



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias

Escuela de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Hans Richter B.

Instituto de Histología y Patología

Facultad de Medicina

PROFESOR CO-PATROCINANTE

Dra. Claudia Torres-Farfán

ICBM, Facultad de Medicina

Universidad de Chile

**EXPRESIÓN, IDENTIDAD Y ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE RECEPTORES DE
MELATONINA EN LA GLÁNDULA ADRENAL DE RATA**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al **Grado de
Licenciado en Ciencias Biológicas.**

MAURICIO GABRIEL HENRIQUEZ CARDENAS

VALDIVIA -CHILE

2007

A mi familia y amigos, de esta y otras batallas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi profesor patrocinante, Dr. Hans Richter B. por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y asimismo a la Dra. Claudia Torres-Farfán, por su continuo apoyo y orientación, que contribuyeron al desarrollo y término exitoso de esta Tesis. Vayan también mis agradecimientos a los Drs Jaime Figueroa Valverde y José Sarmiento, quienes me apoyaron oportunamente y generosamente con equipos y entrenamiento en técnicas de biología molecular. También agradezco a la Dra. Gladis Ruiz, Directora de la Escuela de Ciencias y a todos los profesores por su larga paciencia.

Quiero agradecer a todo el personal del Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, por su colaboración durante la estadía en este laboratorio y en especial a mis compañeros de laboratorio Jocelyn García, Lorena Abarzúa, Mauro Alvarez, Fernando Gaete, Pamela Ehrenfeld; sin cuyo respaldo me hubiese sido imposible terminar el presente trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mis padres Leticia y Gabriel por su espera y apoyo incondicional.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile y financiado por los **proyectos FONDECYT Nº 1050389 y DID-UACH S-200433.**

INDICE

| | Página |
|--|--------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 1.1 SUMMARY | 2 |
| 2. INTRODUCCION | 3 |
| 2.1. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS | 10 |
| 3. MATERIAL Y METODOS | 11 |
| 3.1 . Animales de experimentación | 11 |
| 3.2 . Equipos e insumos | 11 |
| 3.3 . Reactivos | 12 |
| 3.4 . Partidores usados para RT-PCR convencional | 14 |
| 3.5 . Extracción de RNA total con reactivo Trizol | 18 |
| 3.6 . Extracción de RNA total con sistema Ambion | 20 |
| 3.7 . Purificación adicional de RNA total por precipitación con Cloruro de Litio (LiCl) | 21 |
| 3.8 . Digestión de RNA total con DNasa I | 22 |
| 3.9 . Transcripción reversa | 22 |
| 3.10 . Reacción de DNA polimerasa en cadena (PCR) | 23 |
| 3.11 . Clonamiento | 24 |
| 3.12 . PCR en tiempo real (qPCR) | 27 |
| 3.13 . Extracción de proteínas de membrana | 30 |
| 3.14 . Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3.15 . Ensayos de unión específica de 2-[¹²⁵ I]iodomelatonina en preparaciones de membrana | 32 |
| 3.16 . Ensayos de unión específica de 2-[¹²⁵ I]iodomelatonina en cortes congelados | 33 |
| 4. RESULTADOS | 35 |
| 4.1 . Obtención y evaluación de muestras de RNA total para RT-PCR convencional | 35 |
| 4.2 . RT-PCR convencional de MT1/MT2 y purificación de fragmentos de PCR | 39 |
| 4.3 . Clonamiento y secuenciación de cDNAs parciales de MT1 y MT2 | 41 |
| 4.4 . Obtención y evaluación de muestras de RNA total para RT-PCR en tiempo real (qPCR) | 44 |
| 4.5 . qPCR de MT1 | 47 |
| 4.6 . Evaluación electroforética de extractos de proteínas de membrana | 52 |
| 4.7 . unión específica de 2-[¹²⁵ I]iodomelatonina en adrenal de rata | 54 |
| 5. DISCUSION | 58 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 66 |

1. RESUMEN

Evidencia reciente sugiere que la producción circadiana de glucocorticoides adrenales es regulada no sólo por ACTH, innervación y factores intra-adrenales, sino también por expresión local de genes reloj y la neurohormona melatonina. Sin embargo, existe escasa evidencia indicando acciones directas de melatonina sobre función adrenal, tal como la demostración de expresión de receptores funcionales de melatonina en este tejido; particularmente en roedores nocturnos. En el presente trabajo, realizamos experimentos de RT-PCR convencional, clonamiento, secuenciación, PCR en tiempo real y ensayos de unión y desplazamiento de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en la glándula adrenal de rata. Nuestros resultados demuestran que este tejido expresa los mRNAs codificantes para receptores de melatonina tanto de membrana (MT1 y MT2) como nucleares (ROR α), y presenta unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina a las 2200 pero no 0800 h, la cual es específica, saturable, reversible y de alta afinidad (constante de disociación = 14.22 ± 1.23 pM; capacidad máxima de unión = 0.88 ± 0.02 fmol/mg proteína). En conjunto, estos y otros hallazgos de nuestro laboratorio, incluyendo la detección inmunoquímica del receptor MT1 en adrenal obtenida a las 2200 pero no 1000 h; indican no sólo expresión, sino también una variación diurna bien definida de receptores de melatonina farmacológicamente activos en la glándula adrenal de rata; alcanzando un máximo durante la transición luz/oscuridad. El mecanismo de acción y el papel jugado por melatonina en la función adrenal necesitan ser investigados de aquí en adelante.

1.1. SUMMARY

Recent evidence suggests that circadian production of adrenal glucocorticoids is regulated not only by ACTH, innervation and intra-adrenal factors, but also by local clock gene expression and the neurohormone melatonin. However, undeniable evidence for direct actions of melatonin on adrenal function -such as demonstration of functional melatonin receptors expression in this tissue- is sparse, particularly in nocturnal rodents. Here, we carried out experiments of conventional RT-PCR, cloning, sequencing, qPCR, and 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding and competition studies in the rat adrenal gland. Our results demonstrate that this tissue expresses the cognate mRNAs encoding for MT1 and MT2 membrane-bound and ROR α putative nuclear melatonin receptors, and displays 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding at 2200 but not 0800 h, which is specific, saturable, reversible and of high affinity (dissociation constant = 14.22 ± 1.23 pM; maximal binding capacity = 0.88 ± 0.02 fmol/mg protein). On the whole, these and other findings of our laboratory (including immunochemical detection of the MT1 receptor in adrenal collected at 2200 but not 1000 h), indicate not only expression but also a well-defined diurnal variation of pharmacologically active melatonin receptors in the rat adrenal gland, peaking during the light/dark transition. Henceforth, the mechanism of action and role of melatonin in rat adrenal function remain to be investigated.

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 los 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 glomerulosa 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, ovejas, etc) y corticosterona (ratones, ratas) los que regulan el metabolismo de glucosa y ácidos grasos, además preparan a los distintos sistemas para la conducta lucha/huida propia de la respuesta al estrés y suprimen la respuesta inflamatoria; y zona reticular o interna que constituye sólo entre el 5-7% de la corteza y secreta andrógenos débiles como dehidroepiandrosterona y su sulfato precursores de la síntesis de estradiol y testosterona en la gónada (Ross et al, 2005).

En la mayoría de las especies, la concentración plasmática de glucocorticoides muestra un marcado ritmo circadiano. La fase de este ritmo es opuesta en animales nocturnos y diurnos. En la rata, un mamífero nocturno, el máximo de corticosterona plasmática (el principal glucocorticoide en esta especie) se encuentra al comienzo de la

noche, coincidiendo con el inicio de las horas de actividad (Orth y Kovacs, 1998). Es un hecho bien establecido que la producción de glucocorticoides involucra la acción concertada del ritmo circadiano de la hormona hipofisiaria adrenocorticotrópica (ACTH), inervación adrenal y factores adrenales locales (Dallman et al, 1978; Bornstein y Chrousos, 1999; Engeland y Arnhold, 2005). Sin embargo, existe nueva evidencia que sugiere la participación de factores reguladores adicionales tales como la capacidad oscilatoria intrínseca de la glándula adrenal como un reloj periférico (Ishida et al, 2005; Lemos et al, 2006; Oster et al, 2006; Torres-Farfan et al, 2006a; Watanabe et al, 2006) y la neurohormona melatonina (Torres-Farfan et al, 2003, 2004, 2006b).

Melatonina es una hormona de tipo indolamina que es sintetizada en forma rítmica principalmente por la glándula pineal (Lewy et al, 1980; Reiter, 1991). En mamíferos tanto diurnos como nocturnos, la mayor concentración plásmatica de melatonina se alcanza durante las primeras horas de oscuridad y se mantiene en bajas concentraciones durante las horas de luz (Lewy et al, 1980; Ganguly et al, 2002). Además, 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 (circadiana), sino también indica la estación del año. En realidad, el ritmo de melatonina como señal estacional está claramente establecido tanto en mamíferos diurnos como nocturnos (Reiter, 1993).

En mamíferos, melatonina actúa a través de la activación de al menos dos isoformas de receptores de alta afinidad acoplados a proteína G, denominados MT1 y MT2; los cuales exhiben estructuras moleculares, características farmacológicas y localizaciones cromosomales distintivas (Dubocovich, 1995, 2003; Richter et al, 2004;

Dubocovich y Markowska, 2005). Los receptores de membrana de melatonina presentan una constante de disociación (Kd) del orden picomolar (Morgan et al, 1994). La predicción derivada de perfiles computacionales de hidrofobicidad es que ambas isoformas corresponderían a receptores de siete dominios transmembrana, compuestos de 2 exones y un gran intrón de unos 13 kb (Reppert et al, 1995). A nivel de DNA, MT1 y MT2 poseen: (1) un promotor sin caja TATA, lo que es común en genes con múltiples sitios de inicio de la transcripción (Reppert et al, 1995); (2) un zona rica en AT que podría dar inicio a la transcripción; y (3) una zona con alto contenido de GC como se ha descrito en otros receptores acoplados a proteínas G (Ikuyama et al, 1992).

Los receptores MT1 y MT2 comprenden 350 y 362 aminoácidos, respectivamente, con pesos moleculares calculados de 39-40 kDa. La secuencia aminoacídica de MT1 es altamente conservada en diferentes especies como humano, rata, hamster y oveja (Reppert et al, 1996; Song et al, 1997). Los receptores de melatonina MT1 y MT2 tienen sitios potenciales de glicosilación en su extremo amino terminal, además de sitios potenciales de fosforilación por proteína quinasa C (PKC), caseína quinasa 1 y 2 y proteína quinasa A (PKA); los cuales podrían participar en la regulación de la función del receptor, como se ha demostrado para otros receptores acoplados a proteína G (Dubocovich y Markowska, 2005). Los receptores de melatonina MT1 y MT2 pertenecen a un grupo distintivo dentro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, dado que presentan un motivo NRY, en lugar de DRY (o ERY) que está presente en el dominio intracelular II de todos los receptores acoplados a proteína G. Esta región del receptor MT1 está involucrada en tráfico del receptor y en señalización celular. Un puente disulfuro entre Cys 113 y Cys 190 es

esencial para unión de melatonina con alta afinidad a MT2 y posiblemente también a receptores MT1. Mutagénesis sitio-dirigida ha revelado características estructurales únicas dentro de la estructura molecular de los receptores de melatonina MT1 y MT2, tales como bolsillos de unión potencialmente diferenciales para reconocimiento de ligando (ver Dubocovich y Markowska, 2005). La señalización de los receptores de melatonina MT1 y MT2 ocurre por acoplamiento de proteínas G_i heterotriméricas formadas por subunidades α , β y γ . La activación de estos receptores promueve la disociación de las proteínas G en dímeros α y $\beta\gamma$, los cuales interactúan con varias moléculas efectoras involucradas en la transmisión de señales intracelulares (Gilman, 1995). Los sistemas efectoros involucrados en señalización de receptores de melatonina MT1 y MT2 a través de acoplamiento de proteína G incluyen adenilato ciclasa, fosfolipasa C, fosfolipasa A2, canales de potasio y potencialmente guanidil ciclasa y canales de calcio (Dubocovich et al, 2003; Dubocovich y Markowska, 2005; Vanecek, 1998). Ver **Figura 1**.

A nivel nuclear se han descrito probables sitios de unión a melatonina, denominados ROR α (alternativamente, complejo RZR:ROR), pertenecientes a la familia de receptores huérfanos de ácido retinoico (Carlberg and Wiesenberg, 1995; Vanecek, 1998). Ver **Figura 1**.

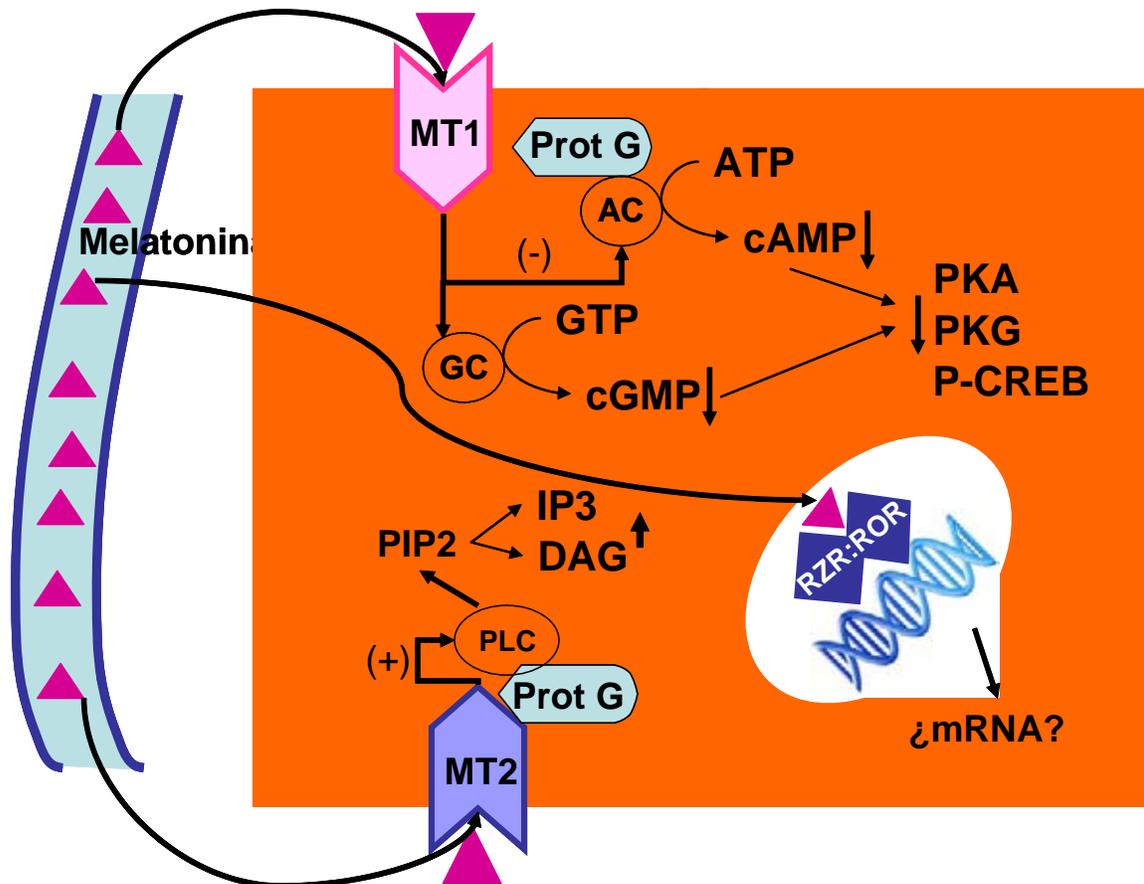


Figura 1: Vías de señalización intracelular activadas por los receptores de melatonina unidos a membrana y acoplados a proteína G (isoformas MT1 y MT2) y los putativos receptores nucleares de melatonina (ROR α). Prot G, proteína G; ATP, adenosina trifosfato; GC, guanilato ciclasa; GTP, guanosina trifosfato; 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; IP3, inositol trifosfato; PIP2, inositol difosfato; DAG, diacilglicerol; PLC, fosfolipasa C; RZR-ROR, complejo dimérico de receptores nucleares huérfanos de ácido retinoico (nombre genérico: ROR α); mRNA, ARNm.

Melatonina regula distintas funciones en una variedad de tejidos y especies a través de la activación de receptores específicos para esta hormona. Respuestas funcionales bien definidas mediadas por activación de receptores MT1 incluyen: modulación de potenciales de acción neuronal, vasoconstricción arterial, proliferación de células tumorales y de funciones reproductivas y metabólicas. La activación de la isoforma MT2 produce cambios de fase de los potenciales de acción en neuronas del núcleo supraquiasmático, inhibición de la liberación de dopamina en retina, inducción de vasodilatación e inhibición de movilidad leucocitaria en lechos arteriales, además de potenciar respuestas del sistema inmune (revisado en Richter et al, 2004 y Dubocovich y Markowska, 2005).

Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró la expresión de receptores de melatonina en la glándula adrenal de un mamífero diurno, el mono capuchino, un primate no humano del nuevo mundo. En esta especie, encontramos que la unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina está restringida a la corteza adrenal e identificamos los receptores expresados como la isoforma MT1; con valores de Kd (96.9 ± 15 pM) y Bmax (3.8 ± 0.4 fmol/mg proteína), dentro del rango publicado por otros autores (revisado en Dubocovich, 1995). Estos receptores son funcionales, dado que demostramos que melatonina inhibe directamente la producción de cortisol estimulada por ACTH en adrenal de especímenes fetales y adultos de mono capuchino (Torres-Farfan et al, 2003, 2004, 2006b). Esta es la primera evidencia de expresión de receptores funcionales de melatonina en la glándula adrenal de mamíferos.

En ratones, recientemente publicamos la detección del receptor de melatonina MT1 por RT-PCR en adrenal de ratones C3H/C57BL (Torres-Farfan et al, 2006a).

Respecto de la rata, se ha descrito expresión del mRNA de la isoforma MT2 en glándula de Harderian (Poirel et al, 2003) e hipotálamo (Sudgen et al, 1999). También por RT-PCR convencional, Poirel et al (2003) detectaron mRNA de la isoforma MT1 en 37 de 39 tejidos periféricos de rata, incluyendo la glándula adrenal. En esta especie, se ha publicado la presencia de sitios de unión de melatonina de baja afinidad (Persengiev, 1992), pero este hallazgo no pudo ser confirmado por Pang et al (1994).

En realidad, se ha debatido por muchos años si melatonina juega directamente algún papel como un transductor neuroendocrino para la función adrenal en roedores nocturnos. Sorprendentemente, la mayor parte de la literatura abordando esta problemática no aporta evidencia de expresión de receptores funcionales de melatonina en la glándula adrenal de ratón/rata. Este escenario nos llevó a desarrollar la presente investigación, la cual está centrada en tres objetivos a abordar en la glándula adrenal de rata *ex vivo*: (1) determinar la expresión e identificar los mRNAs de los receptores de melatonina de membrana MT1 y MT2 y nucleares ROR α ; (2) calcular los valores de constante de disociación y capacidad máxima de unión del radioligando 2-[¹²⁵I]iodomelatonina; y (3) establecer si la capacidad de unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina sufre variaciones en el curso de las 24 h del día. Este último objetivo se basa en las propiedades de reloj biológico periférico que se han demostrado recientemente en adrenal de primates diurnos y roedores nocturnos (Ishida et al, 2005; Lemos et al, 2006; Oster et al, 2006; Torres-Farfan et al, 2006a; Watanabe et al, 2006).

2.1. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

La glándula adrenal de rata expresa receptores funcionales de melatonina.

Objetivo General

(1) Establecer la expresión, identidad y actividad farmacológica de receptores de melatonina en la glándula adrenal de rata.

Objetivos Específicos

(1) Determinar la expresión e identificar los mRNAs de las isoformas MT1 y MT2 del receptor de melatonina en la glándula adrenal de rata.

(2) Calcular los valores de constante de disociación y capacidad máxima de unión del radioligando 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en preparaciones de membrana y cortes congelados de adrenal de rata.

(3) Establecer si la capacidad unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina por la glándula adrenal de rata sufre variaciones en el curso de las 24 h del día.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Animales de experimentación

En la presente tesis, se utilizaron las glándulas adrenales y otros tejidos de ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley de aproximadamente 2.5 meses de edad y 250 g de peso corporal. Los animales permanecieron bajo un fotoperíodo luz:oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 0800 h y apagadas a las 2000 h) y recibieron alimentación (*pellet* y agua) *ad libitum*. Todos los procedimientos de manejo de los animales se realizaron siguiendo las recomendaciones de *NIH (Guide for Animal Experimentation Care)*. Todos los experimentos y protocolos fueron aprobados por la comisión “Utilización de animales en la investigación de la Universidad Austral de Chile”, en Junio del 2004. Los restos de animales sacrificados fueron cremados en el incinerador del Fundo Teja Norte de la Universidad Austral de Chile, donde se descartan los desechos biológicos, de acuerdo al “Manual de Procedimiento de Manejo de Residuos” de la Universidad Austral de Chile.

3.2. Equipos e insumos

Centrífuga refrigerada, marca Hettich, modelo Zentrifugen MIKRO 200R. Homogenizador Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL, IKA-Labortechnik). Ultra centrífuga a 4°C *Beckman Optima LE-80K* con rotor 70 Ti. Baño termostático seco (Barnstead Thermolyne Tyse 17600 pm-Bath). Espectrofotómetros UV-VIS 1203 (Shimadzu) y *Meterterk SP830* (Arquimed). Sistema de electroforesis DNA/RNA Sub-Cell GT Agarose Gel (Biorad). Estufa termostática (Boekel Scientific). Fuente de

poder *Consort E833* (Arquimed). *pH meter CG840* (Schott). Termociclador GeneAmp 2400 System (Perkin Elmer). Sistema de electroforesis de proteínas Mini Protean III Cell (Biorad). Horno de hibridación Shake'N'Bake (Boekel Scientific). Vortex *Genie 2* (Scientific Industries). Transiluminador UV Vilber- Lourmat. Balanza analítica. Sonicador *Ultrasonic Homogenizer* (Cole-Palmer Instrument Corp). Cámara digital Olympus Camedia Master 4.1. Tubos de policarbonato de 5 ml. Microtubos de 1.5 y 0.6 ml. Microtubos de pared delgada (PCR) de 0,2 ml. Material quirúrgico estéril (pinzas, hojas de bisturí, tijeras). Lupa y lámpara *Nikon*. Cubeta de plástico de 1ml. Placas *Petri*.. Lámpara de luz roja (<0.2 lux). Micropipetas Gilson y Nichipet (P2, P10 , P20, P100, P200 y P1000). Puntas de micropipeta estériles, con filtro, certificadas como libres de nucleasas, proteasas y pirógenos (AXYGEN). Tubos de ensayo de vidrio de 5 ml. Jeringas 21 G Nunc. Sistema de PCR en tiempo real LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics). Capilares LightCycler de 20 µl (Roche Diagnostics).

3.3. Reactivos

Extracción de ácido ribonucleico (RNA): los reactivos usados fueron Trizol (Invitrogen Corp), se obtuvo además cloroformo (Winkler Ltda), etanol absoluto (Merck) e alcohol isopropílico (Winkler) y agua *DEPC-treated* (Invitrogen Corp). Alternativamente, se extrajo RNA total usando el sistema *RNAqueous-Midi Large Scale Phenol-Free Total RNA Isolation Kit* de Ambion Corp.

Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de DNA polimerasa (RT-PCR) convencional: se realizó digestión de las muestras de RNA total con DNasa I,

transcripción reversa y amplificación por PCR usando los reactivos correspondientes de Invitrogen Corp (Carlsbad, CA, USA). Los procedimientos se describen en Métodos.

Clonamiento: se utilizó el sistema de clonamiento pGEM-T Easy Vector System I (Promega Corp, código A1360), con los reactivos del kit.

PCR en tiempo real: se usó el equipo descrito mas arriba, con la mezcla comercial de reacción *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics) y agua DEPC-treated (Invitrogen Corp).

Extracción y electroforesis de proteínas: para la extracción se utilizó EDTA, cóctel de inhibidores de proteasas, y albúmina de bovino de Sigma-Aldrich Corp, además de bicarbonato de amonio (Riedel-de Haën) y reactivo de Bradford 1X (Biorad). Para la electroforesis se usó Tris y acrilamida 99.9% (Biorad); N,N'-Metilen-Bisacrilamida, SDS, persulfato de amonio al 10 % y TEMED 99% (Sigma-Aldrich Corp); Benchmark *Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen Corp); metanol absoluto 99% (Merck). 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). El tampón de corrida fue Tris-HCl 0,025 M (pH 8,3), Glicina 0,192 M y SDS 0,1 % (P/V) (Sigma-Aldrich Corp).

Ensayos de unión específica de 2-[¹²⁵I]]iodomelatonina: 2-[¹²⁵I]]iodomelatonina (NEN Life Science Products, Boston, MA; actividad específica 2200 Ci/mmol), melatonina, filtros de membrana de microfibras de borosilicato (tamaño de poro: 1 µm, GC50; Advantec MFS Inc, Pleasanton, CA, USA). Contador de centelleo γ-counter LKB, paraformaldehído al 4%, gradiente de sucrosa, portaobjetos Superfrost (Thomas, Swedesboro, NJ), película de exposición ¹²⁵I-Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, UK), cassette de exposición para rayos X, sistema de revelado KODAK Image Station XP-100. Tampón Tris (25 mM Tris-HCl; 25 mM CaCl₂; 0.2% BSA, pH 7.5), cocktail de inhibidores de proteasas, luzindol (antagonista de receptores de melatonina MT1 y MT2) y guanosina 5 γ -trifosfato (GTP) γ -S (análogo no hidrolizable de GTP) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Corp.

3.4. Partidores usados para RT-PCR convencional

En este trabajo, se usaron dos estrategias para obtener partidores de PCR eficientes: partidores publicados por otros investigadores, chequeados en cuanto a la calidad de bandas y parámetros termodinámicos; y de igual manera, pero modificados para su optimización. En todos los casos, se consideró el cumplimiento de las siguientes exigencias mínimas: (1) tamaño óptimo del fragmento de 200-400 pb para RT-PCR convencional y 100-300 pb para PCR en tiempo real; (2) tamaño mínimo de cada partidor 20 bases; (3) rango de T_m 50-60 °C; (4) estabilidad de extremos “internos” media-alta; (5) formación teórica de dímeros y *loops* igual a 2 configuraciones como máximo; (6) todos los cDNAs amplificados deben contener al menos un sitio de inserción para intrón; y (7) la secuencia de los partidores no debe aparearse significativamente con otras secuencias publicadas en *GeneBank*.

Para cada gen de interés, se realizó una búsqueda en *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), obteniendo la secuencia del RNA mensajero y de la proteína codificada en *Rattus norvegicus*. Tanto los partidores *sense* (5'-3') como *antisense* (3'-5'), fueron analizados posteriormente por el programa *BLASTn*, para determinar el tamaño del fragmento generado por el par de partidores

correspondientes; además se realizó un análisis termodinámico para cada partidor, usando el programa *DNAclub* (freeware; <http://128.84.203.244>, creado y registrado a nombre de Xiongcong Chen).

Por otra parte, se utilizó β -actina como gen constitutivo ya que este posee mayor estabilidad en cuanto a los niveles de transcripción. La información relevante de cada partidor de PCR se detallada en las **Tablas 1** (PCR convencional) y **3** (PCR en tiempo real).

| Gen | Sentido / Antisentido | GenBank (gi) | Temp. de <i>annealing</i> (°C) * | N° de ciclos óptimo | Producto PCR (pb) |
|-----------------|---|--------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------|
| MT1 | TTCCTGTGCTACGTGTTCC/ CGGCTTCAGTTTGGGTTTGC | 34878476 | 53 53 (52) | 43 | 264 |
| MT2 | CCCAATTTCTTTGTGGGGTC/ TAGGAAACTGCGCAGGTCAC | 34860505 | 50 52 (52) | 43 | 230 |
| β -actina | GCTCGTCGTCGACAACGGCTC/ CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC | 42475962 | 59 48 (60) | 24 | 352 |

Tabla 1: Resumen de los partidores de PCR convencional diseñados. Los partidores MT1 y MT2 fueron publicados por Pozo et al (1997) y los de β -actina por Torres-Farfán et al (2003). *, se indican los valores de temperatura de *annealing* del partidor sentido, antisentido y entre paréntesis la temperatura óptima (usada en las reacciones de amplificación).

| Gen | Temperaturas | Tiempo Incubación | N° de ciclos |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
| β-actina | Denaturación 94° C | 45'' | 24 |
| | Annealing 60° C | 1' | |
| | Extensión 72° C | 1' | |
| MT1 y MT2 | Denaturación 95° C | 50'' | 43 |
| | Annealing 52° C | 1' | |
| | Extensión 72° C | 1'30'' | |

Tabla 2: Programas utilizados para amplificar MT1, MT2 y β -actina mediante PCR convencional.

3.5. Extracción de RNA total con reactivo trizol

Tres ratas fueron sacrificadas por decapitación a las 1000 h, e inmediatamente se obtuvieron las adrenales, una porción de diafragma, riñón y testículo fueron disecados. El procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril, dedicado sólo a procesos de extracción de ácidos nucleicos. La disección de los tres pares de adrenales y de los demás tejidos se realizó de manera de obtener aproximadamente 100 mg de cada uno, lo cual fue corroborado pesando en una balanza analítica. Cada bloque de tejido fue sometido al proceso de extracción de RNA total usando 1 ml de solución de extracción Trizol, en un tubo de policarbonato estéril.

Las muestras se homogenizaron en Ultraturrax, alternando rotaciones de 15 s con reposo en hielo. Los homogenizados fueron dejados 5-10 min a temperatura ambiente (inactivación de las RNAsas y destrucción de las membranas celulares). Por cada ml de solución de extracción se agregaron 200 μ L de cloroformo y las muestras fueron mezcladas 15 s en vortex a potencia máxima. Luego se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min. Se traspasaron las muestras a microtubos de 1,5 ml y se microcentrifugaron a máxima potencia, 4°C, por 15 min. La fase superior que contiene el RNA se traspasó a un microtubo nuevo (máximo 600 μ l por tubo). Las fases inferiores se eliminaron (contienen las proteínas y el DNA). Se agregaron 500 μ L de alcohol isopropílico por cada 500 μ L de fase acuosa, mezclando los tubos varias veces por inversión y posteriormente se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente (precipitación del RNA). Se microcentrifugó a máxima potencia, 4°C, por 10 min; se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron los sedimentos con 500 μ L de etanol pro-análisis al 75%, seguido de agitación breve en *vortex* y microcentrifugación a máxima

potencia, 4°C, por 5 min (este proceso de lavado se realizó dos veces). Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento de RNA a 37°C por 10 min con la tapa del microtubo abierta en el *Termoblock*. Los sedimentos fueron resuspendidos cuidadosamente en H₂O libre de nucleasas (30µL-50µL-100µL, según el tamaño del sedimento), mediante pipeteo repetido. Las resuspensiones de RNA total resultantes fueron incubadas a 55°C por 5 min en *Termoblock* o baño termorregulado (esta incubación ayuda a disolver mejor el RNA). Finalmente se midió absorbancia para determinar concentración del RNA, a 260 nm (ácidos nucleicos) y 280 nm (proteínas), para obtener la razón 260/280 que teóricamente debe ser 1.8-2.0 para muestras de óptima calidad. Cada muestra se midió en dos diluciones (1:50 y 1:100). Luego se promedió y se obtuvo la concentración final.

Cálculo de la concentración:

$$\text{Abs. } 260 \text{ nm} \times 40 \text{ (constante para RNA; } 1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml)} \times \text{(Factor de dilución)} = \mu\text{g/ml RNA}$$

Se hicieron diluciones 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 % preteñido con bromuro de etidio, en corrida de electroforesis lenta (45 Volts, 25 mA). 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

(vale decir, si existe correspondencia con las concentraciones medidas espectrofotométricamente).

3.6. Extracción de RNA total con sistema Ambion

Tres ratas fueron sacrificadas por decapitación cada cuatro h a lo largo de las 24-h (0200, 0600, 1000, 1400, 1800 y 2200 h), e inmediatamente se obtuvieron las adrenales. El procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril, dedicado solo a procesos de extracción de ácidos nucleicos. La disección de los tres pares de adrenales permitió obtener aproximadamente 100 mg de tejido los cuales fueron pesados en balanza analítica. Cada bloque de tejido fue sometido a extracción de RNA total usando 0,7 ml de solución de lisis, en un microtubo de 1,5 ml.

Las muestras se homogenizaron usando jeringas de 21 G. Con el fin de eliminar restos celulares, los homogenizados fueron clarificados por centrifugación a $7,650 \times g$ por 8 min. Posteriormente se transfirió el lisado a nuevos microtubos de 1,5 ml y se agregó igual volumen de etanol 64% al lisado recuperado. Los homogenizados fueron agitados y se hicieron pasar por el filtro de fibra de vidrio provisto en el kit. Una vez que se hizo pasar el contenido, se debe hacer pasar aire a través del filtro, utilizando jeringa, repitiendo este paso hasta que no salga material espumoso. En la etapa de lavado del filtro, se emplea el mismo volumen (homogenizado + etanol 64%) de solución de lavado #1. Nuevamente se hace pasar aire hasta que no se obtenga material espumoso. Para la segunda etapa de lavado se emplea un 70% del volumen en solución de lavado #2/3. Finalmente se eluyó el RNA desde el filtro utilizando 1 ml de solución de elución, la cual fue previamente calentada a 100°C .

Se midió absorbancia para determinar concentración del RNA, a 260 nm (ácidos nucleicos) y 280 nm (proteínas), para obtener la razón 260/280 que teóricamente debe ser 1.8-2.0 para muestras de óptima calidad. Cada muestra se midió en una dilución 1:40 (25 µl RNA + 975 µl agua). Luego se promedió y se obtuvo la concentración final.

3.7. Purificación adicional de RNA total por precipitación con Cloruro de Litio (LiCl)

La precipitación con LiCl puede ser utilizada para remover carbohidratos y otras impurezas, incluso para reducir o eliminar la contaminación con DNA genómico. Para la purificación con LiCl se adicionó medio volumen de Solución de Precipitación de LiCl provista en el kit Ambion, más un volumen de la muestra de RNA. Se mezcló bien. Una vez agitado, se incubó todo a -20° C por lo menos 30 min. Finalizado este tiempo, se centrifugó la muestra a máxima potencia por 15 min. Luego se removió cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol 70% frío y se recentrifugó, descartando el sobrenadante. El sobrenadante remanente fue completamente eliminado por aspiración. El sedimento obtenido se resuspendió en solución de elución (el volumen en el cual se resuspende el sedimento, es estimado en virtud de la cantidad de éste). Para la solubilización del sedimento, se calentó la resuspensión por 10 minutos a 55° C y luego se llevó a -80° C para su preservación. Finalizado este procedimiento se recuantificó el RNA obtenido, esta vez usando diluciones de 1:50. Se hicieron diluciones para llevar el RNA a una concentración de trabajo de 1 µg/µl. El cálculo de concentración se hace de igual forma que para la extracción realizada con Trizol. Se determinó la integridad del RNA por medio de un gel de agarosa no

denaturante al 1,5 % preteñido bromuro de etidio, en corrida de electroforesis lenta (45 Volts, 25 mA).

3.8. Digestión de trazas de DNA genómico con DNasa I

Para evitar la interferencia de trazas de DNA genómico presente en las muestras de RNA total, éstas fueron tratadas con *DNase I, amplification Grade*. La reacción se llevó a cabo en tubos de 0,5 ml y en donde por cada μg de RNA se adicionó 1 μl de tampón de reacción DNasa I 10X (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2 mM MgCl_2 , 50 mM KCl), 1 μl DNasa I (0.1 U), llevándose a un volumen total de 10 μl con agua libre de nucleasas (DEPC-treated). Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se inactivó la DNasa I a través de la adición de 1 μl de EDTA 25 mM. Inmediatamente después se calentó por 10 minutos a 65°C. Después de este tratamiento, las muestras fueron congeladas a -20 °C para ser utilizadas posteriormente en RT-PCR.

3.9. Transcripción reversa (RT)

Se sintetizó primera hebra de cDNA por transcripción reversa de muestras de RNA digeridas con DNasa I, obtenidas como se indicó mas arriba (usando sistema Invitrogen).

Se usó transcriptasa reversa y reactivos para síntesis de primera hebra de cDNA comprados a Invitrogen. La transcripción reversa se realizó a partir de 2 μg de RNA (2 μl de diluciones de trabajo a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), utilizando 100 ng de partidores al azar (hexámeros; Promega Corp), tampón de síntesis de primera hebra 5X (4 μl), DDT 0,1 M (0,01 μM), deoxinucleótidos trifosfato (5 μM) y *SuperScript II RNase H* (10 U), en un volumen final

de 20 μ l. Las muestras de RNA total fueron llevadas a 10 μ l en H₂O-DEPC y denaturadas a 70°C durante 10 minutos. Enseguida la reacción de transcripción reversa fue montada en hielo e incubada en el termociclador con el siguiente programa: 25 °C durante 10 min, 42°C durante 60 min, 90°C durante 5 min y 4 °C al infinito.

3.10. Reacción de DNA polimerasa en cadena (PCR)

Las mezclas de reacción de PCR contuvieron 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada deoxy-NTP, 0.2 μ M de cada partidor de PCR, 1.25 U Taq DNA polimerasa y 2 μ l (10%) del producto de transcripción reversa en un volumen total de 25 μ l. La reacción de PCR se realizó en un termociclador *PerkinElmer GeneAmp 2400 System* y consistió de un paso de denaturación inicial a 93 °C por 3 min, seguido por 24-43 ciclos de 94 °C por 40 s, 50-60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min 20 s (dependiendo del par de partidores usado; ver Tablas 1 y 2). Al término de los ciclos de PCR, las muestras fueron sometidas a una extensión final a 72 °C por 10 min y mantención a 4 °C. Bajo estas condiciones de amplificación, en esta y otras Tesis del grupo de investigación, se determinó el número óptimo de ciclos para cada uno de los cDNAs de interés (ver Tabla 2). Alícuotas de 10 μ l de los productos de PCR fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% preteñidos con bromuro de etidio. La imagen de cada gel fue capturada usando el software Doct (UVP, Inc. Upland, CA) conectado a una cámara digital (Olympus Camedia Master 4.1); y la densidad de la banda fue analizada con el software Scion Image (Scion Corporation; www.scioncorp.com). Cada muestra fue amplificada en 3 ensayos separados para cada gen de interés.

3.11. Clonamiento

Se intentó sin éxito la secuenciación directa de productos de PCR obtenidos para MT1 y MT2, por lo cual se recurrió al clonamiento como estrategia de secuenciación. Previo al paso de clonamiento, se realizó un mini-mapa de restricción de los dos fragmentos de PCR (MT1 y MT2) con algunas enzimas de restricción disponibles en el laboratorio. Los productos de digestión fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con tinción de bromuro de etidio, para poder determinar cuál enzima no corta los fragmentos de interés. De esta forma, se determinó que ninguno de los fragmentos posee el sitio de corte para la enzima de restricción *EcoRI* (datos no mostrados). Este criterio permitió seleccionar un vector apropiado, con secuencia de reconocimiento para *EcoRI* en su sitio de policlonamiento.

Se utilizó el sistema de clonamiento *pGEM-T Easy Vector System* (Promega, Corp). Para realizar el clonamiento, se siguieron las instrucciones del proveedor. Brevemente: utilizando tubos que poseen paredes con baja capacidad de unión de DNA, se realizó la reacción de ligación del inserto (9 reacciones en total), agregando los siguientes componentes a dicho tubo: 5 μ l de tampón de ligación (*2X rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase*), 50 ng del vector *pGEM-T easy*, una cantidad molar del fragmento (ajustada en cada caso para obtener la mejor eficiencia de ligación posible), 1 μ l de T4 ligasa (3 unidades Weiss/ μ l), y H₂O desionizada estéril hasta completar un volumen final de 10 μ l. Se mezcló bien mediante pipeteo y se dejó incubando la reacción por una hora a temperatura ambiente.

Luego se descongelaron cuidadosamente las células competentes de alta eficiencia JM109 (Invitrogen Corp), depositándolas sobre un baño de hielo. Se

agregaron 2 µl de la reacción de ligación previamente realizada (ver mas arriba), en un tubo de 1.5 ml, se le adicionó 50 µl del *stock* de células JM109 y se mezclaron mediante agitación extremadamente gentil, seguido por incubación por 20 minutos en hielo. Luego se aplicó un golpe de calor a la solución con las células, por 45-50 segundos a 42 °C e inmediatamente se dejaron los tubos en hielo por 2 minutos. Se agregaron 950 µl de medio de cultivo SOC (Sambrook et al, 1989) a la reacción de transformantes, incubándolas por un período de 1.5 h a 37 °C con agitación energética (150 rpm) en un agitador (*Shake 'N' Bake*; horno de hibridación Boekel). A continuación, 100 µl de cada uno de estos cultivos fueron sembrados por duplicado en placas preparadas con LB/ampicilina (Sambrook et al, 1989). Se incubaron las placas durante la noche a 37 °C. Los clones positivos dando cuenta de una correcta ligación (o transformantes), serían las correspondientes a colonias de color blanco.

Se tomaron los clones positivos y se inocularon nuevos cultivos en medio SOC para juntar una cantidad apropiada de transformantes y se purificaron los plasmidios de interés. Para llevar a cabo la extracción y purificación del vector, se utilizó el sistema comercial de *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega Corp).

Los cultivos de los clones positivos se centrifugaron a 10.000 g por 10 min, a 4 °C, descartando el sobrenadante. El sedimento de células transformadas, se resuspendió en 3 ml de *Resuspension solution*, y se agregaron 3 ml de un tampón de lisis celular, invirtiendo el tubo repetidamente hasta mezclar bien. Se adicionó 3 ml de solución neutralizante y se mezcló por inversión. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 14.000 g durante 15 min, a 4 °C, transfiriendo el sobrenadante a un tubo de ensayo y se le adicionó 10 ml de resina (que debe ser resuspendida en el

momento de su utilización), agitando vigorosamente hasta homogenizar. Se unió la columna de elución *Midipreps* al colector de vacío y se transfirió la resina mezclada con el DNA a la columna de elución. Se aplicó vacío hasta que toda la solución pasara por la columna.

Se lavó la columna con 15 ml de *Wash Solution* que contiene etanol, aplicando vacío hasta extraer toda la solución de la mini-columna, repitiendo este proceso por segunda vez, con la única diferencia que una vez vaciada la mini-columna, se siguió aplicando vacío por 30 segundos adicionales. Luego se conectó la columna *Midipreps* a un tubo de 1,5 ml para centrifuga, centrifugando por 2 min a 10.000 g (para eliminar solución de lavado remanente). La columna fue conectada a un nuevo tubo de centrifuga de 1,5 ml y a la columna con la resina/DNA se le agregó 300 μ l de H₂O-DEPC pre-calentada a 70 °C (recomendado para plasmidios menores a 10.000 pb), dejándola reposar por 1 minuto y luego se centrifugó la columna por 20 s a 10.000 g. La solución eluida de DNA se volvió a centrifugar por 5 min a 10.000 g, para decantar posibles residuos de resina y el sobrenadante fue traspasado a un nuevo tubo de centrifuga de 1,5 ml. Cada una de las muestras recolectadas de esta manera fue almacenada a -20 °C hasta su posterior utilización (secuenciación).

Se comprobó la recuperación e integridad del inserto en los vectores de clonamiento mediante la digestión de una alícuota de las muestras purificadas, usando la enzima de restricción *EcoRI*.

Luego se procedió según el protocolo de análisis requerido por el servicio externo de secuenciación de DNA (Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile); tomando alícuotas de las

muestras y especificando los partidores a utilizar para cada una de ellas (en todos los casos, partidores complementarios a los sitios SP6 y T7 del vector), enviándolos a dicha institución para que realizara la correspondiente secuenciación de los 2 insertos de interés, además de 7 insertos que sirvieron como control de clonamiento (resultados presentados en tesis paralela; Mauro Alvarez Felmer), en un secuenciador automático *Perkin Elmer ABI 7000*.

3.12. PCR en tiempo real (qPCR)

El cDNA fue amplificado utilizando un sistema *LightCycler 1.5*, junto al kit *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 10 μ l en presencia de 0.3 μ M final de partidores sentido y antisentido para los genes de receptor de melatonina (MT1/MT2) en estudio, 5.2 μ l de H₂O PCR-grade, 1.2 μ l de Solución de MgCl₂ 25 mM, 1 μ l *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* y 2 μ l de cDNA (1 μ g). Los partidores utilizados se detallan en la Tabla 3.

Como en toda reacción de PCR, fue necesario estandarizar la temperatura y tiempo de *annealing* y extensión, como también el número de ciclos adecuado (Tabla 3). Por cada par de partidores fue necesario realizar una curva de eficiencia de reacción de PCR, la cual permitió determinar la pendiente con la cual se realizaron los cálculos respectivos. Para ello se hicieron diluciones seriadas del cDNA de alguno de los puntos horarios en estudio. Esta dilución se incorporó en las reacciones para cada gen de interés, además de la dilución correspondiente al gen “*housekeeping*” (β -actina).

El análisis de datos y seguimiento de los resultados para cada uno de los genes, se facilitó por el empleo del software *LightCycler3 Front Screen* (Roche Diagnostics).

La disección de las adrenales y el procedimiento de extracción de RNA total fue realizada en conjunto por los tesisistas de Bioquímica Lorena Abarzúa y Fernando Gaete, para el estudio de expresión de genes reloj *in vivo*. Estas muestras validadas fueron usadas en la presente Tesis para los experimentos de qPCR de MT1.

| Gen | Sentido / antisentido | GenBank (gi) | Temp. de <i>annealing</i> °C (óptima)* | Nº de ciclos óptimo | Producto de PCR |
|-----------------|--|--|--|---------------------|-----------------|
| β -actina | GCTCGTCGTCGACAACGGCTC/ CAAACATGATCTGGGTCATCTT | 42475962 Torres-Farfan et al (2003) | 59 48 (60) | 40 | 352 |
| MT1 | CAACCTGCAAACCGGAACTC/ GGAAAACCACCAGGGCAAT | 10567523 Peschke et al (2006) | 52 51 (60) | > 40 | 101 |
| MT1 | TTTACTATCGTGGTGGACATCC/ GCACTAACTTGACAATGCAGATATC | 10567523 Kobayashi et al (2005) | 50 49 (57) | > 40 | 206 |
| MT2 | CTCACTCTGGTGGCCTTGGT/ AACTGCGCAGGTCAGTGGGTC | 7672690 Kobayashi et al (2005) | 57 58 (60) | > 40 | 250 |
| ROR α | AGAACAACACCGTGTACTTT/ CTTCTGAAGGACATGTTGAAG | 109483592 Kobayashi et al (2005) | 48 46 (60) | > 40 | 254 |

Tabla 3: Partidores y programas utilizados para qPCR. *, se indican los valores de temperatura de *annealing* del partidor sentido, antisentido y entre paréntesis la temperatura óptima (usada en las reacciones de amplificación).

Programa único de amplificación:

Pre-incubación 10 min a 94° C

Amplificación:

denaturación 8 seg a 94° C
annealing 6 seg a 60° C
 extensión 11 seg a 72° C

Curva de *melting*

94° C por 5 seg
 55° C por 20 seg (inferior al *annealing*)
 98° C por 1 seg (pero con °T *transition rate* de 0,1 °C/seg)

Enfriamiento a 40° C por 15 seg

3.13. Extracción de proteínas de membrana

Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se obtuvieron las glándulas adrenales, las cuales fueron desgrasadas (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 (< 0.2 lux).

A continuación los bloques de tejido se traspasaron a tubos de policarbonato, se agregó 3ml de tampón de lisis y se homogenizó en Ultraturrax, 3 veces por 15 s con reposo en hielo entre las rotaciones. Luego se sonicó 3 veces por 15 s con descanso en hielo entre rondas. Se incubó por 10 min a 4°C , agitando en votex 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 TI) por 45 min a 4°C y luego el sedimento fue resuspendido en 500 μl 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 μg BSA/ μl y se dispuso de 6 microtubos de 1,5 ml con 500 μl de agua destilada cada uno. Se agregó sobre el primer tubo 500 μl de la solución 4 μg BSA/ μl , se homogenizó por pipeteo obteniéndose una solución 2 μg BSA/ μl , se traspasó 500 μl de esta solución al segundo tubo y se continuó 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 μg BSA/ μl ; como blanco se utilizó agua destilada. La medición de concentración proteica se realizó en duplicado tanto para las muestras como para los puntos de la curva, para ello se agregó 1 ml de

reactivo de Bradford a microtubos de 1,5 ml y 5 μ l de la muestra previamente diluída 10 veces en agua destilada, se agitó en vortex, se incubó por 15 min a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 595 nm. 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.

3.14. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

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.

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) utilizando 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 μ l correspondiente a 200 μ g de proteínas de membrana, para ello el volumen correspondiente a 200 μ g se microcentrifugó a máxima potencia por 45 min, a 4°C; el sobrenadante fue eliminado y el sedimento se resuspendió en 30 μ l de tampón de muestra. Las muestras se calentaron en estufa a 37 °C durante 1 h y posteriormente se sembraron sobre el gel espaciador, en uno de los surcos se sembraron 10 μ l del marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó a 160 V durante 1 h. Concluída la electroforesis el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 0,1 % (P/V; Merck), metanol 50 % (V/V) y ácido acético 7,5 % (V/V) durante 30 min y luego se lavaron en una solución de metanol 30 % (V/V) y ácido acético 10 % (V/V), para eliminar el exceso de colorante.

Con excepción de *Coomasie* R-250, los reactivos usados para esta tinción fueron obtenidos de Winkler Ltda. Este experimento también está incluido en una Tesis paralela de nuestro grupo de investigación (estudiante de Bioquímica Jocelyn García).

3.15. Ensayos de unión específica de 2-[¹²⁵I] iodomelatonina en preparaciones de membrana

Ratas adultas fueron decapitadas y rápidamente se disecaron las glándulas adrenales y el hipotálamo para realizar preparaciones de membrana (n=15 ratas a las 0800 h y n=15 a las 2200 h). Las fracciones de membrana fueron preparadas como se describió previamente (Torres-Farfan et al, 2003). Brevemente, los tejidos fueron homogenizados en tampón Tris (25 mM Tris-HCl; 25 mM CaCl₂; y 0.2% BSA, pH 7.5), conteniendo inhibidores de proteasas. Las preparaciones de membrana fueron agrupadas (cada preparación contenía el hipotálamo o las adrenales de 3 animales por punto horario).

Los ensayos de unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina fueron realizados como se describió previamente (Torres-Farfan et al, 2003), con modificaciones mínimas. Triplicados de preparaciones de membrana (500 µg de proteína) fueron incubados a 37° C por 2 h con 5-300 pM 2-[¹²⁵I]iodomelatonina (NEN Life Science Products, Boston, MA; actividad específica 2200 Ci/mmol), en presencia o ausencia de 1 µM melatonina (Sigma-Aldrich), en un volumen final de 200 µl. La reacción fue detenida agregando 2 ml de tampón Tris-Ca enfriado en hielo y las membranas fueron separadas mediante filtración inmediata a través de filtros de membrana de microfibras de borosilicato (tamaño de poro: 1 µm, GC50; Advantec MFS Inc., Pleasanton, CA). La cantidad de 2-

[¹²⁵I]iodomelatonina retenida en el filtro fue medida en un contador gamma. La unión específica fue calculada sustrayendo la unión no-específica de la unión total. Además probamos el efecto de luzindol (antagonista de los receptores MT1 and MT2) y de guanosina 5'-trifosfato (GTP) γ -S (análogo no hidrolizable de GTP) sobre la unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina. Todos los compuestos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El ensayo de unión fue realizado usando 3 grupos diferentes de adrenal por cada hora del día ensayada (0800 y 2200 h); mientras que el efecto de GTP γ -S y luzindol fue ensayado un grupo por cada punto horario. El número máximo de sitios de unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonin (Bmax) y la constante de disociación (Kd) fueron determinados por análisis de Scatchard usando el programa Prism, version 3.02 (GraphPad Software, Inc; San Diego, CA, USA).

3.16. Ensayos de unión específica de 2-[¹²⁵I] iodomelatonina en cortes congelados

Ratas macho adultas (n=3), mantenidas en L:O 14:10, fueron decapitadas a las 2200 h. Inmediatamente después de la disección, las adrenales fueron fijadas por inmersión en solución de paraformaldehído al 4% por 1 h, criopreservadas en gradiente de sucrosa y almacenadas a -80 °C. Posteriormente, secciones de crióstato de 20 μ m fueron obtenidas y montadas por descongelamiento en portaonjetos *Superfrost* (Thomas, Swedesboro, NJ). Cortes congelados de adrenal fueron preincubados con tampón Tris-Ca por 15 min at 37 °C y luego incubados con 100 μ l de 25 pM 2-[¹²⁵I]iodomelatonina por 2 h at 37 °C. La unión no-específica fue determinada en cortes adyacentes incubados en presencia de 1 μ M melatonina. Para investigar si los sitios de

unión estaban acoplados a proteína G, incubamos simultáneamente con 25 pM 2-[¹²⁵I]iodomelatonina y 1 μM GTPγ-S. También probamos el efecto de 1 μM luzindol sobre la unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina. Después de las incubaciones, los cortes fueron lavados 5 veces con tampón Tris-Ca y secados a temperatura ambiente. Los cortes fueron puestos en contacto con película ¹²⁵I-Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) en un cassette de exposición de rayos X por 1 d, a -70 °C. Después de la exposición, las películas fueron desarrolladas usando un sistema KODAK Image Station XP-100.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención y evaluación de muestras de RNA total para RT-PCR convencional

Se obtuvieron y validaron muestras de RNA total de varios tejidos de rata, sacrificadas a las 1000 h, incluyendo glándula adrenal, diafragma, riñón y testículo. Tanto los rangos de pureza, como de concentración de RNA total y rendimiento por cada 100 mg de tejido, fueron apropiados para su análisis mediante PCR convencional (A260/280: 1.50-2.98; concentración: 0.50-5.90 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; rendimiento: 25-295 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$); ver **Tabla 4**. En la **Figura 2** se muestra un gel no denaturante de RNA, donde se aprecia que la cantidad relativa concuerda con los datos de espectrofotometría a 260 nm; además de indicar una contaminación por DNA genómico reducida (posteriormente controlada por digestión con DNasa I) y la ausencia de degradación de las muestras de RNA total (la banda del rRNA 28S presentó una densidad aparente aproximadamente igual al rRNA 18S); ver **Figura 2**.

Finalmente, se evaluó la calidad de estas muestras de RNA total mediante la amplificación del gen constitutivo β -actina por transcripción reversa y PCR convencional. Como se aprecia en la **Figura 3**, se amplificó eficientemente una banda única de 352 pb, correspondiente al tamaño esperado para este producto de PCR.

| Tejido (1000 h) | Razón Abs 260/280 nm | Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | Rendimiento ($\mu\text{g RNA}/100 \text{ mg de tejido}$) |
|----------------------------|---------------------------------|---|--|
| Adrenal | 2.3 | 2.76 | 92 |
| Diafragma | 2.98 | 0.5 | 25 |
| Riñón | 1.8 | 2.8 | 140 |
| Testículo | 1.5 | 5.9 | 295 |

Tabla 4: Pureza, concentración y rendimiento de las muestras de RNA total obtenidas de glándula adrenal, diafragma, riñón y testículo de rata adulta *ex vivo* a las 1000 h. Cada muestra corresponde al RNA total de un *pool* de aproximadamente 100 mg de tejido (n = 3 ratas).

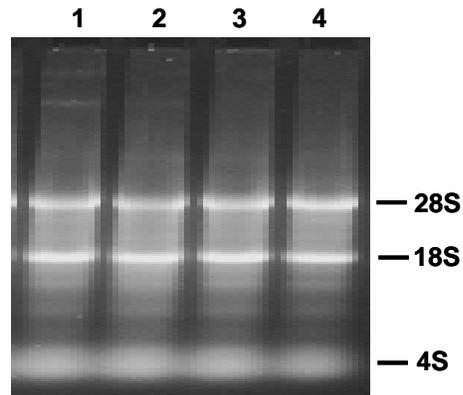


Figura 2: Análisis de cantidad relativa, posible degradación y contaminación por DNA genómico de las muestras de tejidos de rata (1000 h). Imagen digital monocromática de gel de agarosa al 1.5 % preteñido con bromuro de etidio. Surco 1: adrenal; 2: diafragma; 3: riñón; 4: Testículo. Además se indican los RNAs ribosomales mayor (28S) y menor (18S), así como el tRNA (4S). Se cargaron 3 µg de cada muestra.

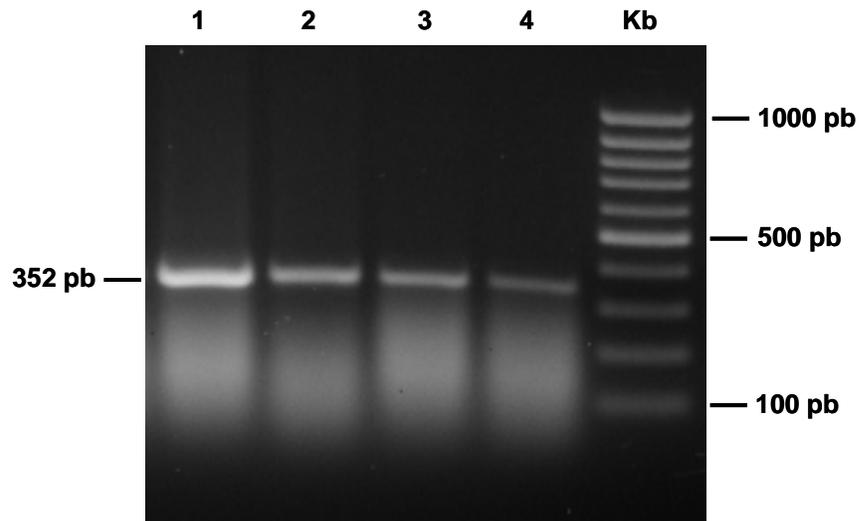


Figura 3: cDNAs parciales de β -actina amplificados por RT-PCR convencional a partir de RNA total de diversos tejidos. Imagen digital monocromática del gel de agarosa al 1.5 % preteñido con bromuro de etidio. Surco 1: adrenal; 2: diafragma; 3: riñón; 4: testículo. Kb indica marcador de tamaño de DNA (escala 100 pb). La banda que se observa en los surcos 1-4 corresponde al fragmento de 352 pb esperado para β -actina. Las muestras provienen de ratas sacrificadas a las 1000 h.

4.2. RT-PCR convencional de MT1/MT2 y purificación de fragmentos de PCR

β -actina (352 pb) fue amplificada usando los partidores de PCR publicados en Torres-Farfan et al (2003), mientras que los fragmentos de MT1 (264 pb) y MT2 (230 pb) fueron amplificados con los partidores descritos por Pozo et al (1997). Los productos de PCR esperados de β -actina, MT1 y MT2 fueron amplificados eficientemente a partir de muestras de cDNA de glándula adrenal de rata. Estos fragmentos de PCR fueron posteriormente purificados usando el sistema *PureLink PCR Purification Kit* de Invitrogen Corp, y analizados en un gel de agarosa al 1.5 % preteñido con bromuro de etidio (**Figura 4**). La amplificación de trazas de DNA genómico fue obviada mediante digestión con DNasa I así como también omitiendo el paso de transcripción reversa o el templado de RNA total (resultados no mostrados).

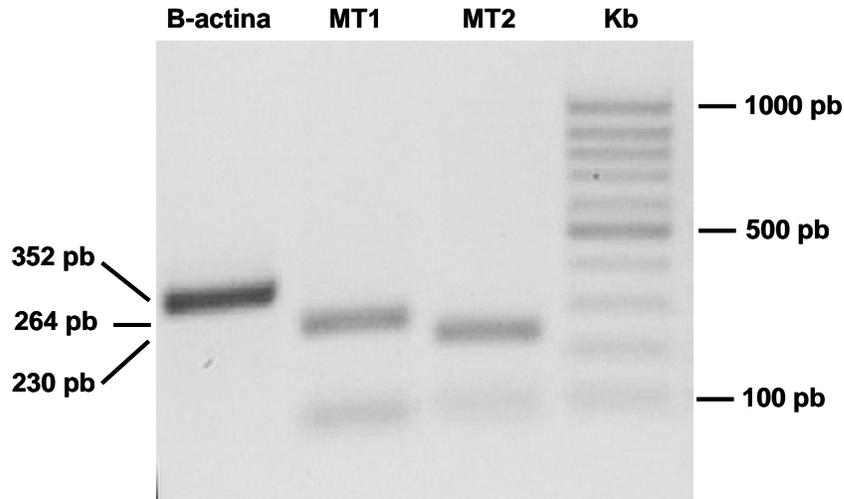


Figura 4: Electroforesis de productos purificados de PCR convencional de MT1 y MT2. β -actina fue amplificada usando los partidores de PCR publicados en Torres-Farfan et al (2003), mientras que los fragmentos de MT1 y MT2 fueron amplificados con los partidores descritos por Pozo et al (1997). Imagen digital monocromática invertida o negativa de gel de agarosa al 1.5 % preteñido con bromuro de etidio. Tamaño de los cDNA parciales: β -actina, 352 pb; MT1, 264 pb; MT2 230 pb. Kb indica marcador de tamaño de DNA (escala 100 pb). Los productos de PCR de MT1 y MT2 fueron purificados usando el sistema *PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen K3100-01*.

4.3. Clonamiento y secuenciación de cDNAs parciales de MT1 y MT2

Probablemente debido al tamaño relativamente reducido de los productos de PCR de MT1 y MT2, en el presente trabajo no fue posible secuenciarlos directamente después de su purificación por cromatografía (mostrados en la Figura 4). En consecuencia, se recurrió al clonamiento para poder secuenciar desde los brazos del vector, usando los sitios SP6 y T7. De acuerdo a la estrategia de clonamiento y rastreo elegida (ver detalles en Material y Métodos), para liberar los insertos MT1 y MT2 clonados en el vector *pGEM-T Easy*, se utilizó la enzima de restricción *EcoRI*. Este tratamiento efectivamente permitió recuperar los insertos puros de tamaño esperado (MT1 = 264 pb y MT2 = 230 pb), junto con el vector linealizado (3 Kb), como se muestra en la **Figura 5**.

La secuencia *forward* o sentido (bases 37-241) del producto de PCR de MT1 que se obtuvo a partir de glándula adrenal fue idéntica a la región correspondiente del cDNA publicado para el receptor de melatonina MT1 de rata (secuencia *forward* o sentido, bases 470-673; número de acceso *GenBank* AF130341.1); **Figura 6** (panel superior). La secuencia *forward* o sentido (bases 82-218) del producto de PCR de MT2 clonado que se obtuvo a partir de glándula adrenal fue idéntica a la región correspondiente del cDNA publicado para el receptor de melatonina MT2 de rata (secuencia *forward* o sentido, bases 201-337; número de acceso *GenBank* AF141863.1); **Figura 6** (panel inferior).

Insertos de MT1r (264 pb) y MT2r (230 pb) clonados en PGEM-T Easy para secuenciar con partidores SP6 / T7:

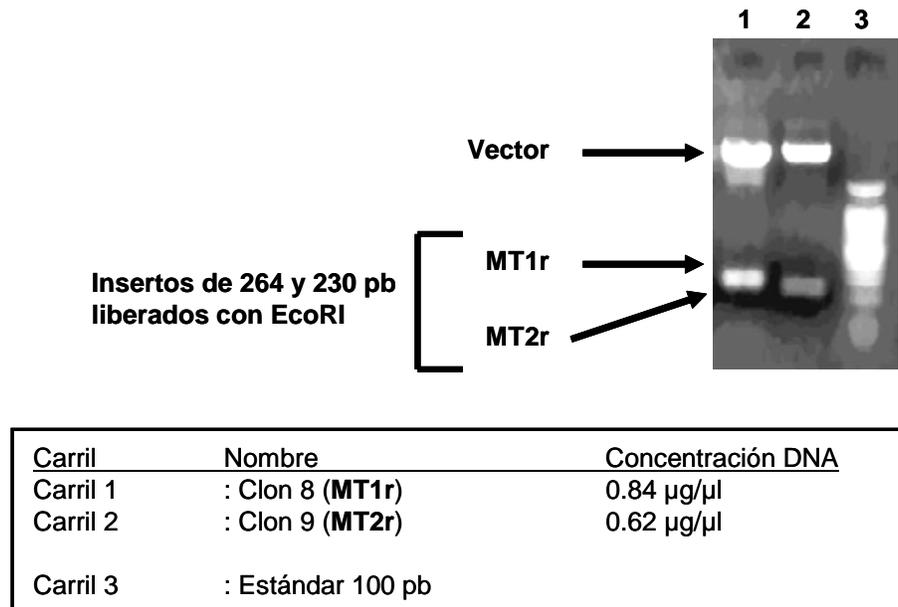


Figura 5: Liberación de insertos MT1 y MT2 clonados en el vector *pGEM-T Easy* usando la enzima de restricción *EcoRI*. Este procedimiento permitió recuperar los insertos puros de tamaño esperado (MT1 = 264 pb y MT2 = 230 pb), surcos 1 y 2; respectivamente. En ambos surcos, se aprecia el vector linealizado (en la base 60) a 3 Kb de tamaño. Surco 3, indicador de tamaño de DNA. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % preteñido con bromuro de etidio.

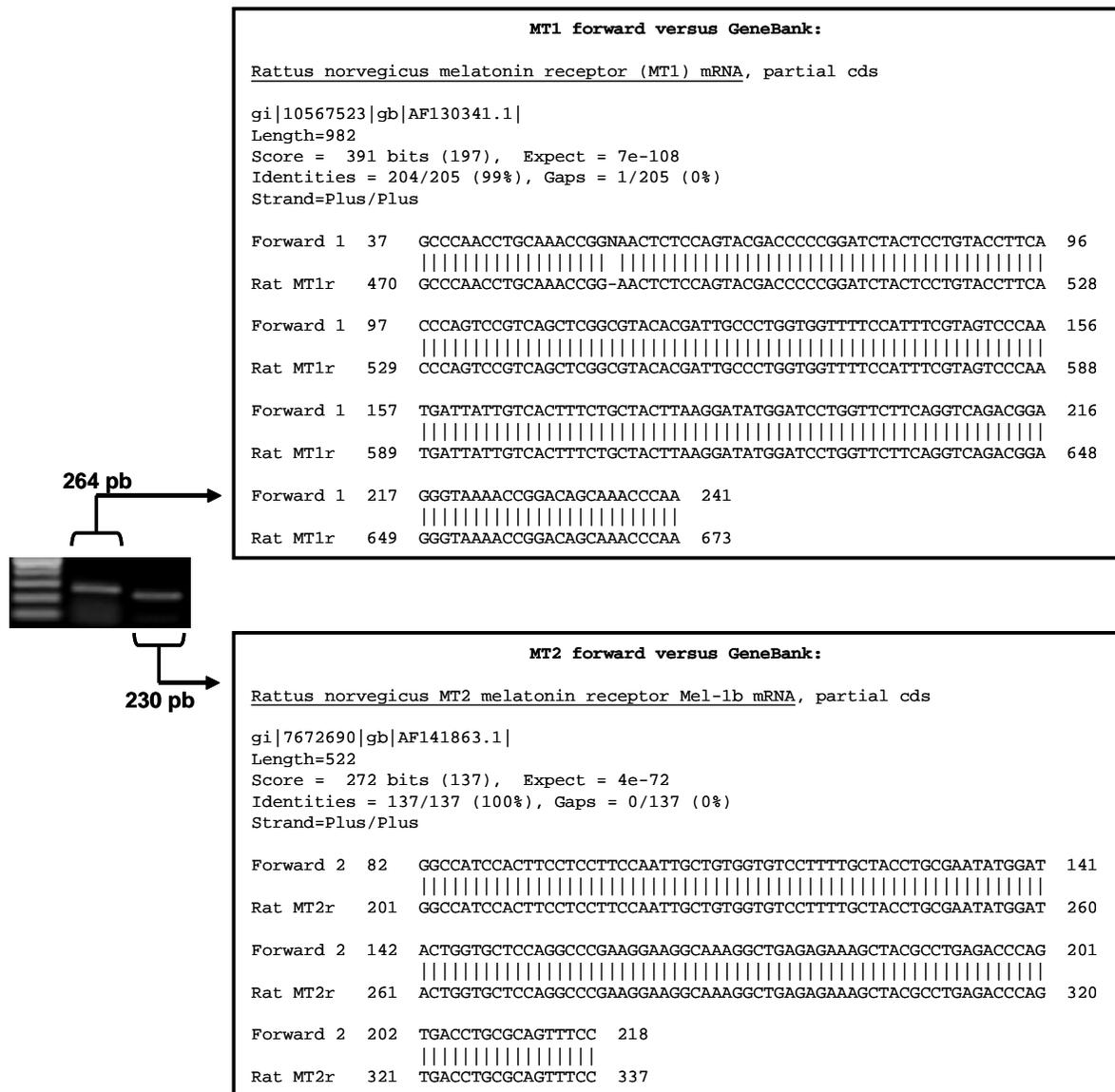


Figura 6: Secuenciación de insertos de MT1 y MT2. Para obtener ambas secuencias, se usaron partidores complementarios a los sitios SP6 y T7 del vector y un secuenciador automático *Perkin Elmer ABI 7000*.

4.4. Obtención y evaluación de muestras de RNA total para RT-PCR en tiempo real (qPCR)

Para demostrar que los productos de PCR de MT1 y MT2 purificados, clonados y secuenciados no derivan de trazas de DNA genómico que pudieran haber escapado de la digestión con DNasa I, realizamos amplificación de MT1 y MT2 por qPCR con partidores publicados por Kobayashi et al (2005), los cuales flanquean el intrón único de MT1 (> 13 Kb). Estos resultados se muestran mas adelante, en las **Figuras 8-11**.

Para este fin, se obtuvieron y validaron muestras de RNA total de adrenal de rata, cada 4-h a lo largo de las 24-h. Tanto los rangos de pureza como de concentración de RNA total obtenidos fueron apropiados para su análisis mediante qPCR (A260/280: rango 1.94-2.30; concentración final: 2.12-2.76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); **Tabla 5**. En la **Figura 7** se muestra un gel no denaturante de RNA, donde se aprecia que la cantidad relativa concuerda con los datos de espectrofotometría a 260 nm; además de indicar una contaminación por DNA genómico muy reducida (posteriormente controlada por digestión con DNasa I) y la ausencia de degradación de las muestras de RNA total (banda del rRNA 28S tiene una densidad aparente aproximadamente igual a la del rRNA 18S); **Figura 7**.

| Tejido | Hora del día | Razón $A_{260/280}$ nm | Concentración ($\mu\text{g RNA } / \mu\text{l}$) |
|-----------------------------|---------------------|--|--|
| Glándula adrenal | 0200 | 1.94 | 2.74 |
| | 0600 | 2.0 | 2.34 |
| | 1000 | 2.3 | 2.76 |
| | 1400 | 2.2 | 2.12 |
| | 1800 | 2.0 | 2.40 |
| | 2200 | 2.0 | 2.63 |

Tabla 5: Hora del día, Razones $A_{260/280}$ nm y concentración de las muestras de RNA total de adrenal de rata (extraído con reactivo Trizol). El rango óptimo de la razón de Absorbancia 260/280 nm es 1,8-2,0.

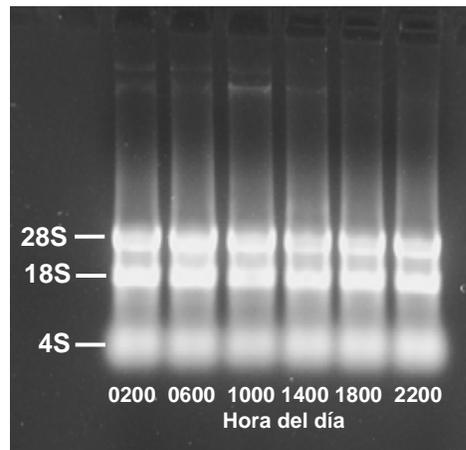


Figura 7: Electroforesis de RNA total obtenido de glándula adrenal de rata a diferentes horas. Gel de agarosa al 1,5% en condición no denaturante, preteñido con bromuro de etidio. Imagen digital monocromática de las muestras de RNA total obtenidas cada cuatro horas, durante un período de 24 h (0200, 0600, 1000, 1400, 1800 y 2200). Análisis de la cantidad relativa, contaminación por DNA genómico y posible degradación de las muestras de adrenal rata. Los RNAs ribosomales mayor (28S) y menor (18S), así como el tRNA (4S) están indicados en el gel. La hora del día se indica bajo cada surco. Se cargaron 3 μg de todas muestras.

4.5. qPCR de MT1

En nuestro laboratorio, se está estudiando la expresión de los mRNAs de las dos isoformas de receptor de membrana de melatonina (MT1 y MT2) y del putativo receptor nuclear de melatonina, la isoforma alfa del receptor huérfano de ácido retinoico ROR α . Como gen constitutivo se está usando un amplicón pequeño (75 pb) de β -actin. Estos experimentos se están realizando mediante RT/qPCR (sistema LightCycler 1.5, Roche). Se sintetizaron partidores de qPCR en base a las siguientes publicaciones: MT1, Peschke et al (2006) y Kobayashi et al (2005); MT2 y ROR α , Kobayashi et al (2005). Usando estos partidores de qPCR, en primer término se estandarizaron las condiciones de transcripción reversa y amplificación por PCR convencional de cada gen de interés, hasta obtener una banda única del tamaño esperado en cada caso (**Figura 8**).

La amplificación del gen MT1 usando el sistema qPCR SYBR Green I/LightCycler 1.5 (Roche) presentó una alta eficiencia -101%-, con un C_P de 35 ciclos (**Figura 9**). La reacción de PCR en tiempo real no presentó formación importante de dímeros; mientras que el melting point del amplímero de MT1 fue de ~ 85-86 °C (**Figura 10**). Los productos finales de amplificación en tiempo real fueron analizados en un gel de agarosa al 2 % preteñido con bromuro de etidio, donde se detectó una banda única del tamaño esperado para MT1 (206 pb). Ver **Figura 11**. Estos resultados preliminares de la presente Tesis permitieron la posterior estandarización de las condiciones de qPCR para la demostración de cambios significativos de los niveles de mRNA de MT1 en la glándula adrenal de rata en las 24 h (Richter et al, enviado a *Journal of Pineal Research*). Lo mismo es válido para la expresión del transcrito de MT2 en este tejido.

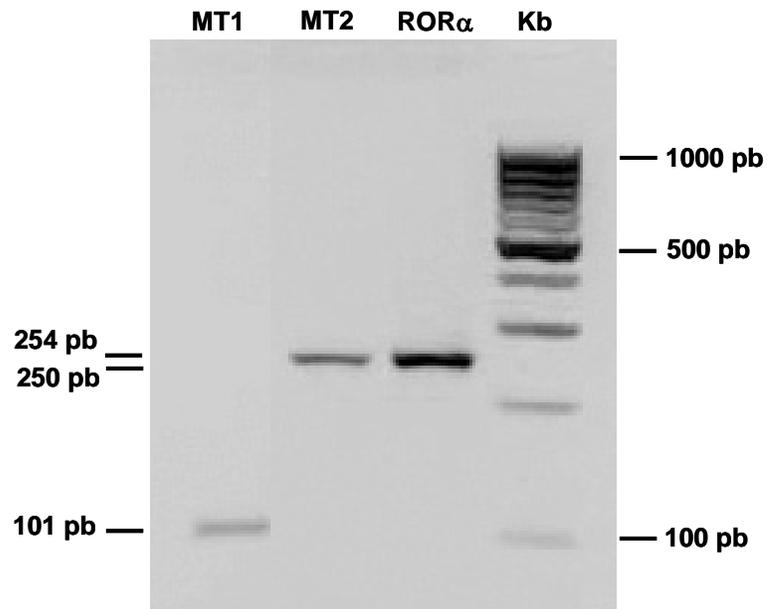


Figura 8: PCR convencional de MT1 (partidores de Peschke et al, 2006), MT2 y ROR α (partidores de Kobayashi et al, 2005) en muestras de adrenal *ex vivo*. Los partidores de Kobayashi et al (2005) flanquean el intrón único de MT2 (> 13 Kb). Imagen digital monocromática invertida o negativa del gel de agarosa al 2.0 % preteñido con bromuro de etidio. MT1, 101 pb; MT2, 250 pb; ROR α , 254 pb; Kb, indicador de tamaño de DNA (escala de 100 pb).

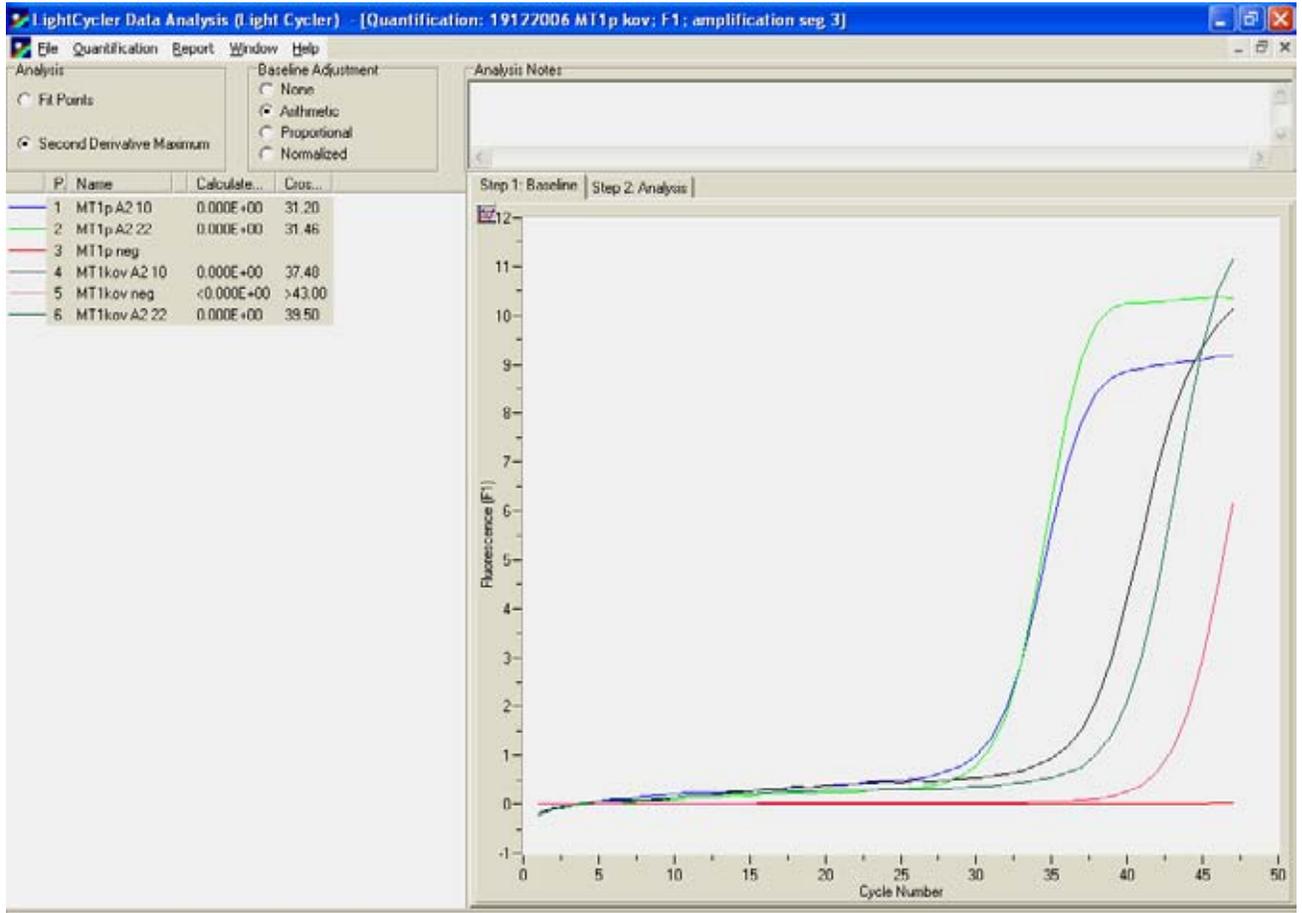


Figura 9. Amplificación del gen MT1 usando el sistema de qPCR SYBR Green I / LightCycler 1.5 (Roche). Se usaron tanto los partidores de Peschke et al (2006) que no flanquean intrón, como los de Kobayashi et al (2005) que flanquean el intrón único de MT1 (> 13 Kb). Estos resultados indican que la reacción de amplificación presenta una alta eficiencia (101%) con un C_P de 35 ciclos.

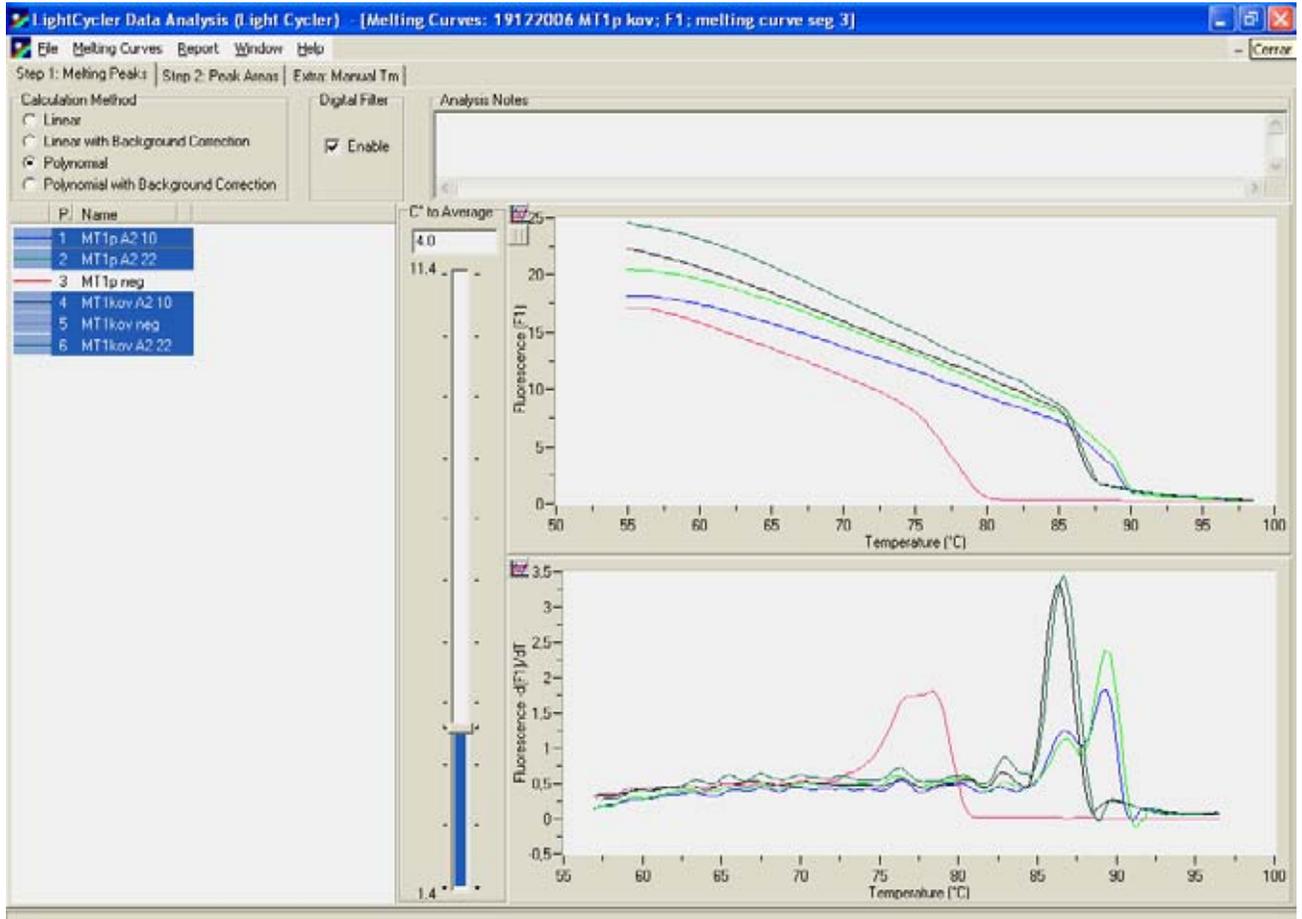


Figura 10. Determinación del *melting point* del amplímero de MT1 ($T_m = 85-86\text{ }^\circ\text{C}$). Estos resultados indican que la reacción de amplificación en tiempo real no presenta formación importante de dímeros y que además rinde un producto de PCR único (consistente con resultados obtenidos por Lorena Abarzúa en Tesis paralela y con la banda única mostrada a continuación en el surco 4 de la Figura 11).

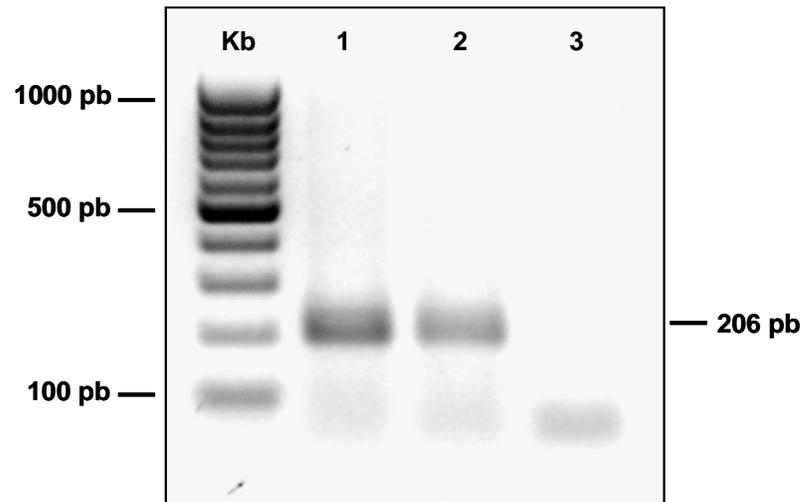


Figura 11: Electroforesis del producto de PCR en tiempo real de MT1 (206 pb) amplificado en muestras obtenidas de adrenal *ex vivo* a dos horas del día. Los partidores de PCR usados (Kobayashi et al, 2005), flanquean el intrón único de MT1 (> 13 Kb). Imagen digital monocromática invertida o negativa del gel de agarosa al 2 % preteñido con bromuro de etidio. Surco Kb: indicador de tamaño de DNA (escala de 100 pb); surco 1, MT1 a las 1000 h; surco 2, MT1 a las 2200 h; surco 3, control negativo de amplificación.

4.6. Evaluación electroforética de extractos de proteínas de membrana

La estandarización de la extracción de la fracción de proteínas de membrana a ser utilizada posteriormente en ensayos de unión específica de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina, se realizó verificando la calidad de extractos proteicos mediante tinción de geles con azul de Coomassie. Los extractos proteicos de adrenal de rata (**Figura 12**) y tejidos control (datos no mostrados), presentaron un patrón de bandas continuo y característico, 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 12**).

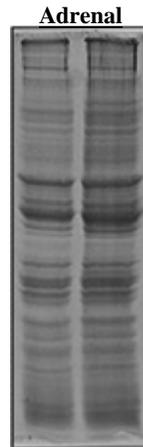


Figura 12: Evaluación de dos extractos de proteína de membrana de adrenal de rata por PAGE-SDS al 10%/azul de Coomassie. Se observa un patrón de bandas bien definido a lo largo de todo el gel, en los extractos de proteínas de membrana de adrenal de rata, lo que indica ausencia de degradación.

4.7. Unión específica de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en adrenal de rata

Detectamos unión específica de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en preparaciones de membrana de glándula adrenal de rata (**Figura 13**, panel izquierdo y **Tabla 6**) e hipotálamo (resultados no mostrados, debido a que se trata de observaciones extensamente publicadas). La unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en adrenal exhibió una K_d (constante de disociación) de 14.22 ± 1.23 pM, dentro del rango descrito por otros autores (para mas detalles ver discusión). Esta unión fue desplazada por luzindol (antagonista de receptores de melatonina) y también por GTP γ -S –análogo no hidrolizable de GTP- (**Figura 13**, panel derecho). Estos resultados indican que la adrenal de rata y, como se esperaba, el hipotálamo, presentan sitios de unión específicos y de alta afinidad para 2-[¹²⁵I]iodomelatonina; los cuales con toda probabilidad son receptores de membrana acoplados a proteína G. Una observación relevante fue que detectamos unión específica de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina a las 2200 h, pero no a las 0800 h (**Tabla 6**). Estos resultados, junto con los obtenidos en Tesis paralelas de nuestro laboratorio por *Western blot* (Jocelyn García) y qPCR de MT1 (Lorena Abarzúa), sugieren que los receptores de melatonina cambian durante el día.

Por otra parte, los presentes resultados obtenidos usando autorradiografía de contacto en cortes congelados de adrenal de rata incubados con 25 pM 2-[¹²⁵I]iodomelatonina, mostraron marca distribuída en la totalidad de la glándula adrenal (**Figura 14**). La unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en los cortes de adrenal fue desplazada por 1 μ M melatonina fría, 1 μ M luzindol y 1 μ M GTP γ -S (**Figura 14**). Estos resultados confirman aquellos obtenidos usando preparaciones de membrana.

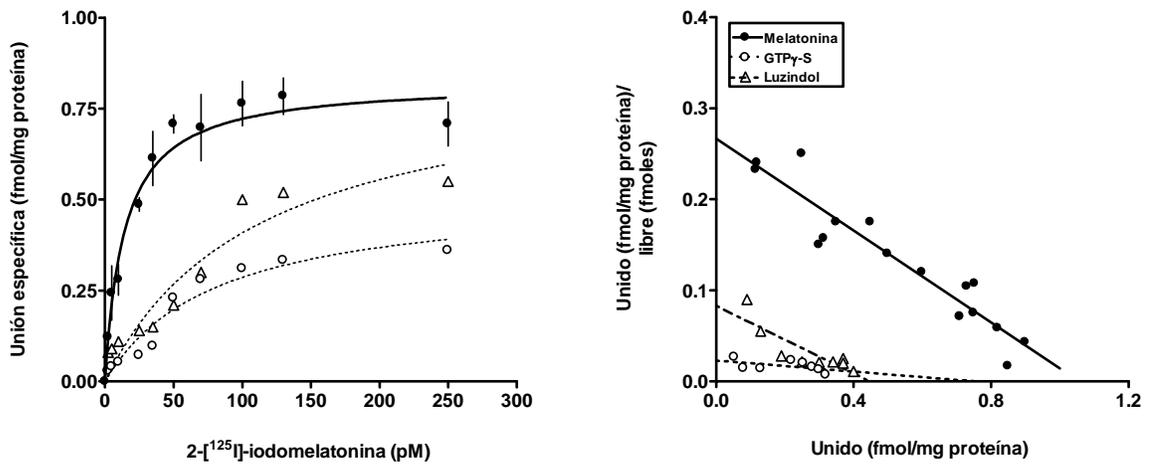


Figura 13: Ensayos de unión y desplazamiento de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en fracción de membrana de adrenal de rata obtenida a las 2200 h. Panel izquierdo, curva de saturación de la unión específica de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina. Panel derecho, análisis de Scatchard. Círculos cerrados, melatonina; círculos abiertos, GTP γ -S; triángulos, luzindol.

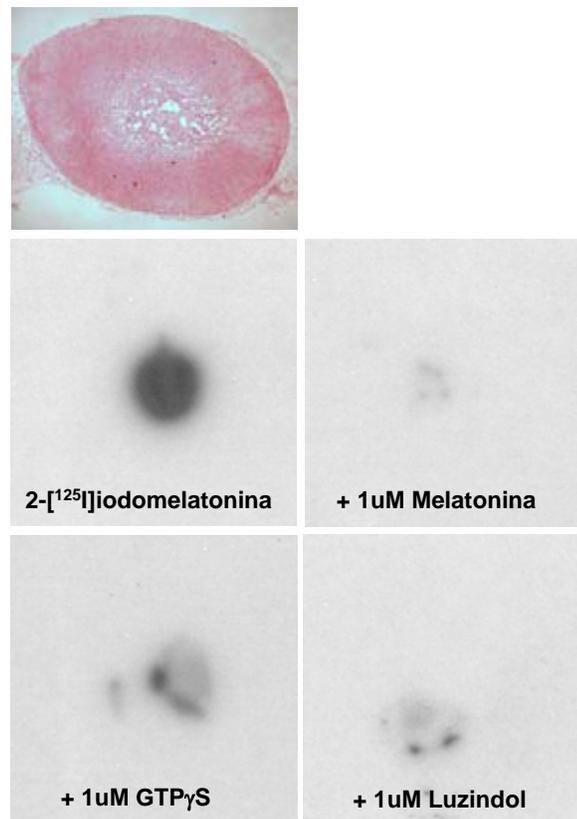


Figura 14: Ensayos de unión y desplazamiento de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en cortes congelados de adrenal de rata obtenida a las 2200 h. *Panel superior izquierdo*, tinción con Hematoxilina-Eosina de corte mediosagital de adrenal de rata macho adulta (aumento del microcopio: 4X). *Paneles inferiores*, imágenes autorradiográficas de cortes de glándula adrenal de rata incubados con 2-[¹²⁵I]iodomelatonina. Cada condición de incubación (2-[¹²⁵I]iodomelatonina sola, mas 1 μM melatonina fría, mas 1 μM GTP_γ-S o mas 1 μM luzindol), está indicada en el panel respectivo.

| Hora del día (h) | Kd (pM) | Bmax (fmol/mg proteína) |
|------------------|--------------|-------------------------|
| 0800 | ND | ND |
| 2200 | 14.22 ± 1.23 | 0.88 ± 0.02 |

Table 6. Constante de afinidad (Kd) y densidad del receptor (Bmax), determinada por ensayo de unión específica de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina en preparaciones de membrana de *pools* de adrenal de rata (n=3 animales por *pool*). Los valores de Kd y Bmax fueron determinados en 4 ensayos independientes tanto a las 0800 como a las 2200 h.

5. DISCUSION

De acuerdo a los resultados presentados podemos concluir que la glándula adrenal de rata expresa los transcritos de las isoformas 1 y 2 del receptor de membrana de melatonina. Determinamos que este tejido une específicamente 2-[¹²⁵I]iodomelatonina de manera saturable y reversible. Las características distintivas de la unión de melatonina por la adrenal de rata son una alta especificidad y una densidad de receptores de membrana relativamente baja. Además, una observación interesante que se desprende de nuestros resultados es que las potenciales acciones de melatonina sobre la función adrenal podrían cambiar con la hora del día, dado que la unión de iodomelatonina pudo ser detectada a las 2200 pero no a las 0800 h.

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 concluyeron 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; Nir et al, 1971; Vaughan et al, 1972; Ogle y 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, b; respectivamente).

Una característica sorprendente, común a todos estos trabajos, es la falta de evidencia 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. En el presente trabajo y en otros experimentos realizados en nuestro laboratorio, abordamos exitosamente esta problemática usando varios métodos independientes, para sólo entonces realizar estudios funcionales *in vitro* buscando determinar acciones directas de melatonina sobre producción de corticosterona inducida por ACTH (Jocelyn García, Tesis paralela). Por otra parte, considerando que melatonina circulante es una fuerte señal circadiana (Richter et al, 2004; Dubocovich y Markowska, 2005), nos propusimos disecar diferencias dependientes de la hora del día en la unión de melatonina en adrenal de rata.

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 en la adrenal de roedores nocturnos, ha sido estudiada por nuestro grupo y también otros autores. Se ha publicado la detección del receptor de melatonina MT1 por RT-PCR en la glándula adrenal de ratones C3H/C57BL (Torres-Farfan et al, 2006a) y rata (Poirel et al, 2003). Estos autores encontraron un nivel de amplificación relativamente bajo para el transcrito de MT1, en ratas mantenidas bajo un fotoperíodo LO 12:12 y sacrificadas 5 h antes de apagar las luces; usando condiciones para evitar amplificación de DNA genómico. Los presentes resultados confirman estos hallazgos para el transcrito de MT1, pero también indican la transcripción de la isoforma

MT2, cuya identidad fue establecida mediante secuenciación de ambos cDNAs clonados. Estos resultados fueron adicionalmente confirmados por análisis de expresión de MT1 usando PCR en tiempo real con partidores que flanquean un sitio de empalme para el único intrón de gran tamaño (> 13 Kb) de este gen. Estos hallazgos fueron extendidos al transcrito de MT2 y, además, en el caso del mRNA de MT1 se demostró variación circadiana de la transcripción, con un máximo bien definido en el intervalo horario 1800-2200 h (Lorena Abarzúa y Fernando Gaete, resultados sin publicar). Además, una observación interesante fue que ambos transcritos exhiben niveles mas bien moderados de expresión. Estos resultados son consistentes con el alto número de ciclos requeridos para amplificar los mRNAs MT1/MT2 usando RT-PCR convencional (32 y no menos de 34 en Poirel et al, 2003 y en nuestras manos; respectivamente).

Es importante mencionar que existen publicaciones de nuestro grupo de investigación y otros autores que indican cambios circadianos del número de transcritos que codifican para receptores de melatonina en el núcleo supraquiasmático (NSQ) de rata adulta (Poirel et al, 2002) y adrenal y NSQ de mono capuchino fetal (Torres-Farfan et al 2006c). En una publicación reciente, se encontró una expresión diferencial del mRNA del receptor MT1 con respecto a la hora del día en páncreas de rata, con niveles de expresión mayor durante la noche (Peschke et al, 2006). Aún mas, existe evidencia que en el NSQ de rata el mRNA de MT1 es indetectable en la noche (2400 h), pero detectable a medio día (1200 h); 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, 1993).

Por otro lado, también investigamos la transcripción del putativo receptor nuclear de melatonina ROR α en la adrenal de rata. En todas las muestras analizadas, obtuvimos una banda robusta, del tamaño esperado, al amplificar el mRNA de ROR α tanto por PCR convencional como en tiempo real. Este resultado abre la interesante posibilidad que melatonina pueda modular la función adrenal a dos niveles diferentes; vale decir, gatillando cascadas de segundos mensajeros via MT1/MT2 así como también por acciones genómicas directas via ROR α .

Consistente con los resultados que indican expresión del mRNA del receptor de melatonina MT1, en una Tesis paralela de nuestro grupo de investigación (Jocelyn García), se detectó el polipéptido esperado para MT1 (37 kDa) en extractos de proteínas de membrana de adrenal de rata. Un hallazgo relevante de ese trabajo fue que el polipéptido MT1 fue detectado a las 2200 h pero no a las 1000 h. Esta marcada variación a lo largo del día, tanto a nivel del mRNA como proteína de MT1, sugiere que se debe poner especial atención a la hora del día, al estudiar efectos de melatonina en tejidos periféricos. Por otra parte, estos hallazgos se condicen 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 encontraría en fase con el ritmo de secreción de su ligando.

En el NSQ de rata, se ha estimado un retardo de aproximadamente 3 h para la acumulación de proteína MT1 después de alcanzados los valores máximos de su transcrito (Neu and Niles, 1997). Este escenario es muy similar a nuestros resultados para el máximo del mRNA de MT1 (1800-2200 h; Lorena Abarzúa y Fernando Gaete, resultados sin publicar) versus la detección del polipéptido de 37 kDa y de unión

específica de melatonina a las 2200 h (Tesis paralela, Jocelyn García y presente investigación, respectivamente). Además, dado que en los animales usados en nuestro laboratorio el máximo de melatonina plasmática se alcanza a las 2200 h (Jocelyn García y Fernando Gaete, observaciones sin publicar), la marcada variación diaria de los niveles de mRNA y proteína de MT1 concuerda con el concepto de inhibición transcripcional y también de unión de melatonina por la propia melatonina plasmática (Vanecek, 1998 y Gauer et al, 1993; respectivamente).

En la presente Tesis, investigamos la presencia de receptores de membrana de melatonina acoplados a proteína G en la glándula adrenal de rata, tanto a las 0800 como 2200 h. Encontramos sitios de unión de alta afinidad para 2-[¹²⁵I]iodomelatonina, con una Kd de aproximadamente 15 pM, dentro del rango publicado para receptores de membrana de melatonina en otras células y tejidos de diferentes especies (ver Dubocovich, 1995 y Torres-Farfan et al, 2003). En ambos sistemas, preparaciones de membrana y cortes congelados de adrenal completa, detectamos unión específica, saturable, reversible y de alta afinidad. La unión de 2-[¹²⁵I]iodomelatonina fue desplazada por luzindol (antagonista de receptores de melatonina MT1 y MT2; Dubocovich et al, 1998) y por GTP γ -S, un análogo no hidrolizable de GTP (Dubocovich, 1995). El valor de Bmax fue aproximadamente 0.9 fmol/mg proteína, relativamente bajo comparado con publicaciones previas en otros tejidos/especies (ver Dubocovich, 1995 y Torres-Farfan et al, 2003), pero de acuerdo con nuestras observaciones de bajos niveles de expresión de mRNA de MT1 y MT2 y de proteína MT1. No fue posible determinar si los sitios de unión se localizan exclusivamente en la corteza o bien en corteza y médula adrenal, lo cual no es de extrañar dado que la resolución del ensayo

de unión de [125 I]iodomelatonina en cortes es baja y que la glándula adrenal es un órgano de tamaño mas bien reducido (cerca de 20 mg cada una). Todos los resultados dando cuenta de unión de melatonina en la adrenal de rata fueron obtenidos a las 2200 h, sin unión detectable a las 0800 h. Notablemente, previamente se han descrito variaciones circadianas de unión de 2-[125 I]iodomelatonina de alta afinidad en el cerebro de ratas (Laitinen et al, 1989; Poirel et al, 2002) y pollos (Yuan et al, 1992).

Existen dos publicaciones previas examinando unión de 2-[125 I]iodomelatonina en adrenal de rata. En la primera de ellas, se determinó 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 0930 y 1100 h (Persengiev, 1992). El valor de Kd calculado por este autor es mas alta que cualquier otro publicado para sitios de unión de melatonina (ver Dubocovich, 1995 y Torres-Farfan et al, 2003); y puede ser explicado al menos en parte por la no saturación de la curva de unión específica. Sin embargo, estos resultados no fueron confirmados por Pang et al (1994), quienes encontraron una muy baja densidad (< 0.2 fmol/mg proteína) de unión de alta afinidad de 2-[125 I]iodomelatonina en adrenal de rata; no obstante, estos autores no informaron la hora de recolección de las muestras. Estos últimos autores también examinaron la unión de melatonina en adrenal de pato obtenida a la mitad de las horas de luz, determinando valores de Kd y Bmax de aproximadamente 28 pM and 3.38 fmol/mg proteína, respectivamente. De interés, este valor de Kd es muy cercano al que determinamos en la presente investigación.

En una Tesis paralela de nuestro grupo de investigación (Jocelyn García), se midió la producción de corticosterona por adrenal *in vitro* obtenida a las 0800 y 2200 h;

bajo tratamiento con combinaciones de melatonina, ACTH y luzindol durante la tarde y mañana subsiguiente, respectivamente. Los resultados obtenidos por los tratamientos de la tarde mostraron profundas diferencias con los de la mañana. En síntesis, estos experimentos permitieron demostrar que melatonina es capaz de inhibir directa y reversiblemente la producción de corticosterona inducida por ACTH, de una manera tiempo-dependiente. Estos resultados y los de la presente investigación encajan bien en un modelo de función adrenal donde este tejido es capaz de seguir eficientemente un programa circadiano anticipatorio; lo cual está en sintonía con la posibilidad que la adrenal sea un reloj biológico periférico.

En este contexto, publicaciones recientes muestran expresión circadiana de genes reloj *in vivo* en adrenal de mono rhesus (Lemos et al, 2006) y ratón (Ishida et al, 2005; Oster et al, 2006; Torres-Farfan et al, 2006a; 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, 2006a). Así mismo, mediante PCR en tiempo real, nosotros hemos detectado transcripción oscilatoria de genes reloj en la adrenal de rata (Richter HG, Abarzua-Catalan L, Gaete F 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 trasplante de adrenal de ratones normales en mutantes, restableció el ritmo de corticosterona (Oster et al, 2006). Por otra parte, 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 contribuir a explicar por qué en investigaciones recientes de nuestro grupo (Tesis paralela, Jocelyn García),

detectamos diferencias significativas en la respuesta de corticosterona a ACTH entre adrenales colectadas a diferentes horas del día. Las variaciones diurnas de la capacidad de unión de melatonina por la adrenal de rata, observadas en la presente investigación, también podrían ser gobernadas directa o indirectamente por la expresión circadiana de genes reloj en este tejido.

Los presentes hallazgos, en conjunto con otros generados en nuestro grupo de investigación, indican claramente no sólo expresión sino también variación diaria 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-Farfán et al, 2003 y 2006a; respectivamente) y que en nuestro laboratorio no hemos sido capaces de inmunodetectar la proteína MT2 en adrenal de rata, es concebible que el efecto de melatonina sea mediado por la activación de receptores MT1. Mas aún, resultados de nuestro laboratorio 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 puede ser enmascarada por la superposición de señales derivadas en su mayor parte del sistema nervioso central. Otro aspecto por resolver es el mecanismo de transducción de señales activado por melatonina en células de la glándula adrenal de rata.

6. BIBLIOGRAFIA

BORNSTEIN SR, CHROUSOS GP. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**:1729-1736.

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

CARLBERG C, WIESENBERG I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res* 1995; **18**:171-178.

DALLMAN MF, ENGELAND WC, ROSE JC, et al. Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH. *Am J Physiol* 1978; **235**:R210-R218.

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

DUBOCOVICH M. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995; **16**:50-56.

DUBOCOVICH ML, YUN K, AL-GHOUL WM, et al. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* 1998; **12**:1211-1220.

DUBOCOVICH ML, RIVERA-BERMUDEZ MA, GERDIN MJ, et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatoninreceptors. *Front Biosci* 2003; **8**:d1093-d1108.

DUBOCOVICH ML, MARKOWSKA M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; **27**:101-110.

ENGELAND WC, ARNHOLD MM. Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 2005; **28**:325-332.

GANGULY S, COON SL, KLEIN DC. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 2002; **309**: 127-137

GAUER F, MASSON-PEVET M, PEVET P. Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res* 1993; **602**:153-156.

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

GROMOVA EA, KRAUS M, KRECEK J. Effect of melatonin and 5-hydroxytryptamine on aldosterone and corticosterone production by adrenal glands of normal and hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 1967; **39**:345-350.

HAJAK G, RODENBECK A, EHRENTAL HD, et al. No evidence for a physiological coupling between melatonin and glucocorticoids. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; **133**:313-322.

IKUYAMA S, NILLER HH, SHIMURA H, et al. Characterization of the 5'-flanking region of the rat thyrotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 1992; **6**:793-804.

ISHIDA A., MUTHO T, UEYAMA T. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoids release. *Cell Metab* 2005; **2**:297-307.

KINSON GA, SINGER B, GRANT L. Adrenocortical hormone secretion at various time intervals after pinealectomy in the rat. *Gen Comp Endocrinol* 1968; **1**:447-449.

KOBAYASHI H, KROMMINGA A, DUNLOP TW, et al. A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *FASEB J* 2005; **19**:1710-1720.

LAITINEN JT, CASTREN E, VAKKURI O, et al. Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 1989; **124**:1585-1587.

LEMOS DR, DOWNS JL, URBANSKI HF. Twenty-four hour rhythmic gene expression in the rhesus macaque adrenal gland. *Mol Endocrinol* 2006; **20**:1164-1176.

LESNIEWSKA B, NOWAK M, NUSSDORFER GG, MALENDOWICZ LK. Sex-dependent effect of melatonin on the secretory activity of rat and hamster adrenal gland in vitro. *Life Sci* 1990; **47**:241-245.

LEWY A, TETSUO M, MARKEY S, et al. Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; **50**:204-205.

MALENDOWICZ LK. Stereological studies on the effects of pinealectomy, melatonin and oestradiol on the adrenal cortex of ovariectomised rats. *J Anat* 1985; **141**:115-120.

MORGAN PJ, BARRETT P, HOWELL HE, et al. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994; **24**:101-146.

NEU JM, NILES LP. A marked diurnal rhythm of melatonin ML1A receptor mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; **49**:303-306.

NIR L, SCHMIDT U, HIRSCHMANN N, et al. The effect of pinealectomy on rat plasma corticosterone levels under various conditions of light. *Life Sci* 1971; **10**:317-324.

OGLE TF, KITAY JI. In vitro effects of melatonin and serotonin on adrenal steroidogenesis. Proc Soc Exp Biol Med 1978; **157**:103-105.

ORTH D, KOVACS W. The adrenal cortex. In: Williams Textbook of Endocrinology. Wilson J, Foster D, Kronenberg H, Reed-Larsen P, eds. Saunders Philadelphia Press, Philadelphia, PA, 1998; pp. 517-664.

OSTER H, DAMEROW S, KIESSLING S, et al. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. Cell Metab 2006; **4**:163-173.

OXENKRUG GF, MCINTYRE IM, GERSHON S. Effects of pinealectomy and aging on the serum corticosterone circadian rhythm in rats. J Pineal Res 1984; **1**:181-185.

PANG CS, TSANG KF, BROWN GM, et al. Specific 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the duck adrenal gland. Neurosci Lett 1994; **165**:55-58.

PERSENGIEV SP, KANCHEV LN, STANKOV BM. Effect of melatonin on steroid production by rat adrenals under in vitro superfusion conditions. Life Sci 1989; **44**:1955-1962.

PERSENGIEV SP. 2-(¹²⁵I) iodomelatonin binding sites in rat adrenals: pharmacological characteristics and subcellular distribution. Life Sci 1992; **51**:647-651.

PESCHKE E, FRESE T, CHANKIEWITZ E, et al. 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* 2006; **40**:135-143.

POIREL VJ, MASSON-PEVET M, PEVET P, et al. MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 2002; **946**:64-71.

POIREL VJ, CAILOTTO C, STREICHER D, et al. MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; **24**:33-38.

POZO D, DELGADO M, FERNANDEZ-SANTOS JM, et al. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J* 1997; **11**:466-473.

REBUFFAT P, MAZZOCCHI G, GOTTARDO G, et al. An ultrastructural morphometric study of the effects of chronic melatonin administration on the zona fasciculata of rat adrenal cortex. *J Submicrosc Cytol* 1987; **19**:415-421.

REITER RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; **12**:151-180.

REITER RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; **49**:654-664.

REPPERT SM, GODSON C, MAHLE CD, et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:8734-8738.

REPPERT SM, WEAVER DR, GODSON C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 1996; **17**:100-102.

RICHTER HG, TORRES-FARFAN C, ROJAS-GARCIA PP, et al. The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biol Res* 2004; **37**:11-28.

RICHTER HG, TORRES-FARFAN C, GARCIA-SESNICH J, et al. Melatonin receptors in the rat adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *Submitted to J Pineal Res*.

ROSS R.H., KAYE G.I, PAWLINA W. *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*, 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana, 2005; **20**: 644-683.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA, 1989.

SANCHEZ DE LA PENA S, HALBERG F, HALBERG E, et al. Pineal modulation of ACTH 1-17 effect upon murine corticosterone production. *Brain Res Bull* 1983a; **11**:117-125.

SANCHEZ DE LA PENA S, HALBERG F, UNGAR F, et al. Circadian pineal modulation of pituitary effect on murine corticosterone in vitro. *Brain Res Bull* 1983b; **10**:559-565.

SONG Y, CHAN CW, BROWN GM, et al. Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB J* 1997; **11**:93-100.

SUGDEN D, MCARTHUR AJ, AJPRU S, et al. 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* 1999; **72**:176-182.

TORRES-FARFAN C, RICHTER HG, ROJAS-GARCIA P, et al. mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**:450-458.

TORRES-FARFAN C, RICHTER HG, GERMAIN AM, et al. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J Physiol* 2004; **554**:841-856.

TORRES-FARFAN C, SERON-FERRE M, DINET V, et al. 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* 2006a; **40**:64-70.

TORRES-FARFAN C, VALENZUELA FJ, GERMAIN AM, et al. Maternal melatonin stimulates growth and prevents maturation of the capuchin monkey fetal adrenal gland. *J Pineal Res* 2006b; **41**:58-66.

TORRES-FARFAN C, ROCCO V, MONSO C, et al. Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. *Endocrinology* 2006c; **147**:4618-4626.

VANECEK J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; **78**:687-721.

VAUGHAN MK, VAUGHAN GM, REITER RJ, et al. 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* 1972; **10**:139-154.

WATANABE T, KOJIMA M, TOMIDA S, et al. Peripheral clock gene expression in CS mice with bimodal locomotor rhythms. *Neurosci Res* 2006; **54**:295-301.

YUAN H, PANG SF. [¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the chicken brain: diurnal variation and effect of melatonin injection or pinealectomy. *Biol Signals* 1992; **1**:208-218.