tabla 1: Resumen de los partidores de PCR utilizados

Partidores					
Gen	Sentido / Antisentido	GenBank (gi)	Temperatua de anealing ºC	Nº optimo de ciclos	Producto de PCR (pb)
β-ACTINA	5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC3'/ 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTT3'	Publicado en Focus (Invitrogen Corp)	59 48	24	**352**
MT1	5'-CAACCTGCAAACCGGAACTC-3'/ GGAAAACCACCAGGGCAAT	10567523 Peschke et al (2006)	52 51	42	**101**
MT2	5'-CTCACTCTGGTGGCCTTGGT-3'/ 5'-AACTGCGCAGGTCACTGGGTC	7672690 Kobayashi et al (2005)	57 58	42	**250**
RZRα	5'-AGAACAACACCGTGTACTTT-3'/ 5'-CTTCTGAAGGACATGTTGAAG-3'	109483592 Kobayashi et al (2005)	48 46	42	**254**

4.7.4 Análisis semicuantitativo de los cDNAs obtenidos usando reacción de DNA polimerasa en cadena (PCR).

Se utilizaron muestras de cDNA obtenidas anteriormente por RT-PCR. Las mezclas de reacción de PCR contuvieron 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3,0 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada deoxy-NTP, 0,2 µM de cada partidor de PCR, 1,25 U Taq DNA polimerasa y 2 µl (10%) del producto de transcripción reversa en un volumen total de 25 µl. La reacción de PCR se realizó en un termociclador *PerkinElmer GeneAmp 2400 System* (PerkinElmer Inc., MA, USA) y consistió de un paso de denaturación inicial a 94 ºC por 1 min 45 seg, seguido por 42 ciclos, 94 ºC por 30 seg, 60 ºC por 1 min y 72 ºC por 1 min. Al término de los ciclos de PCR, las muestras fueron sometidas a una extensión final a 72 ºC por 10 min y posterior mantención a 4 ºC.

Para el caso del gen constitutivo β-actina el programa consistió de un paso de denaturación inicial a 94 ºC por 2 min 35 seg, seguido por 28 ciclos de 94 ºC por 35 seg, 60 ºC por 1 min y 72 ºC por 1 min. Al término de los ciclos de PCR, las muestras fueron sometidas a una extensión final a 72 ºC por 10 min y posterior mantención a 4 ºC

Alícuotas de 10 µl de los productos de PCR fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % preteñidos con bromuro de etidio. La imagen de cada gel fue capturada usando el *software DocIt (UVP, Inc. Upland, CA)* conectado a una cámara digital (*Olympus Camedia Master 4.1*). Cada muestra fue amplificada en al menos 3 ensayos separados para cada gen de interés.

4.8 Cultivo de explantes de glándula adrenal de rata

Materiales

Material de cirugía estéril. Lupa conectada a sistema de luz fría (Nikon).Placas de cultivo de 24 pocillos (Nunclon).Filtro de 0,2 micras (Steritop Millipore Corporation).Cámara de flujo laminar (Forma Scientific Inc.).Estufa de cultivo *Water Jacketed Incubator* (Forma Scientific Inc.).Balanza analítica (BL 150S Sartorius AG Göttingen). Microtubos de 1,5 ml. Puntas para micropipetas estériles.Centrífuga a 4°C, *Hettich, Zentrifugen MIKRO 200R.*Lámpara de luz roja. (<0.2 lux).

Reactivos

Medio de cultivo DMEM-HAM F12, que contiene una combinación 1:1 de medio Dulbecco modificado (DMEM) y la mezcla de nutrientes F12HAM. A este medio se le adicionó: 0.1% de BSA, bicarbonato de sodio, glucosa, hepes, penicilina G sódica (100 mg/l), estreptomicina (50 mg/l), sulfato de kanamicina (25 mg/l) y anfotericina B (2.5 mg/l).Todos los reactivos fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich Corp.* El medio fue filtrado utilizando un filtro de 0.2 micras (*Steritop)* antes de usar; Adrenocorticotropina 1-39 (ACTH) (Sigma A 0423); Melatonina (Sigma M 5250); Luzindole (Sigma L 2407); Etanol (Merck); Dimetlsulfóxido (DMSO) (Merck).

Procedimiento

Los animales fueron sacrificados por decapitación en dos horarios diferentes, una hora después de encender la luz (8:00 am) y una hora después de apagarla (10:00 pm), se obtuvieron las glándulas adrenales , las cuales fueron desprovistas de tejido adiposo y cortadas en cuartos (utilizando hojas de afeitar estériles), encima una placa petri ubicada sobre una fuente con hielo. El procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril. A las 10:00 pm los animales fueron sacrificados bajo luz roja.

El cultivo se llevó a cabo utilizando el protocolo descrito por *Torres-Farfan et al 2003a* modificado levemente.

Los cuartos de adrenal fueron lavados 2 veces por 15 min con suero fisiológico estéril y frío. Se preincubó cada cuarto en 500ul medio de cultivo DMEM-HAM F12 0,1% BSA por 6 horas y luego el medio fue cambiado por uno con el tratamiento correspondiente según se indica en la **Tabla 2**. Cada tratamiento se realizó en los dos horarios indicados, se utilizó un número de animales igual a seis (n= 6) en cada punto horario y se realizó un seguimiento por animal, es decir, un cuarto de adrenal de cada animal se sometió a uno de los ocho diferentes tratamientos. Los cuartos de adrenal fueron cultivados por 12 horas a 37 °C , 100% humedad, 5% CO_2, 95% aire. Considerando el tiempo involucrado en los lavados y en el sacrificio de los animales (aproximadamente 1 hora) los tratamientos se extendieron desde las 3:00 pm hasta las 3:00 am para los explantes correspondientes a ratas sacrificadas a las 8:00 am y desde las 5:00 am hasta las 5:00 pm para el caso de los explantes provenientes de las ratas sacrificadas a las 10:00 pm.

Las soluciones de trabajo se prepararon por dilución seriada a partir de un stock concentrado. Para el caso de melatonina se utilizó un stock 1mg/ml en etanol absoluto y se realizaron diluciones sucesivas en medio DMEM-HAM F12 0,1% BSA de modo de alcanzar las soluciones de trabajo (1nm -100nM); para luzindole el stock utilizado fue de 1mg/ml en DMSO diluido en DMEM-HAM F12 0,1% BSA hasta una concentración final de trabajo 1 µM.; el stock de ACTH usado fue de 1mg/ml en agua destilada , diluida posteriormente en DMEM-HAM F12 0,1% BSA hasta una concentración de uso 100nM.

Una vez finalizado el cultivo, los explantes fueron pesados individualmente en balanza analítica, el medio fue centrifugado a 1200 g por 10 min a 4 ºC y guardado a -20ºC hasta la medición de corticosterona por radioinminoensayo (RIA).

Los explantes sin estímulo se fijaron en bouin , PLP o paraformaldehído al 4% para posterior Inmunohistoquímica, Tinción con Hematoxilina- Eosina o Azul de Toluidina

Tabla 2: Tratamientos aplicados a los explantes de glándula adrenal de rata.

Tratamiento	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
ACTH(nM)	-	100	100	100	100	100	100	-
Melatonina (nM)	-	-	1	10	100	10	100	10
Luzindol (µM)	-	-	-	-	-	1	1	-

Se indica la concentración final de cada fármaco en el volumen de cultivo utilizado por explante.

4.9 Medición de la producción de corticosterona por explantes de adrenal de rata

Materiales

Vortex Genie 2 (Scientific Industries).Baño termoregulado. Gradillas para tubos Khan.Tubos *Khan* de policarbonato de 5ml. Repipeteador *Eppendorf.* Gradillas para tubos khan con base magnetica. Contador de radiación gamma *1270 Rack Gamma II LKB Wallac.*

Reactivos

Rat corticosterone (I^{125}) Biotrak Assay with Amerlex-M ^{tm} magnetic separation RPA 548 (*Amersham Biosciences*)

Procedimiento

Como se indicó anteriormente luego de un cultivo por 12 horas los explantes fueron pesados individualmente en balanza analítica y el medio fue centrifugado a 1200 g por 10 min a 4 ºC y guardado a –20ºC Luego se descongelaron y se homogenizaron en vortex. Los medios sin tratamiento y los con tratamiento con melatonina 10nM se diluyeron 5 veces usando 60 µl de medio y 240 µl de tampón borato; el resto de los medios se diluyeron 20 veces usando 15 µl de medio y 285 µl de tampón . Una vez diluidos se calentaron a 60ºC por 30 min para desplazar la corticosterona unida a globulina. El procedimimento del radioinmunoensayo se llevó a cabo como indica el manual del kit utilizado: "Rat corticosterone (I^{125}) Biotrak Assay with Amerlex-M ^{tm} magnetic separation" RPA 548 (*Amersham Biosciences*).

En primer lugar se reconstituyen los reactivos liofilizados en tampón borato pH : 7,4 (incluido en el kit).A continuación se construye la curva de calibración por dilución seriada del estándar de 400ng corticosterona/ml contenido en el kit. Esta curva incluye los puntos: 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 y 20 ng corticosterona /tubo. A continuación se sigue el

protocolo indicado en la **Tabla 3.** El cálculo de la producción de corticosterona se describe en resultados.

Tabla 3: Protocolo de radioinmunoensayo para corticosterona

	Cuentas Totales (TC)	**Unión no específica (NSB)**	**Estándar cero (B_0)**	**Estandares**	**Muestras**
Tampón	-	200	100	-	-
Estándar	-	-	-	100	-
Muestra	-	-	-	-	100
1erAnticuerpo	-	-	100	100	100
Trazador	100	100	100	100	100
Agitar en vortex, cubrir los tubos e incubar a temperatura ambiente (15-30ºC) por 2 horas					
2do Anticuerpo	-	400	400	400	400
Agitar en vortex. Incubar por 10 min a temperatura ambiente (15-30ºC). Dejar 15 min sobre las gradillas con bases magnéticas para la separación del 2do anticuerpo (que viene recubriendo partículas magnéticas). Voltear la gradilla y dejar decantar el sobrenadante por 5 min sobre papel absorbente. Contar por 1 minuto en contador gamma. La medición de todos los puntos se realizó en duplicado.					

(Todos los volumenes indicados son en microlitros)

4.10 Obtención de muestras de plasma de rata

Materiales

Tubos de ensayo heparinizados. Centrífuga refrigerada *Sorvall RT 6000* . Microtubos de 1,5 ml. Lámpara de luz roja. (<0.2 lux).

Procedimiento

Se sacrificaron por decapitación 3 ratas por punto horario con una frecuencia cada 4 horas comenzando a las 10:00 am. En el momento de la decapitación se recolectó en tubos heparinizados aproximadamente 1ml de sangre por animal, la cual fue centrifugada a 1200 g por 15 min a 4 ºC y guardada a –20ºC a hasta la medición de corticosterona y melatonina en plasma mediante radioinminoensayo. Durante las horas de oscuridad los animales se sacrificaron utilizando una lámpara de luz roja.

4.11 Medición de la concentración plasmática corticosterona en rata

Materiales

Baño termoregulado. Tubos Khan de policarbonato de 5ml.Gradillas para tubos Khan.*Vortex Genie 2* (Scientific Industries). Gradillas para tubos Khan con separador mágnetico. Contador de radiación gamma *1270 Rack Gamma II LKB Wallac*

Procedimiento

Las diferentes muestras fueron descongeladas y homogenizadas en vortex, se diluyeron 5 veces en tampón borato p H : 7,4 y se calentaron las muestras a 60ºC por 30 min para desplazar la corticosterona unida a globulina. El procedimimento del radioinmunoensayo se llevó a cabo como indica el manual del kit utilizado: “Rat corticosterone (I^{125}) Biotrak Assay with Amerlex-M ^{tm} magnetic separation” RPA 548 (*Amersham Biosciences*), como se describió anteriormente.

4.12 Medición de la concentración plasmática de melatonina en rata.

Materiales

Tubos *Khan* de 5ml de vidrio. Gradillas para tubos *Khan*. *Vortex Genie 2* (Scientific Industries); Baño termoregulado.Centrífuga refrigerada *Sorvall RT 6000 Dupont*.

Viales; Contador de radiación beta 1*270 Rack Beta LKB Wallac.*

Reactivos

Estándar de melatonina (Sigma) de 1mg/ml.Se prepara con 10 mg de melatonina, 0.5ml de etanol (Merck) y 9,5 ml de agua destilada; Eter dietilico (Merck); Acetona (Merck)

Anticuerpo antimelatonina 1:5000 (*AB/S/02 Stockgrand Ltd., Guilford Surrey,UK*); Trazador [O-methyl-^{3}H] melatonin 83 µCi/mmol *Amersham Biosciences TRK 798,* Sweden; Solución de carbón activado; Líquido de centelleo preparado con 12,5 gr de PPO(Sigma), 0,25gr POPOP (Sigma) y 2,5L de Tolueno (Merck) ; Tampón tricina pH= 5,5 que contiene 0,1M tricina 99% tritiada (Sigma), 0,9% NaCl (Merck) y 0,1% de gelatina (Sigma) previamente disuelta a "baño María".

Procedimiento

El procedimimento del radioinmunoensayo para melatonina fue estandarizado por el grupo de investigación liderado por la Dra. María Serón-Ferré de la Unidad de Reproducción y Desarrollo, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Ver Torres-Farfan et al 2003a y b)

Las diferentes muestras fueron descongeladas y homogenizadas en vortex, 200 µl de cada una se extrajó con 2ml de éter dietílico, se agitó por un minuto en vortex, se dejó en reposo por 5 min a temperatura ambiente, se deja en hielo seco con acetona por 3 min y luego se evapora en baño termoregulado. A continuación se reconstituye en 500 µl de tampón tricina, para cada medición

por RIA se utilizan 500 µl (200 µl de muestra reconstituida + 300 µl de tampón tricina), lo que corresponden a 80 µl de la muestra original.

La curva de calibración se construyó por dilución seriada del estándar de melatonina y esta va desde los puntos 0,16 pg/ µl hasta 1 pg/µl. A continuación se sigue el protocolo indicado en la **Tabla 4.**

Tabla 4: Protocolo de radioinmunoensayo para melatonina.

	Cuentas Totales (TC)	**Unión no específica (NSB)**	**Estándar cero (B_0)**	**Estandares**	**Muestras**
Tampón	-	700	500	-	-
Estándar	-	-	-	500	-
Muestra	-	-	-	-	500
1erAnticuerpo	-	-	200	200	200
Agitar en vortex, cubrir los tubos e incubar a 37ºC por 1 hora.					
Trazador	100	100	100	100	100
Agitar en vortex, cubrir los tubos e incubar a 4ºC por 20 horas					
Agregar 200ul de solución de carbón activado. Agitar en vortex, cubrir los tubos e incubar a 4ºC por 15 min.					
Centrifugar por 15 min a 1200 g, traspasar a viales. Agregar 8ml de líquido de centelleo.Agitar en vortex e incubar					
2do Anticuerpo	-	400	400	400	400
Agitar en vortex. Incubar por 10 min a temperatura ambiente (15-30ºC). Dejar 15 min sobre las gradillas con bases magnéticas para la separación del 2do anticuerpo (que viene recubriendo partículas magnéticas). Voltear la gradilla y dejar decantar el sobrenadante por 5 min sobre papel absorbente. Contar por 1 minuto en contador gamma. La medición de todos los puntos se realizó en duplicado.					

(Todos los volumenes indicados son en microlitros)

4.13 Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa computacional *GraphPad Prism* versión 3.02 (*GraphPad Software Inc*, San Diego, CA). Los resultados fueron considerados significativos cuando los valores de $P<0.05$.

Las concentraciones plasmáticas de melatonina a las diferentes horas del día se analizaron con Test de Student. Las concentraciones de corticosterona fueron analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA) para muestras repetidas, usando Newman-Keuls como post-hoc.

El efecto de ACTH y ACTH más melatonina sobre la producción de corticosterona en explantes de adrenal de rata se analizó mediante ANOVA para muestras repetidas, con Newman-Keuls como post-hoc. Para el análisis de este efecto a los dos horarios estudiados se empleó ANOVA de dos vías y Bonferroni como post-test.

5 RESULTADOS

5.1 Extracción de proteínas de membrana

La estandarización de la extracción de proteínas de membrana se realizó verificando la calidad de los extractos proteícos mediante tinción de los geles con azul de Coomassie.

Los extractos proteícos de adrenal de rata y de los tejidos usados como control (datos no mostrados), presentaron un patrón de bandas continuo y característico para cada tejido, que se mantuvo entre los diferentes extractos obtenidos. Bandas bien definidas fueron aparentes en todo el rango del gel (pesos moleculares altos, intermedios y bajos), lo cual es un buen indicador de ausencia de degradación (**Figura 1**).

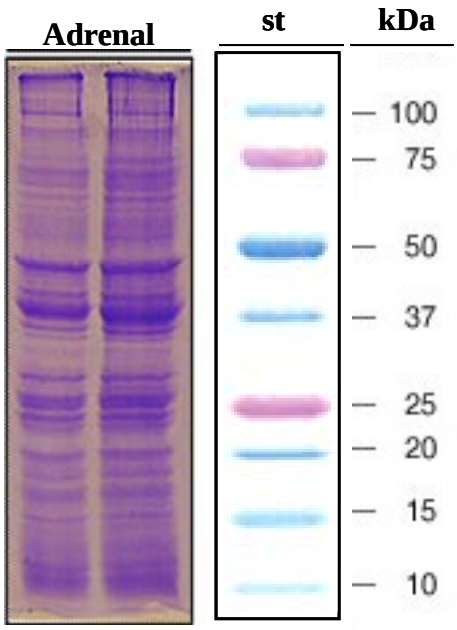


Figura 1: <u>Evaluación de los extractos de proteínas de membrana.</u>

Se observa un bandeo bien definido a lo largo de todo el gel, en los extractos de proteínas de membrana de adrenal de rata, lo que indica ausencia de degradación.Estos extractos se utilizaron posteriormente para Western-Blot. **St:** estándar de peso molecular **kDa**: kiloDalton

5.2 *Western-blot* de receptores de melatonina en extractos de proteínas de membrana de animales sacrificados a las a las 10:00 am y 10:00 pm .

Se detectó la isoforma MT1 en extracto de proteínas de membranas de adrenal, hígado, páncreas y testículo de rata cuando se utilizaron extractos de animales sacrificados a las 10:00 pm. (**Figura 2**).La proteína MT1 no se detectó en diafragma, tejido en el cual se ha descrito la ausencia de receptores de melatonina. En los mismos tejidos, pero de animales sacrificados a las 10:00 am no se detectó la presencia del receptor MT1 (**Figura 2**). La isoforma MT2 del receptor de melatonina no se detectó en ninguno de los tejidos estudiados a los dos horarios de experimentación (resultados no mostrados).

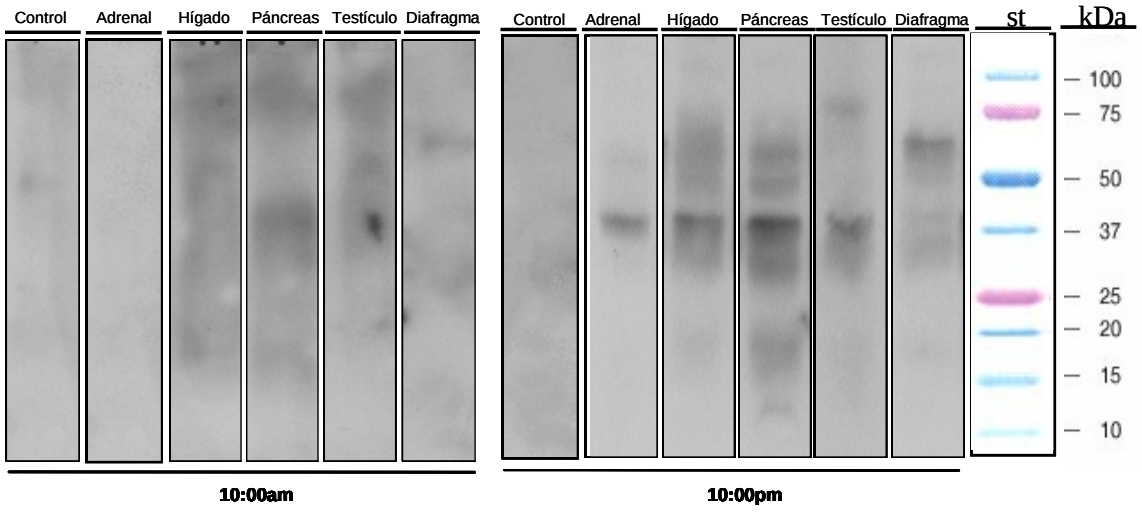


Figura 2: ***Immunoblot*** **de varios tejidos de rata (obtenidos a las 10:00 am y 10:00 pm), usando un anticuerpo policlonal anti-MT1 de Santa Cruz**. **Panel derecho:** Una banda única de 37 kDa fue detectada en tejidos recolectados a las 10:00 pm (adrenal, hígado, páncreas y testículo), pero no en diafragma. **Panel Izquierdo:** Cuando estos tejidos fueron obtenidos a las 10:00 am, no se detectaron polipéptidos. En ambos casos, los carriles control corresponden a extracto de proteínas de membrana de adrenal que se incubaron sin el primer anticuerpo.En el extremo derecho se observa el estándar de peso molecular utilizado (st).

5.3 Inmunohistoquímica de los receptores de melatonina*, in vivo* e *in vitro* (cultivo de 12 horas) de glándulas extraídas a las 10:00 am y 10:00 pm

Aún cuando se utilizaron diferentes fijadores (bouin, paraformaldheído y PLP) y protocolos de incubación y revelado, no se obtuvieron resultados reproducibles para el caso de la inmunohistoquímica de lo receptores de melatonina tanto para glándulas recién extraídas como para las cultivadas. Para el caso de la isoforma MT1 se obtuvo una observación única de buena calidad en glándula procesada inmediatamente luego de su extracción (**Figura 3**), mientras que para MT2 no fue posible lograr inmunotinción.

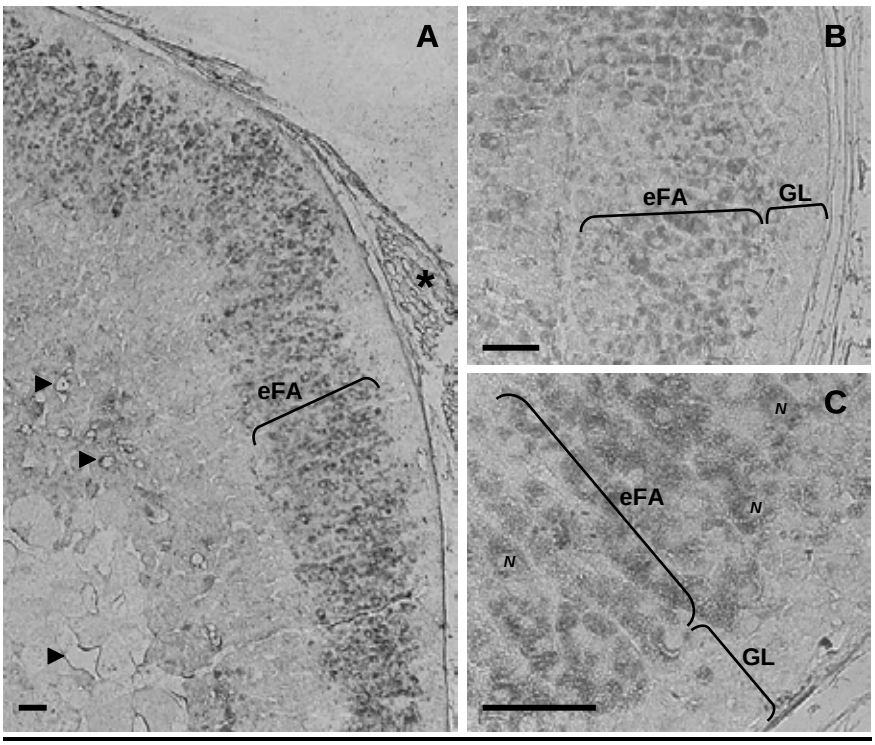


Figura 3: <u>Cortes de adrenal de rata (obtenida a las 02:00 pm), inmunoteñidos con anticuerpo policlonal anti-MT1</u>. A: la marca se restringió a la corteza adrenal, en particular a las células esteroidogénicas de la mitad externa de la capa fasciculada (eFA); a este bajo aumento, también se aprecia marca en al citoplasma y membrana celular de adipocitos asociados a la cápsula adrenal (asterisco) y a los vasos sanguíneos localizados mas profundamente en la glándula (cabezas de flecha). **B:** aumento intermedio de la corteza adrenal, donde se indican la mitad externa de la fasciculada (eFA) y glomerulosa -sin marca- (GL). **C:** mayor aumento de la marca específica exhibida por columnas de células de la mitad externa de la capa fasciculada (eFA); note que los núcleos celulares no presenta marca (3 de ellos están indicados por *N*). Los cortes se fotografiaron utilizando un sistema digital de captación de imagen: *MR GRAB Software* conectado a cámara digital Zeiss. Las barras indican 50 µm.

5.4 Evaluación de los extractos de RNA total de glándula adrenal de rata (cultivada por 12 h) mediante espectrofotometría, electroforesis y amplificación de gen constitutivo

Evaluación de las muestras de RNA total

Se determinó la integridad del RNA por medio de un gel de agarosa no denaturante, cada uno de los surcos del gel de agarosa 1,5% (tinción: bromuro de etidio) fue cargado con 3 µg de extractos de RNA total de adrenal de rata luego de 12 horas de cultivo (**Figura 4**). Ninguna muestra presentó contaminación por DNA genómico, lo cual se determina por la ausencia de tinción en los pocillos de carga. El DNA genómico, por su gran tamaño [kb] no penetra en los geles de agarosa al 1,5%. Algunas de las muestras fueron desechadas por bajo rendimiento de la extracción de RNA con respecto a muestras equivalentes (**Tabla 5**)

Evaluación de la calidad de los cDNAs

Se verificó la calidad de los cDNAs obtenidos a partir de los extractos de RNA total realizando PCR del gen constitutivo β-actina, observándose en las muestras seleccionadas que la cantidad expresada es similar entre las diferentes muestras al cargar cantidad igual de cDNA (**Figura 5)**.

Tabla 5: Muestras de RNA total de adrenal de rata luego de 12 horas de cultivo.

Muestra *	Razón Abs 260/280	µg totales	Concentración (µg/µl)
1	1.4	46.08	1.536
2	1.7	43.20	1.440
3	1.6	50.88	1.696

* Cada muestra corresponde a RNA total de 3 adrenales. Se indican las razones de Absorbancia 260/280 nm y los rendimientos en µg de RNA total/100 mg de tejido (n=3 adrenales). El número total de muestras procesadas fue de 9 (14 animales); sin embargo, en la tabla se presentan sólo las muestras seleccionadas según el análisis de integridad del RNA.

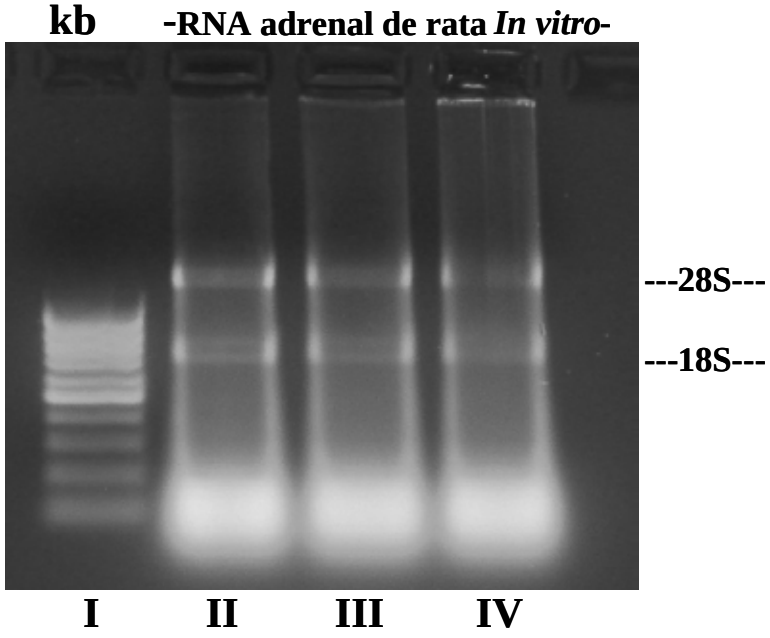


Figura 4: Análisis de cantidad relativa, posible degradación y contaminación por DNA genómico de las muestras de adrenal de rata cultivada por 12 h. Imagen digital monocromática del gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Surcos, I: Indicador de tamaño de DNA de 100 pb, II: muestra 1, III: muestra 2, IV: muestra 3, kb: Indicador de tamaño, 28S subunidad mayor de RNA ribosomal, 18S subunidad menor de RNA ribosomal. Las muestras provienen de ratas sacrificadas a las 10:00 pm, un resultado similar se obtuvo para las muestras de las 10:00 am.

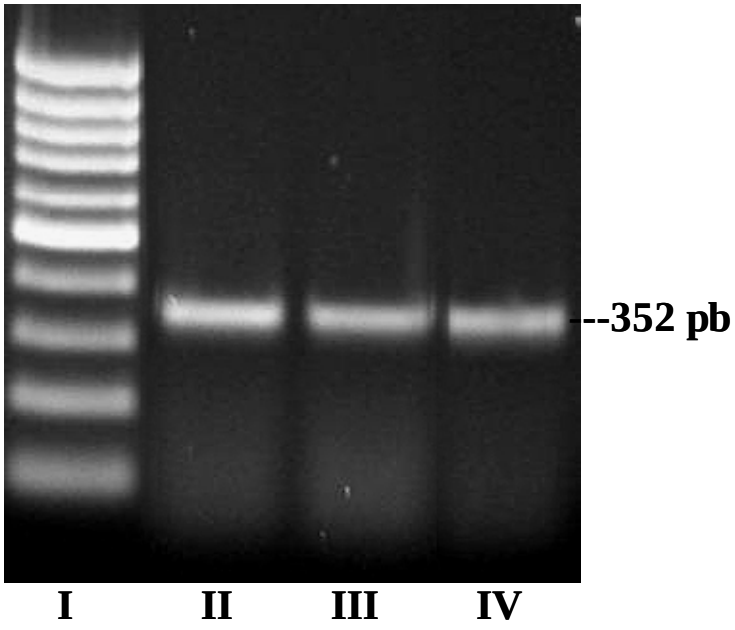


Figura 5: Análisis de calidad de los cDNAs obtenidos a partir de RNA total de adrenal de rata cultivada por 12 h. Imagen digital monocromática del gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Surcos, I: Indicador de tamaño de DNA de 100 pb, II: c DNA de muestra 1, III: c DNA de muestra 2, IV: cDNA de muestra 3. La banda que se observa en los 3 surcos corresponde al fragmento de 352 pb esperado para β-actina. Las muestras provienen de ratas sacrificadas a las 10:00 pm, un resultado similar se obtuvo para las muestras de las 10:00 am.

5.5 Amplificación de los mRNAs de los receptores de melatonina MT1, MT2 y RZRα mediante RT-PCR semi-cuantitativo en muestras de adrenal de rata *ex vivo* (Tesis paralela) e *in vitro* (presente Tesis).

En muestras mRNAs de adrenal de rata extraídas *ex-vivo* a las 10:00 pm , fue posible observar la amplificación de las bandas esperadas de 101 pb , 250 pb y de 254 pb correspondientes a MT1, MT2 y RZRα respectivamente (**Figura 6A;** resultados de Tesis paralela), resultado que se repitió para el caso de mRNAs de adrenales cultivadas por 12 h (**Figura 6B**).

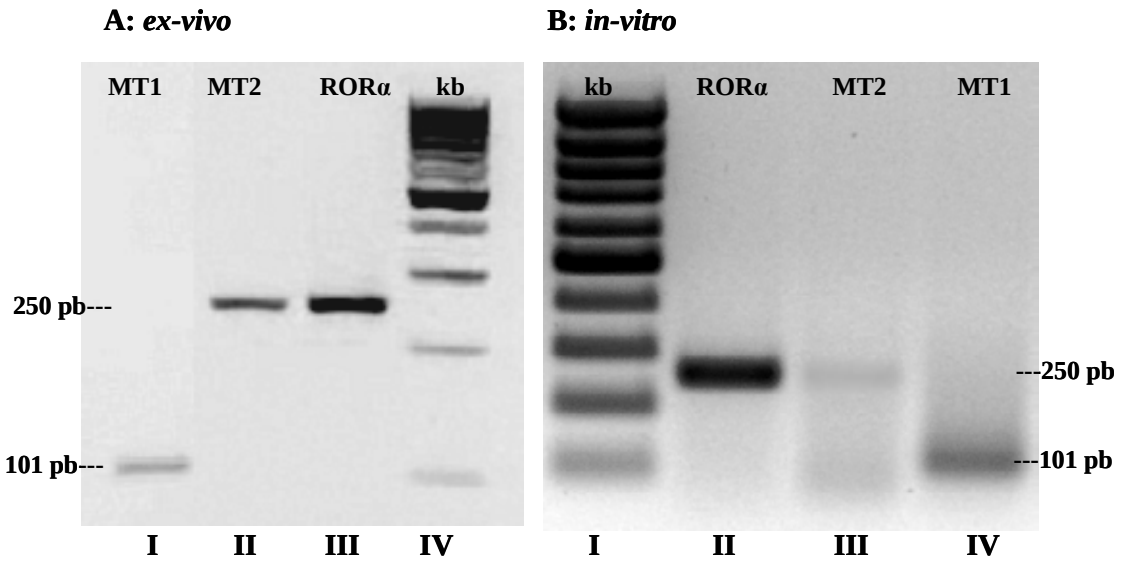


Figura 6: Expresión de receptores de melatonina MT1, MT2 y RZRα en glándula adrenal de rata *ex-vivo* y luego de 12 h de cultivo. Imagen digital monocromática del gel de agarosa al 2,0 % teñido con bromuro de etidio. **Panel A:** Muestras *ex-vivo***,** I: banda de 101 pb esperada para MT1, II banda de 250 pb esperada para MT2; III: banda de 254 pb correspondiente a RZRα: IV: Indicador de tamaño de DNA de 100 pb. Resultados de tesis paralela.

Panel B: muestras *in-vitro* I: Indicador de tamaño de DNA de 100 pb; II banda de 254 pb correspondiente a RZRα; III: banda de 250 pb esperada para MT2; IV: banda de 101 pb esperada para MT1. Las muestras provienen de ratas sacrificadas a las 10:00 pm. En las muestras de ratas sacrificadas a las 10:00 am no fue posible detectar la expresión de ninguno de los receptores de melatonina estudiados (datos no mostrados).

5.6 Análisis de viabilidad celular de glándula adrenal de rata cultivada durante 0 a 48 horas. Tinción hematoxilina-eosina y azul de toluidina.

La preservación histológica de los explantes utilizados se evalúo mediante tinción con azul de toluidina (**Figura 7**) y mediante tinción con Hematoxilina-Eosina (**Figura 8**). Observamos, en los diferentes explantes cultivados, que número de núcleos picnóticos no aumentó significativamente en el tiempo, considerandose entonces viables para realizar los ensayos posteriores.

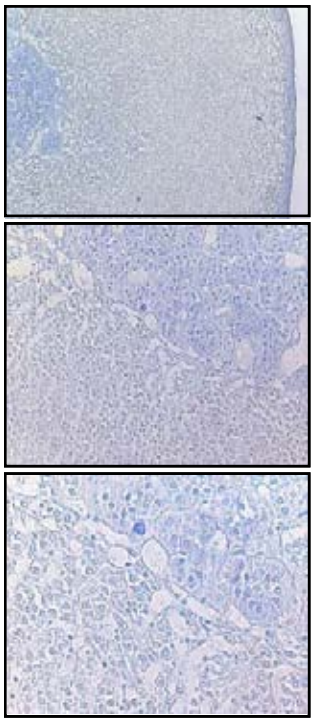


Figura 7: Preservación histológica (tinción con azul de toluidina al 5%) de explantes de adrenal de rata cultivados en DMEM-HAM F12 por 12 horas. Se observaron escasos núcleos picnóticos en los diferentes explantes cultivados, lo que indicó que los explantes fueron viables; por lo tanto las condiciones de cultivo fueron consideradas adecuadas para realizar ensayos funcionales. **Panel superior:** 10X. **Panel central:** 20X. **Panel inferior:** 40X.

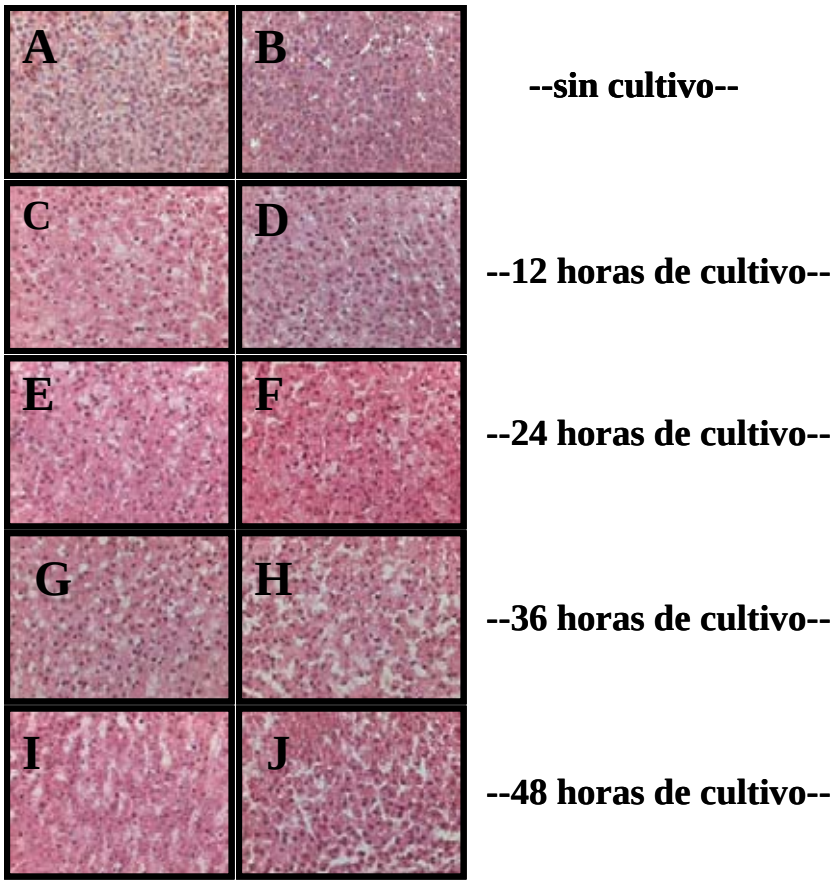


Figura 8: Preservación histológica (tinción con HE) de explantes de adrenal de rata cultivados por 0 a 48 horas. Paneles: A-B: explantes sin cultivar, C-D: cultivo por 12 hrs, E-F cultivo por 24 hrs, G- H cultivo por 36 hrs, I-J cultivo por 48 hrs. El aumento de todos los paneles es 20X. Se observa mantención de las estructuras celulares y del tejido; a medida que aumentan las horas de cultivo se produce disgregación del tejido, pero no se observa una alta mortalidad celular (i.e., el número de núcleos picnóticos no aumenta significativamente en el tiempo).

5.7 Determinación de las concentraciones plasmáticas de melatonina y corticosterona.

Se observó un marcado ritmo en la concentración plasmática de melatonina (**Figura 9A**), la cual se mantuvo baja durante el día y aumentó a partir del atardecer, lo que concuerda con lo publicado por otros autores (*Sallinen et al, 2005; Lewy et al, 1980*).

La secreción de corticoesterona medida en el plasma de estos mismos animales aumentó durante las primeras horas de la noche, alcanzando un máximo a las 02:00 am; sin embargo, se observó una disminución en el punto horario de las 10:00 pm. (**Figura 9B**),

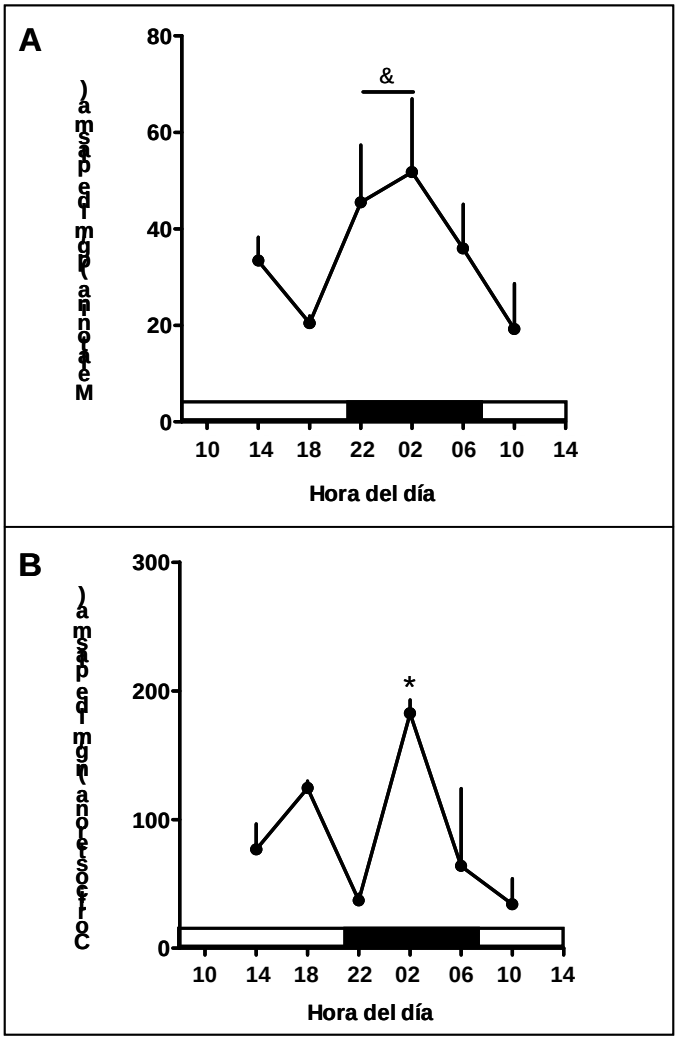


Figura 9: Concentraciones plasmáticas (promedio ± ES) de melatonina (A, n=3) y corticosterona (B, n=3) a diferentes horas del día. &: distinto de las 18 hrs (P<0.05), Test de Student; *: distinto de las 22, 06 y 14 hrs (P<0.05), ANOVA para muestras repetidas usando Newman-Keuls como Post-hoc. La barra negra indica las horas de oscuridad.

5.8 Efecto de melatonina sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH en cultivo de glándula adrenal de rata.

Considerando el tiempo involucrado en el sacrificio de los animales, en el desgrasamiento y lavado de las adrenales (aproximadamente 1 hora), los tratamientos se extendieron desde las 03:00 pm hasta las 03:00 am (en adelante “estimulación en la tarde”) para los explantes correspondientes a ratas sacrificadas a las 08:00 am y desde las 05:00 am hasta las 05:00 pm (en adelante “estimulación en la mañana”) para el caso de los explantes provenientes de las ratas sacrificadas a las 10:00 pm.

Los resultados presentados muestran que la producción de corticosterona por los explantes sometidos a estimulación en la tarde fue significativamente mayor que en los explantes cultivados cuya estimulación se realizó en la mañana. Además, se observó que la glándula adrenal de rata presenta una sensibilidad a ACTH que varía con la hora del día, debido a que los explantes de ratas sacrificadas en la mañana (08:00 am) que fueron tratadas con 100nM ACTH en la tarde, presentaron una mayor producción de corticosterona respecto del basal (**Figura 10**).

También encontramos que bajas concentraciones melatonina (1-100nM) tuvieron un efecto inhibitorio directo sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH en glándula adrenal de rata *in vitro*, ya que se observó una disminución en la producción de corticosterona en explantes tratados en la tarde. Este efecto fue casi completamente revertido por luzindol, un antagonista de receptores MT1 y MT2 de melatonina. En contraste, en los explantes tratados en la mañana, ninguna de las concentraciones de melatonina tuvo efecto sobre la producción de corticosterona. Melatonina por si sola no tuvo efecto sobre la producción de corticosterona en este modelo experimental (**Figura 10**).

Analizando ambos horarios en conjunto, encontramos diferencias significativas entre la producción basal de corticosterona, versus los explantes sometidos a tratamiento con ACTH y ACTH + melatonina + luzindol (**Figura 10**).

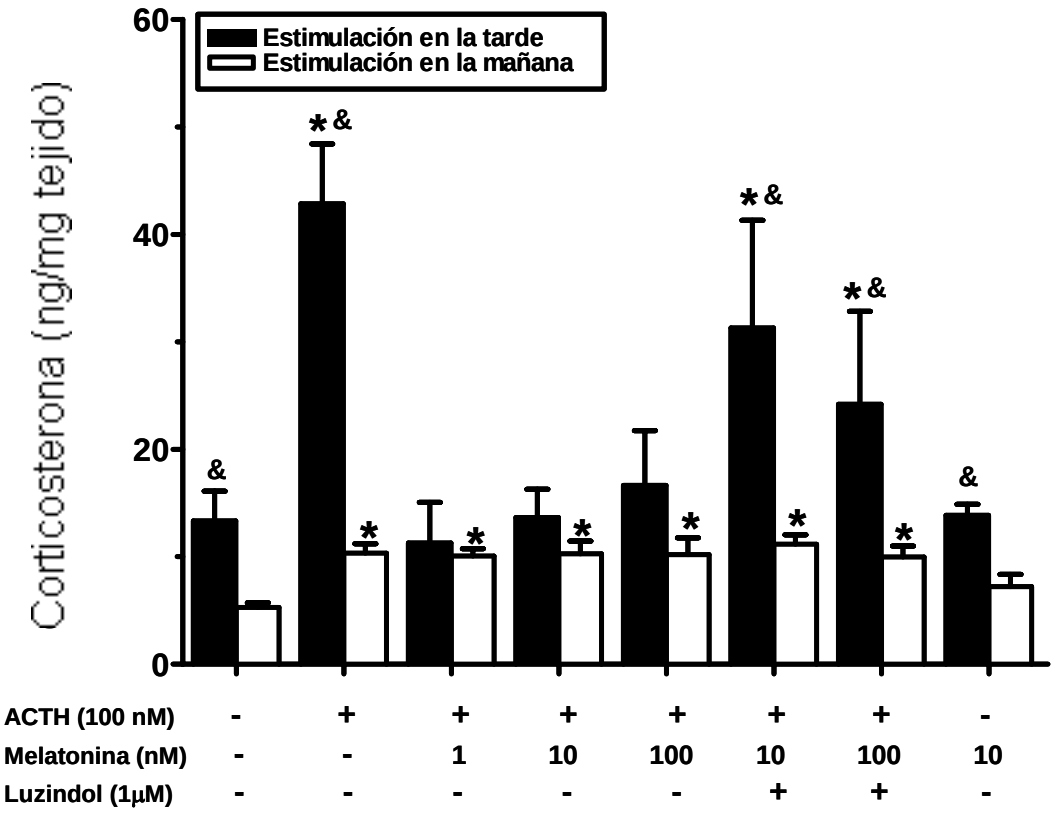


Figura 10: **<u>Efecto de ACTH y ACTH + melatonina sobre la producción (promedio ± ES) de corticosterona en explantes de adrenal de rata (n=6 explantes por condición) a 2 horas del día</u>**. Las ratas fueron eutanizadas a las 08:00 am (n= 6 estimulación en la tarde) y a las 10:00 pm (n= 6 estimulación en la mañana). Una vez obtenidas, las adrenales fueron divididas en cuartos y pre-incubadas por 6 horas, seguido por exposición a cada uno de los estímulos por 12 horas, comenzando a las 15:00 h en tejido obtenido a las 08:00 h y a las 05:00 h en tejido obtenido a las 22:00 h. *, distinto de la producción basal (P<0,05; ANOVA y Newman-Keuls como post-test). &, distinto de la producción con estimulación diurna (P<0,05; ANOVA de dos vías y Bonfferoni como post-test).

6 DISCUSION

De acuerdo a los resultados presentados podemos concluir que la glándula adrenal de rata expresa un receptor de melatonina cuya expresión cambia con las horas del día , a través del cual melatonina ejerce un efecto inhibitorio directo sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH *in vitro.* Además, una observación interesante que se desprende de nuestros resultados es que la función adrenal *in vitro* cambia con la hora del día, tanto en condiciones basales como en respuesta a ACTH.Resultados que son consistentes con la variación circadiana observada para el receptor de melatonina y que podrían estar evidenciando una capacidad intrínseca de oscilación de la glándula adrenal de rata.

En una investigación paralela de nuestro laboratorio, se realizaron ensayos de unión específica de 2-[^{125}I]iodomelatonina en extractos de proteínas de membrana y cortes de crióstato. Se determinó unión de 2-[^{125}I]iodomelatonina en muestras de adrenal de rata obtenidas a las 10:00 pm pero no a las 08:00 am; de manera saturable y reversible (constante de disociación = 14.22 ± 1.23 pM; capacidad máxima de unión = 0.88 ± 0.02 fmol/mg proteína). Previamente, se había publicado la presencia de sitios de unión de melatonina de baja afinidad (Kd 541 pM), con una capacidad total de unión de 3.23 fmol/mg proteína en adrenal de rata colectada entre las 09:30 y 11:00 am (*Persengiev, 1992*). El valor comparativamente elevado de la Kd obtenida por este autor, puede ser explicado al menos en parte por la no saturación de la isoterma de unión específica. Sin embargo, estos resultados no fueron confirmados por Pang et al (1994), quienes encontraron una muy baja densidad de unión de 2-[^{125}I]iodomelatonina con alta afinidad (< 0.2 fmol/mg proteína); no obstante, estos autores no informaron la hora de recolección de las muestras.

La expresión de transcritos codificantes para las isoformas MT1 y MT2 de receptores de melatonina, que pudieran dar cuenta de la expresión de las correspondientes proteínas, ha sido estudiada por nuestro grupo y también otros autores. Poirel et al (2003) detectaron el mRNA del receptor de melatonina MT1 en la adrenal de rata usando RT-PCR convencional. Los resultados de nuestro grupo confirman que la adrenal de rata expresa este transcrito, pero también indica la transcripción de la isoforma MT2, cuya identidad fue confirmada mediante secuenciación de ambos cDNAs. Estos resultados fueron adicionalmente confirmados por análisis de expresión de MT1 y MT2 usando PCR en tiempo real con partidores que flanquean un sitio de empalme para el único intrón de gran tamaño (> 13 kb) de estos genes.

En el presente trabajo detectamos el polipéptido esperado para MT1 (37 kDa) en extractos de proteínas de membrana de adrenal de rata, lo cual se correlaciona bien con los resultados obtenidos en paralelo en nuestro laboratorio, que indican transcripción del RNAm codificante para la isoforma MT1, así como también aquellos de unión de 2-[^{125}I]iodomelatonina. Aún cuando el PM calculado tanto para MT1 como MT2 es 39-40 kDa (*Dubocovich y Markowska, 2005*), diversos autores han encontrado una banda de 37 kDa en *Western blot* con diferentes anticuerpos anti-MT1 (*Chan et al, 1997; Song et al, 1997; Carrillo-Vico et al, 2003; Rivera-Bermudez et al, 2004*). Sin embargo, considerando el alto número de publicaciones sobre receptores de melatonina que aparecen cada año, la evidencia de expresión de las correspondientes proteínas en diferentes tejidos y especies es escasa. Esto podría explicarse por la carencia de anticuerpos de alta calidad contra receptores de melatonina; es así como no fuimos capaces de inmunodetectar la isoforma MT2 en adrenal de rata, a pesar de amplificar el mRNA de MT2 por RT-PCR convencional y en tiempo real.

Además, detectamos un polipéptido de 37 kDa en extractos de proteínas de membrana de otros tejidos periféricos, tales como hígado, páncreas y testículo, usados como controles positivos; mientras que el diafragma -seleccionado como control negativo (ver *Torres-Farfan et al, 2003*)- no presentó señal para la proteína MT1. Un hallazgo relevante de la Tesis, es que el polipéptido MT1 fue consistentemente detectado a las 10:00 pm pero no a las 10:00 am en todos los tejidos estudiados, a pesar de haber realizado este experimento varias veces usando diferentes grupos de animales. Esta marcada variación a lo largo del día sugiere que se debe poner especial atención a la hora del día, al estudiar efectos de melatonina en diversos tejidos periféricos.

Considerando que la adrenal de rata es de tamaño reducido (22± 2 mg cada una) y que, de acuerdo a nuestras mediciones, el rendimiento de proteínas de membrana es bajo después de varias horas de cultivo (en comparación a tejido *ex vivo*); no fue posible realizar detección inmunoquímica del receptor MT1 *in vitro*, puesto que habría conllevado al sacrificio de un número demasiado elevado de animales.

Resultó extremadamente díficil inmunoteñir cualquiera de las isoformas del receptor de melatonina en cortes de adrenal de rata con anticuerpos comerciales. Aún cuando probamos muestras recolectadas a diferentes horas del día, bajo diversas condiciones de fijación, inclusión, corte, inmunotinción y revelado; no fuimos capaces de inmunodetectar la isoforma MT2 (notese que por PCR convencional se detectó un bajo nivel de expresión para las glándulas cultivadas). En cambio, el uso del anticuerpo anti-MT1 nos permitió observar una marca discreta exclusivamente en muestras recolectadas a las 02:00 pm; resultado que sin embargo no fue reproducible. La inmunotinción se restringió a la mitad externa de la zona fasciculada, con células esteroidogénicas caracterizadas por una señal difusa y puntiforme a través del citoplasma, sin marca en el núcleo. Este patrón homogéneo y puntiforme de inmunotinción para el

polipéptido MT1 también ha sido observado en células HEK-293 (*Chan et al, 1997*), membrana basolateral del túbulo proximal de riñón de cobayo (*Song et al, 1997*), así como en distintos tipos celulares de retina de cobayo y humano (*Fujieda et al, 2000 y Savaskan et al, 2002*; respectivamente). La restricción de la marca a la zona fasciculada de la glándula adrenal, lugar donde se sintetizan y secretan los glucorticoides (corticoesterona en la rata) es relevante para nuestros estudios de efectos de melatonina *in vitro*. Además, el patrón restringido de la inmunotinción se relaciona bien con los bajos niveles de expresión de receptores de melatonina determinados por RT-PCR, *Western blot* y ensayos de unión específica de 2-[^{125}I]iodomelatonina.

Es importante destacar que de acuerdo a los presentes resultados y aquellos obtenidos en paralelo en nuestro laboratorio, la expresión de receptores de membrana de melatonina, acoplados a proteína G (esto es, farmacológicamente activos), es diferencial respecto a las horas del día. No fue posible detectar RNAm ni proteína de receptores de melatonina en muestras de adrenal de rata de las 10:00 am, mientras que su expresión fue evidente a las 10:00 pm; lo que se condice con el ritmo de secreción de melatonina, cuyo máximo se presenta durante la noche. Por lo tanto, la disponibilidad de receptores en la membrana se encuentra en fase con el ritmo de secreción de su ligando.

Una expresión diferencial del mRNA del receptor MT1 con respecto a las horas del día ha sido descrita en páncreas de rata, donde se encontró que el nivel de expresión era mayor durante la noche (*Peschke et al, 2006*). En hipotálamo de rata el mRNA es indetectable en la noche (12:00 am), pero detectable a medio día (12:00 pm). En este caso, se ha propuesto que melatonina puede reprimir la transcripción de su propio receptor, una vez alcanzado su máximo de secreción (*Gauer et al, 1993a y b*).

La evidencia de acciones directas de melatonina sobre producción de glucocorticoides es muy conflictiva, particularmente en roedores nocturnos como la rata (*Hajak et al, 1997*). Estos autores sometieron ratas a varias condiciones experimentales semi-fisiológicas *in vivo* y conluyeron que no existe acoplamiento evidente entre los niveles plasmáticos de melatonina y corticosterona. Esta conclusión está en línea con aquella previamente enunciada después de estudios *in vivo* (*Gromova et al, 1967; Malendowicz, 1985*) e *in vitro* (*Persengiev et al, 1989*). Sin embargo, diversos autores han obtenido evidencia de inhibición de la producción y liberación de glucocorticoides adrenales por melatonina, a través de un amplio espectro de enfoques experimentales *in vitro* e *in vivo* (*Dill, 1961; Kinson et al, 1968; Giordano et al, 1970; Nir et al, 1971; Vaughan et al, 1972; Ogle and Kitay, 1978; Oxenkrug et al, 1984; Rebuffat et al, 1987*); incluyendo el estudio de diferencias debidas al sexo y la hora del día (*Lesniewska et al, 1990 y Sanchez de la Pena et al, 1983a, 1983b*; respectivamente). Una característica sorprendente, común a todos estos trabajos, es la falta de evidencia incontrarrestable para acciones directas de melatonina sobre la función adrenal en roedores nocturnos, tal como la demostración de la expresión de receptores funcionales de melatonina en este tejido. Como se discutió anteriormente, en el presente trabajo y en otros experimentos realizados en nuestro laboratorio, abordamos exitosamente este problema usando varios métodos independientes, y sólo entonces realizamos estudios funcionales *in vitro* buscando determinar acciones directas de melatonina sobre la producción de corticosterona inducida por ACTH. Por otra parte, considerando que melatonina circulante es una fuerte señal circadiana (*Richter et al, 2004; Dubocovich y Markowska, 2005*), así como los resultados mostrados aquí, decidimos disecar diferencias dependientes de la hora del día en potenciales interacciones melatonina/ACTH para modular la producción de corticosterona en la adrenal de rata.

En primer término, realizamos determinaciones de la concentración de melatonina y corticosterona en el plasma de animales, equivalentes a los usados para cultivo, a fin de confirmar la homogenidad de la población a estudiar. Se observó un marcado ritmo en la concentración plasmática de melatonina, la cual se mantuvo baja durante el día y aumentó a partir del atardecer, lo que concuerda con lo publicado anteriormente por otros autores (*Sallinen et al, 2005*). Se ha descrito que la secreción de corticosterona en animales nocturnos aumenta durante las primeras horas de la noche (*Ulrich-Lai et al, 2006*), lo cual coincide con nuestra observación de un ritmo en la concentración plasmática de corticosterona, con un máximo a las 02:00 am. Sin embargo, observamos una caída en el punto horario de las 10:00 pm, lo que podría explicarse por muestras provenientes de animales hipo-productores de glucocorticoides.

Varios autores han descrito la modulación positiva de ACTH sobre la producción de corticosterona por adrenal de rata en cultivo (*Malendowick et al, 2004; Macho et al, 1999; Tena-Sempere et al, 2000; Andreis et al, 1992; Hung et al, 1988*). Sin embargo, ninguno de ellos menciona la hora del día en que los animales fueron sacrificados. De hecho, hasta donde sabemos, no se han publicado estudios en cultivo para verificar la existencia de una respuesta de corticosterona de distinta magnitud a lo largo del día.

Debido a la fuerte variación de la capacidad de unión de 2-[^{125}I]iodomelatonina a diferentes horas del día determinada en nuestro laboratorio, buscamos efectos *in vitro* de melatonina sobre producción de corticosterona por cuartos de adrenal recolectada a las 08:00 am y 10:00 pm; pero tratados durante la próxima tarde y mañana, respectivamente. Los resultados obtenidos con los tratamientos de la tarde fueron profundamente diferentes de aquellos de la mañana. La producción basal de corticosterona fue mayor en la tarde e incrementó hasta alrededor de 3 veces después de la administración de ACTH. En la tarde, concentraciones bajas

de melatonina inhibieron la producción de corticosterona inducida por ACTH. Por el contrario, ninguna de las dosis de melatonina administradas durante la mañana inhibieron la débil respuesta de corticosterona a ACTH a este intervalo de tiempo. Melatonina sola no cambió la secreción basal de corticosterona, indicando que modula la acción de ACTH en lugar de tener un efecto *per se*; observación coincidente con lo publicado en mono capuchino fetal y adulto (Torr*es-Farfan et al, 2003 y 2004*). La reversión observada cuando melatonina fue coadministrada con luzindol, es consistente con la presencia de receptores funcionales de membrana en las células esteroidogénicas de la corteza adrenal. Es importante hacer notar que a la concentración utilizada, luzindol no discrimina entre la isoformas MT1 y MT2 (*Dubocovich et al, 1998*). En conjunto, estos resultados sugieren que dosis fisiológicas de melatonina son capaces de inhibir directa y reversiblemente la producción de corticosterona inducida por ACTH en una manera tiempo-dependiente. Estos resultados son consistentes con una capacidad intrínseca de oscilación de la glándula adrenal de rata, evidenciada por cambios en la producción de corticosterona en condiciones basales y en respuesta a ACTH y ACTH más melatonina (presente tesis); y que además están en la línea con los resultados publicados por Andrews y Folk (1964), usando explantes de adrenal de hamster en ausencia de ACTH. En adrenales bisectadas de ratón, Sanchez de la Pena et al (1983b) encontraron que la producción de corticosterona inducida por ACTH fue atenuada o bien amplificada por la adición de homogenizados acuosos de glándula pineal a 2 y 14 h después de encender las luces, respectivamente. De nuevo, una fuerte posibilidad dando cuenta de la dependencia de la hora del día en la respuesta adrenal a melatonina en roedores nocturnos, es la variación diurna discutida anteriormente para la capacidad de unión de melatonina.

Se ha demostrado que la activación del receptor de melatonina MT1 (acoplado a proteína G), disminuye la producción de AMPc estimulada por GnRH en células de Leyding e

hipofisiarias de rata (*Valenti et al, 1999 y Vanececk et al, 1998y*; respectivamente). Lo mismo es válido para la producción de AMPc estimulada por forskolin en células inmortalizadas de NSQ de rata (River-Bermudez *et al, 2004*), sistema nervioso central de hamster Siberiano (*Carlson et al, 1991*) y pars tuberalis de oveja (*Morgan et al, 1994*). Sin embargo, en células cultivadas de adrenal de mono capuchino, el efecto inhibitorio de melatonina sobre la producción de cortisol se mantiene en presencia de dibutiril-AMPc (análogo no-hidrolizable de AMPc), sugiriendo que la acción de melatonina ocurriría en etapas posteriores a la producción de AMPc (*Torres-Farfan et al, 2003*). Podemos sugerir que melatonina ejerce su efecto disminuyendo la actividad o afectando la transcripción/traducción de enzimas involucradas en la esteroidogénesis. Esta posibilidad podría estudiarse directamente, midiendo niveles de mRNA y/o proteína de enzimas esteroidogénicas o, indirectamente, siguiendo la acumulación de algun(os) precursor(es) de corticoesterona. Las acciones de melatonina sobre la expresión de enzimas esteroidogénicas han sido demostradas en adrenal de mono capuchino donde melatonina inhibe la expresión de la enzima 3β-HSD (*Torres-Farfan et al, 2004*), asi como también ha sido reportado en células de Leydig de hamster, donde además se observó inhibición de StAR y P450scc (*Frungieri et al 2005*).

Nuestros estudios *in vitro* son limitados y no pueden ser extrapolados a la compleja regulación de la función adrenal *in vivo*; no obstante, varias observaciones en animales concuerdan con nuestros hallazgos: (1) la producción de corticosterona por la adrenal de rata presenta una mayor respuesta a ACTH en la tarde (*Dallman et al, 1978*); (2) esta diferencia se mantiene en ratas tratadas con dexametasona, indicando que los cambios en la respuesta son independientes de ACTH; (3) el ritmo circadiano de ACTH no da cuenta completamente de la oscilación de glucocorticoides, dado que ratas hipofisectomizadas sometidas a infusión de ACTH

mantienen una secreción rítmica de corticosterona (*Meier, 1976*); (4) tanto el ritmo circadiano como la respuesta de la corteza adrenal a ACTH dependen del núcleo supraquiasmático (NSQ), dado que depúes de lesión del NSQ las diferencias tarde/mañana de sensibilidad a ACTH desparecen (*Sage et al, 2002*). En estas ratas, se observan diferencias en la magnitud de la respuesta a ACTH cuando los animales son agrupados de acuerdo a la concentración basal de corticosterona; lo cual podría implicar que la glándula adrenal mantiene una capacidad intrínseca de responder diferencialmente a ACTH.

La contribución relativa del nervio esplácnico a las diferencias diurnas de la sensibilidad a ACTH de la adrenal de rata es conflictiva (*Dijkstra et al, 1996; Ulrich-Lai et al, 2006).* Sin embargo, en esta especie se ha descrito una vía autónoma funcional conectando el NSQ con la corteza adrenal (*Buijs et al, 1999*). En hamsters, la lesión del NSQ suprimió los ritmos circadianos de glucocorticoides, los cuales no fueron recuperados por transplante de NSQ normal en los animales lesionados (*Meyer-Berstein et al, 1999*). Estos hallazgos sugieren que la señalización por vía neural es un requerimiento para que el NSQ regule el ritmo circadiano de glucocorticoides adrenales.

Se debe enfatizar que los hallazgos recién discutidos no excluyen una capacidad intrínseca de la corteza adrenal para generar funciones rítmicas. Investigaciones pioneras realizadas por Andrews y Folk (1964), dónde se midió consumo de oxígeno y producción de glucocorticoides en explantes de adrenal de hamster en cultivo, demostraron que estas variables fisiológicas mantienen un ritmo circadiano por varios días. Estos resultados están en línea con la posibilidad que la adrenal sea un reloj biológico periférico. En este contexto, publicaciones recientes muestran expresión circadian de genes reloj *in vivo* en adrenal de mono rhesus y ratón (*Ishida et al, 2005; Lemos et al, 2006; Oster et al, 2006; Torres-Farfan et al, 2006b; Watanabe*

et al, 2006). Proteínas reloj son expresadas en la corteza y médula adrenal de ratón y oscilan con la misma fase (*Torres-Farfan et al, 2006b*). Así mismo, mediante PCR en tiempo real, hemos detectado transcripción oscilatoria de genes reloj en la adrenal de rata (*Richter HG, Abarzua-Catalan L y Rehren GE,* resultados sin publicar). Mas aún, una publicación reciente mostró que ratones mutantes (doble *Per2/Cry1 knockout*) son deficientes en genes reloj en la adrenal y exhiben pérdida de la ritmicidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. El transplante de adrenales de ratones normales en mutantes, restableció el ritmo de corticosterona (*Oster et al, 2006*). Claramente, factores intra-adrenales presentes al momento de recolección deben jugar un papel crítico en las respuestas de corticosterona reportadas en la presente Tesis, y nosotros especulamos que claves circadianas impuestas por la expresión de genes reloj no debieran ser descartadas. De hecho, está bien establecido que células y órganos en cultivo mantienen expresión oscilatoria de genes reloj durante varios ciclos (*Richter et al, 2004*); lo cual puede contribuír a explicar por qué en la presente investigación detectamos diferencias significativas en la respuesta de corticosterona a ACTH entre adrenales colectadas a diferentes horas del día.

En conjunto, nuestros hallazgos indican claramente no sólo expresión sino también variación diaria de la isoforma 1 de receptores funcionales de melatonina en la glándula adrenal de rata. Dado que el mRNA de MT2 no fue detectado en adrenal de mono capuchino y ratón (Torres-Farfan et al, 2003 y 2006b; respectivamente) y que nosotros no inmunodetectamos la proteína MT2 en adrenal de rata, es concebible que el efecto de melatonina sea mediado por la activación de receptores MT1. Mas aún, nuestros resultados usando adrenal de rata *in vitro*, sugieren que melatonina inhibe directamente la producción de corticosterona inducida por ACTH, en una manera tiempo-dependiente. Queda por resolver en qué extensión esta potencial

nueva acción de melatonina plasmática en roedores nocturnos es enmascarada por la superposición de señales derivadas en su mayor parte del sistema nervioso central.

Finalmente, se desconoce el mecanismo mediante el cual melatonina ejerce su efecto, por lo que son necesarias nuevas investigaciones para determinar la secuencia de eventos intracelulares desencadenada por melatonina al unirse a su receptor en la adrenal de rata, y cuales serían las enzimas reguladas por melatonina en forma directa o indirecta.

7 BIBLIOGRAFIA

Andreis P.G., Neri G., Mazzocchi G., Musajo F., Nussdorfer G.G. (1992) Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex: the involvement of the zona medullaris. Endocrinology 131: 69-72

Andrews RV, Folk GE Jr (1964) Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands. Comp Biochem Physiol 11: 393

Arlt W., P.M.Stewart. (2005) Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism an action. Endocrinol Metab Clin N Am 34: 293-313

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem ; 72: 248-254.

Bubenik GA. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. Dig Dis Sci.; 47:2336-2348.

Buckley DI, Ramachandran J. (1981).Characterization of corticotropin receptors on adrenocortical cells.Proc Natl Acad Sci U S A. 78:7431-7435.

Buijs R, Wortel J, Van Heerikhuize J, et al (1999) Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. Eur J Neurosci 11: 1535-1544

Carlberg C, Wiesenberg I (1995) The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. J Pineal Res 18:171-178

Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM(1991).Melatonin receptors and signal transduction during development in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). Brain Res Dev Brain Res; 59:83-88.

Carrillo-Vico, A. García-Pergañeda, L. Naji, J. R. Calvo, M. P. Romero and J. M. Guerrero. (2003). Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse mmune system. Cell. Mol. Life Sci.; 60 2272–2278

Chan CW, Song Y, Ailenberg M, Wheeler M, Pang SF, Brown GM, Silverman M. Studies of melatonin effects on epithelia using the human embryonic kidney-293 (HEK-293) cell line.(1997) Endocrinology; 138: 4732-4739.

Clarke B.J., Moore D.R., Blalock J.E. (1994) Adrenocorticotropic hormone stimultes a transient calcium uptake in rat lymphocytes. Endocrinology; 135: 1780-1786.

Dallman MF, Engeland WC, Rose JC, et al (1978) Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH. Am J Physiol; 235: R210

Dijkstra I, Binnekade R, Tilders FJ (1996) Diurnal variation in resting levels of corticosterone is not mediated by variation in adrenal responsiveness to adrenocorticotropin but involves splanchnic nerve integrity. Endocrinology; 137: 540-547

Djeridane Y, Touitou Y. (2001). Melatonin synthesis in the rat harderian gland: age- and time-related effects. Exp Eye Res.; 72:487-92.

Dill RE. (1961) The effect of pinealectomy or pineal extracts on corticosterone secretion in the rat. Anat Res; 139:222.

Dubocovich M.L, Yun K, Al-Ghoul W.M, (1998) Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. FASEB J 1; 12:1211-1220.

Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. (2003)Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatoninreceptors. Front Biosci.; 8:d1093-108. Review.

Dubocovich ML, Markowska M (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. Endocrine. 2:101-110

Frungieri MB, Mayerhofer A, Zitta K, Pignataro OP, Calandra RS, Gonzalez-Calvar SI (2005). Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. Endocrinology ; 146:1541-1552.

Fujieda H, Scher J, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM (2000). Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: immunocytochemical study of mt1 melatonin receptor in guinea pig retina. Vis Neurosci; 17: 63-70.

Ganguly S, Coon SL, Klein DC (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. Cell Tissue Res 309: 127-137.

Garrido.M.M., Manzanares J., Fuentes J.A. (1999) Hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland involvementin the activation of adrenocorticotropin and coricosterone secretiobn by gastrin-realising peptide. Brain Research; 828:20-26

Gauer F, Masson-Pevet M, Pevet P. (1993) Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. Brain Res.; 602:153-156.

Gilman AG.(1995) Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. Biosci Rep.;15:65-97.

Giordano GR, Balestieri R, Jacopino GE. (1970) L’action in Vitro de la melatoninesur l’hormonosynthése corticosurrenale du rat. Ann Endocrinol ; 31:1071-1080.

Gromova EA, Kraus M, Krecek J.(1967). Effect of melatonin and 5-hydroxytryptamine on aldosterone and corticosterone production by adrenal glands of normal and hypophysectomized rats. J Endocrinol.; 39:345-350.

Hajak G, Rodenbeck A., Ehrenthal H.D, Sabine Leonard, Dirk Wedekind, Georgios Sengos, Dan Zhou, Gerald Huether (1997) No evidence for a physiological coupling between melatonin and glucocorticoids Psychopharmacology; 133 : 313-322

Hung TT, LeMaire WJ (1988) The effects of corticotropin, opioid peptides and crude pituitary extract on the production of dehydroepiandrosterone and corticosterone by mature rat adrenal cells in tissue culture. J Steroid Biochem.; 29:721-726.

Ikuyama S, Niller HH, Shimura H, Akamizu T, Kohn LD (1992) Characterization of the 5'-flanking region of the rat thyrotropin receptor gene. Mol Endocrinol.; 6:793-804.

Ishida A., Mutho T., Ueyama T. (2005)Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoids release. Cell Metab; 2:297-307.

Kinson GA, Singer B, Grant L. (1968) Adrenocortical hormone secretion at various time intervals after pinealectomy in the rat. Gen Comp Endocrinol; 1:447-449.

Kobayashi H, Kromminga A, Dunlop TW, Tychsen B, Conrad F, Suzuki N, Memezawa A, Bettermann A, Aiba S, Carlberg C, Paus R (2005). A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. FASEB J; 19:1710-1712

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature; 227:680-685.

Lemos D.R., Downs J.L., Urbanski H.F (2006) Twenty-four hour rhythmic gene expression in the rhesus macaque adrenal gland. Mol Endocrinol; 20:1164-1176.

Lesniewska B, Nowak M, Nussdorfer GG, MalendowiczLK (1990). Sex-dependent effect of melatonin on the secretory activity of rat and hamster adrenal gland in vitro. Life Sci; 47:241-245.

Lewy A, Tetsuo M, Markey S, et al (1980) Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. J Clin Endocrinol Metab; 50: 204-205

Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Rubio A, Goberna R, Guerrero JM (1991) Characterization of melatonin binding sites in the harderian gland and median eminence of the rat. *Life Sci*; 48:1165-71.

Macho L, Jezova D, Zorad S, Fickova M. (1999) Postnatal monosodium glutamate treatment results in attenuation of corticosterone metabolic rate in adult rats. Endocrine regulations; 33:61-67.

Malendowicz L.K. (1985), Stereological studies on the effects of pinealectomy, melatonin and oestradiol on the adrenal cortex of ovariectomised rats J. Anat.; 141:115-120

Malendowicz L.K., SpinazziR., Tortorella C., Nussdorfer G.G., Ziolkowska A., Rucinski M. (2004). Effect of leptin frgaments on corticosterone secretion and growth of cultured rat adrenocortical cells.International.Journal or Molecular Medicine; 14 : 873-877

Masana MI, Dubocovich ML (2001). Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. Sci STKE; 107:PE39.

McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU (1997). Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU Endocrinology.; 138:627-634.

Mertz L.M., Catt K.J. (1991) Adrenocorticotropin recesptors:Funtional expression from rat adrenal m RNA in Xenopus leavis oocytes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA; 88 : 8525-8529.

Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN, Bittman EL. (1999). Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. Endocrinology.; 140:207-18.

Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R (1994). Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. Neurochem Int; 24:101–146

Nir L, Schmidt U, Hirschmann N, Sulman FG. (1971).The effect of pinealectomy on rat plasma corticosterone levels under various conditions of light. Life Sci I; .10:317-324

Ogle TF, Kitay JI. (1977). Effects of melatonin and an aqueous pineal extract on adrenal secretion of reduced steroid metabolites in female rats. Neuroendocrinology.; 23:113-120

Oxenkrug GF, McIntyre IM, Gershon S (1984). Effects of pinealectomy and aging on the serum corticosterone circadian rhythm in rats. J Pineal Res.; 1181-185.

Orth D.N., Kovacs W.J. (1998) The adrenal cortex. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (Eds), Williams textbook of endocrinology, 9th Edition, WB Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. Pp: 517

Oster H., Damerow S., Kiessling S. (2006) The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. Cell Metab; 163-173.

Pang CS., Kimmy Tsang F.L., Brown G.M., Pang S.F. (1994) Specific 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the duck adrenal gland. Neuroscience Letters; 165 : 55-58

Persengiev S.P., Kanchev L.N.y Stankov B.M. (1989). Effect of melatonin on steroid production by rat adrenals under in-vitro superfusion conditions. Life Sciences.; 44:1955-1962

Persengiev S.P. (1992). 2-[I^{125}]Iodomelatonin binding sites in rat adrenals: pharmacological characteristics and subcellular distribution. Life Sciences; 51:647-651

Peschke E, FreseT,Chankiewitz E., Peschke D, Preiss U., Schneyer U, Spessert R., Muhlbauer E (2006). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. J.Pineal Res.; 40:135–143

Poirel, V. J., Cailotto, C., Streicher, D., Pevet, P., Masson-Pevet, M., and Gauer, F. (2003) MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. Neuroendocrinol. Lett.; 24, 33–38

Pozo D., Delgado M., Fernandez-Santos J.M., Calvo J.R., Gomariz R.P., Martin-Lacave I., Ortiz G.G., Guerrero J.M. (1997) Expression of the Mel 1a melatonin receptor m RNA in t and B subsets of lym,phocytes from rat thymus and spleen. The FASEB Journal; 11: 466-473.

Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. Recent Prog Horm Res.; 52:307-357

Rebuffat P, Mazzocchi G, Gottardo G, Coi A, Meneghelli V, Nussdorfer GG.(1987)An ultrastructural morphometric study of the effects of chronic melatonin administration on the zona fasciculata of rat adrenal cortex. J Submicrosc Cytol.; 19:415-21

Reiter RJ.(1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr Rev.; 12:151-80

Reiter RJ.(1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia.; 49:654-664.

Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert SM.(1996).Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouseMel1a melatonin receptor.Endocrinology.; 137:3469-77.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor.Proc Natl Acad Sci U S A.;92:8734-8.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T.(1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. Neuron.; 13:1177-85.

Richter H, Torres-Farfan C, Rojas-Garcia P, et al (2004) The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. Biol Res; 37: 11-28.

Rivera-Bermúdez M.A., Masana M., Brown G.M., Earnest D.J., Dubocovich M.L.(2004) Inmortalized cells from the rat suprachiasmatic nucleus express funtional melatonin receptors.Brain Research; 1002: 21-27

Ross R.H., Kaye G.I, Pawlina W.(2005) Histología:Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular, 4ª Edición. Editorial Medica Panamericana Capítulo 20 644-683

Sage D., Maurel D., Bosler O. (2002) Corticosterone-dependent driving influence of the suprachiasmatic nucleus on adrenal sensivity to ACTH. Am J Physiol Endocrinol Metab; 282: E458

Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K, Ishida N. (1998) Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governedby the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. J Biol Chem.; 273:27039-27042

Sallinen P., Saarela S., Ilves M., Vakkuri O., Leppaluoto J. (2005) The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor m RNA in several rat tissues. Life Sciences; 76: 1123-1134

Sambrook J, Fritsch EF, ManiatiS T (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2a Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.

Sanchez de la Pena S, Halberg F, Halberg E, Ungar F, Cornelissen G, Sanchez E, Brown G, Scheving LE, Yunis EG, Vecsei P.(1983).Pineal modulation of ACTH 1-17 effect upon murine corticosterone production. Brain Res Bull. l; 11:117-25.

Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Brydon L, Jockers R, Ravid R, Wirz-Justice A, Muller-Spahn F. (2002). Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. J Pineal Res.; 32:59-62.

Song Y., Chan W.Y., Brown G.M., Pang S.F., Silverman M. (1997). Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37kDa receptors of Mel 1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. The FASEB Journal; 11: 93-100.

Soares JM Jr, Masana MI, Ersahin C, Dubocovich ML. (2003). Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. J Pharmacol Exp Ther. 306:694-702.

Sugden D, McArthur AJ, Ajpru S, Duniec K, Piggins HD(1999). Expression of mt(1) melatonin receptor subtype mRNA in the entrained rat suprachiasmatic nucleus: a quantitative RT-PCR study across the diurnal cycle. Brain Res Mol Brain Res.;72:176-182

Tena-Sempere M., Pinilla L., Gónzales L.C., Casaneva F.F. (2000) Homologous and heterologous down-regulation of the lepti rceptors messenger ribonucleic acid in rat adrenal gland. Journal of Endocrinology; 167: 479-486

Tijmes M, Pedraza R, Valladares L.(1996). Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. Steroids.; 61:65-8

Torres-Farfan C, Richter H, Rojas-Garcia P, et al (2003) mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. J Clin Endocrinol Metab; 88: 450-458

Torres-Farfan C., Richter H.G., Germain AM. (2004) Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. J Physiol; 554:841-856.

Torres-Farfan C., Serón-Ferré M., Dinet V.(2006). Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. J Pineal Res; 40:64-70.

Torres-Farfan C., Valenzuela F.J., Germain AM (2006) .Maternal melatonin stimulates growth and prevents maturation of the capuchin monkey fetal adrenal gland. J Pineal Res; 41:58-66.

Ulrich-Lai Y.M., Arnhold M.M.,Engeland W.C.(2006) Adrenal splanchnic innervation contributes ti the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats modulating adrenal sensivity to ACTH. A.J.P Regul..Integr.Comp.Physiol; 290: R1-R8

Valenti S, Thellung S, Florio T, Giusti M, Schettini G, Giordano G.(1999).A novel mechanism for the melatonin inhibition of testosterone secretion by rat Leydig cells: reduction of GnRH-induced increase in cytosolic Ca2+. J Mol Endocrinol; 23:299-306.

Vanecek (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. Physiol Rev; 78:687–721

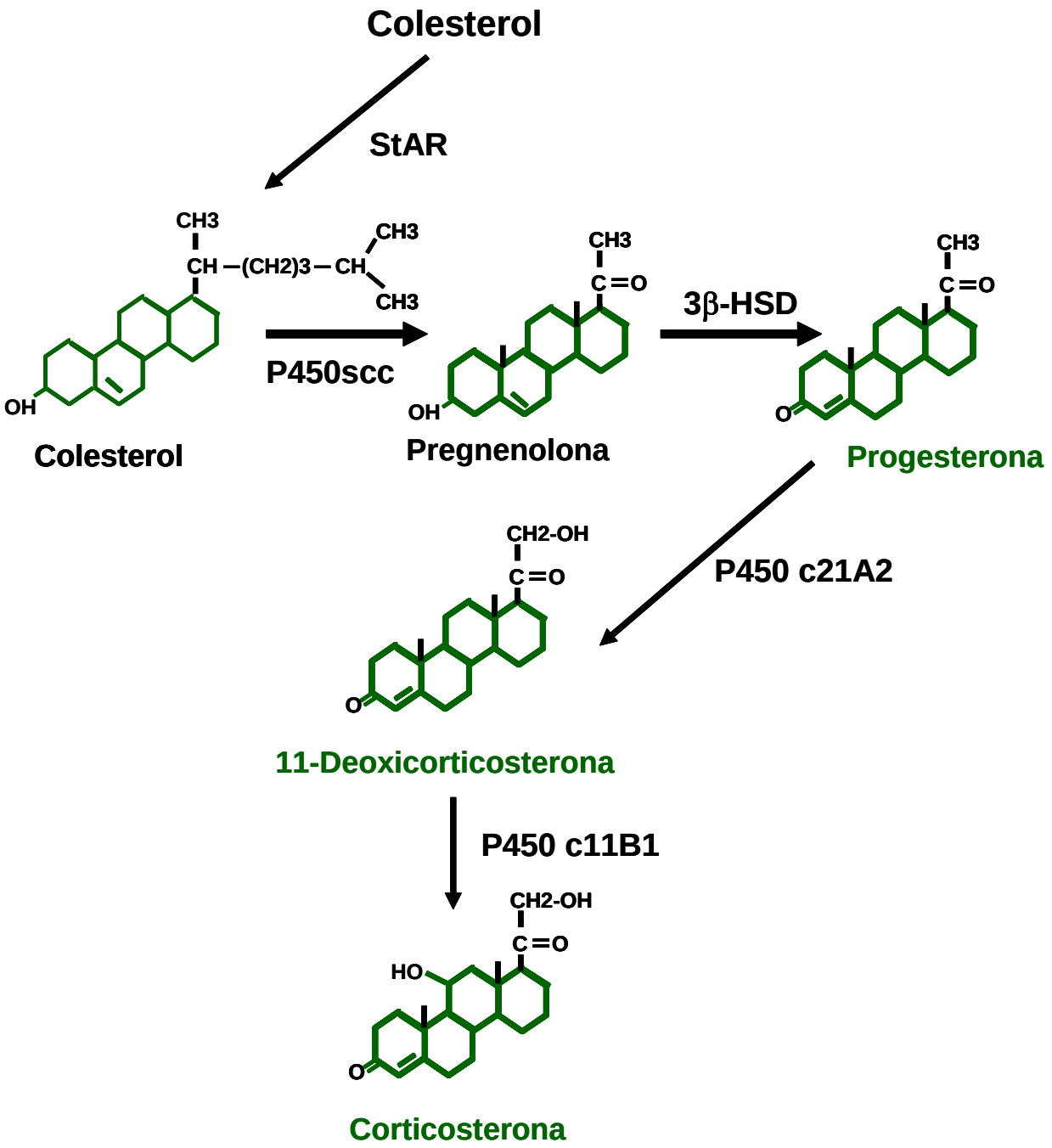
Vaughan MK, Vaughan GM, Rieter RJ.(1972). Effect of melatonin and other pineal indoles on adrenal enlargement produced in male and female mice by pinealectomy, unilateral adrenalectomy, castration, and cold stress. Neuroendocrinology; 10:139-154.

WatanabeT., Kojima M., Tomida S. (2006). Peripheral clock gene expression in CS mice with bimodal locomotor rhythms. Neurosci Res; 54:295-301.

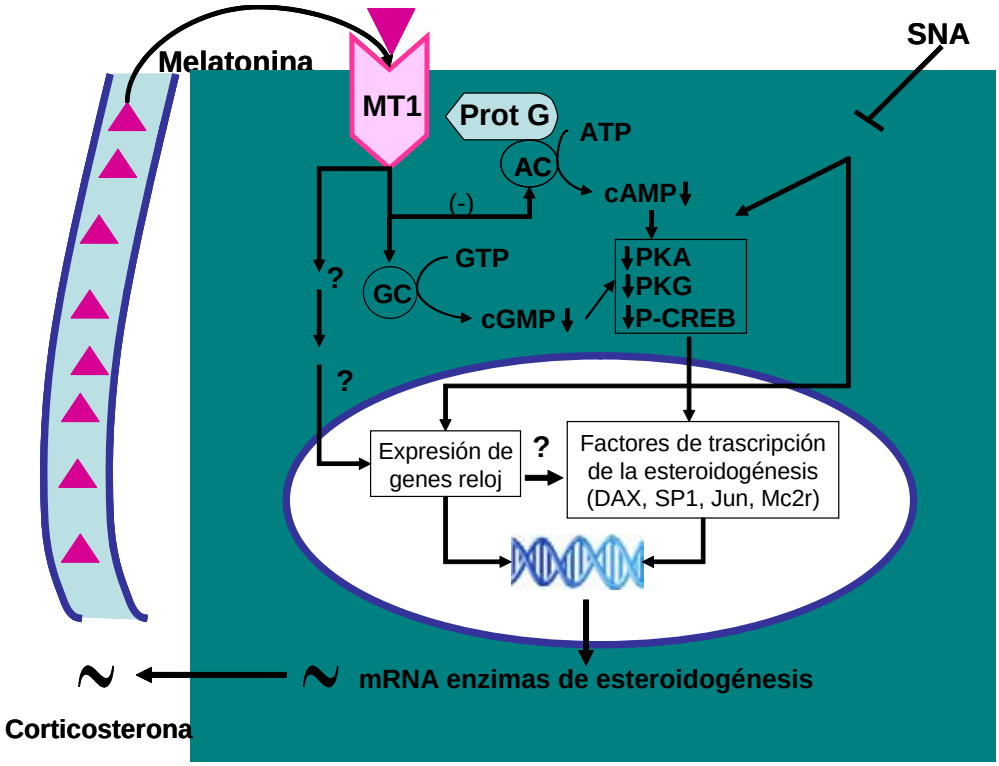
Weaver DR, Stehle JH, Stopa EG, Reppert SM (1993). Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. J. Clin Endocrinol Metab; 76:295–301

Zawilska J, Nowak JZ. (1991). Regulation of melatonin biosynthesis in vertebrate retina: involvement of dopamine in the suppressive effects of light. Folia Histochem Cytobiol.; 29(1):3-13.

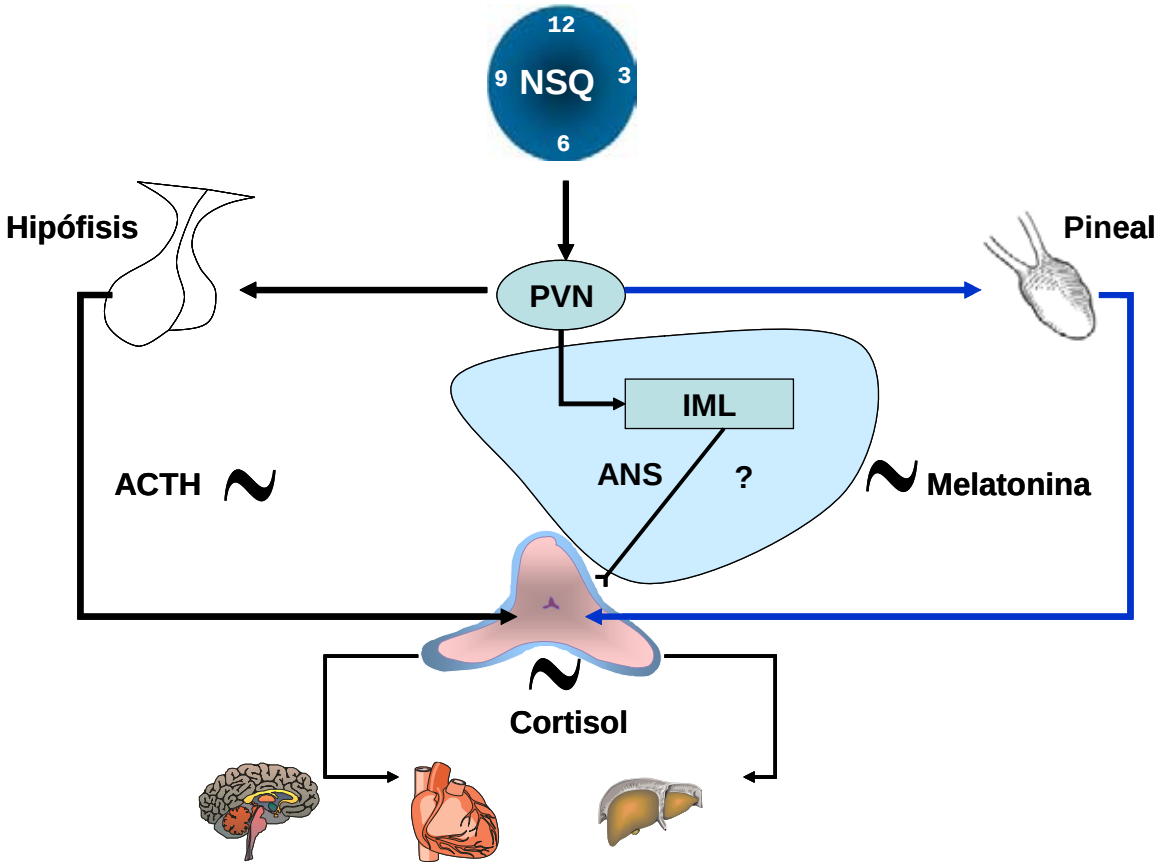
8 ANEXOS



8.1: Vía de síntesis de corticosterona en la glándula adrenal de rata.
Se indican los precursores de la ruta de biosíntesis mediante su nombre y fórmula química, mientras que las enzimas esteroidogénicas están representadas por la sigla de uso mas común.



8.2: Vías de señalización intracelular activadas por la isoforma 1 del receptor de membrana de melatonina acoplado a proteína G (MT1).
Prot G, proteína G; ATP, adenosina trifosfato; GC, guanilato ciclasa; GTP, guanosina trifosfato; AC, adenilato ciclasa; cGMP, guanosina monofosfato cíclico; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; PKA, proteína quinasa A; PKG, proteína quinasa G; P-CREB, proteína fosforilada de unión del sitio de respuesta a cAMP; SNA, sistema nervioso autónomo.



8.3: Vías neuroendocrinas y neurales que sitúan a la glándula adrenal en el contexto de integración de ritmos circadianos.
NSQ, núcleo supraquiasmático del hipotálamo; PVN, núcleo paraventricular; IML, columna intermedio lateral de la médula espinal; ACTH, adrenocorticotropina; ANS, sistema nervioso autónomo.