

18.374

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 5 6 2 5 3 4 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**FUNCIÓN DE LA ARILALQUILAMINA N-ACETILTRANSFERASA
EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS RÍTMICA DE
MELATONINA EN LA RETINA DE ANFIBIOS ANUROS:
INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES Y ENDÓGENOS.**

V^oB^o

El director

María Jesús Delgado Saavedra

Angel Luis Alonso Gómez

Memoria presentada por Angel Luis Alonso Gómez para
obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Madrid, 14 de Abril de 1.993

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el departamento de Biología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dr^a. María Jesús Delgado Saavedra. Contando con el apoyo económico prestado por la beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia, y los Proyectos de Investigación CICYT PB 88-0135 y DGICYT PB 91-0400 subvencionados por la comisión interministerial de ciencia y tecnología.

ABREVIATURAS.

- 5-HT. Serotonina.
- Adrenalina
- AAAD. Aminoácido aromático descarboxilasa.
- AA-NAT. Arilalquilamina N-acetiltransferasa.
- A-NAT. Arilamina N-acetiltransferasa.
- AcCh. Acetilcolina.
- AMP. Adenosín monofosfato
- AMPc. Adenosín monofosfato cíclico
- ADP. Adenosín difosfato.
- APB. Ácido 2-amino-4-fosfonobutírico.
- Asp. Aspartato
- ATP. Adenosín trifosfato.
- CCG. Capa de las células ganglionares.
- CNE. Capa nuclear externa.
- CNI. Capa nuclear interna.
- CPE. Capa plexiforme externa.
- CPI. Capa plexiforme interna.
- CSE. Capa de los segmentos externos de los fotorreceptores.
- CSI. Capa de los segmentos internos de los fotorreceptores.
- CV. Coeficiente de variación de la media.
- DA. Dopamina.
- DME. Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
- DMSO. Dimetilsulfóxido.
- E. Enzima.
- E_a . Energía de activación.
- EI. Complejo enzima-inhibidor
- ES. Complejo enzima-substrato
- G. Tabla de desarrollo de Gosner para larvas de anuros.
- GABA. Ácido gamma-aminobutírico.
- GAD. Glutamato descarboxilasa.
- Glu. Glutamato.
- Gly. Glicocola.
- HIOMT. Hidroxindol-O-metiltransferasa.

- HPLC. Cromatografía líquida de alta resolución.
- IBMX. Isobutilmetilxantina.
- k_{cat} . Constante catalítica.
- K_M . Constante de Michaelis.
- K_i . Constante de inhibición.
- L-DOPA. L-dihidroxifenilalanina.
- NA. Noradrenalina.
- NAT. Serotonina N-acetiltransferasa
- NMDA. N-Metil-D-aspartato.
- MAO. Monoamino oxidasa.
- MLE. Membrana limitante externa.
- MLI. Membrana limitante interna.
- NF. Tabla de desarrollo de Nieuwkoop-Faber para *Xenopus laevis*.
- PKA. Proteína quinasa dependiente de AMPc.
- PKC. Proteína quinasa dependiente de calcio.
- PK(Ca⁺⁺/CM)II. Proteína quinasa dependiente de Ca⁺⁺/calmodulina, de tipo II.
- Q_{10} . Coeficiente de temperatura
- TK. Tabla de desarrollo de Taylor-Kollros para *Rana pipiens*.
- TLC. Cromatografía líquida en capa fina.
- TPH. Triptófano hidroxilasa.
- Trp. Triptófano.
- TH. Tirosina hidroxilasa.
- VIP. Péptido intestinal vasoactivo.
- V_{max} . Velocidad máxima.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. DESCRIPCIÓN MORFOFUNCIONAL DE LA RETINA	2
1.1. Anatomía del ojo de anuros	2
1.2. Neuroanatomía de la retina	4
1.2.1 Tipos de células en la retina	5
1.2.2 Irrigación de la retina	11
1.3. Neuroquímica de la retina de anfibios	12
1.4. Desarrollo ontogénico de la retina	18
1.5. Neurofisiología de la retina. Fotorrecepción	22
2. MELATONINA OCULAR EN LOS VERTEBRADOS	27
2.1. Síntesis de melatonina	27
2.1.1 Síntesis de serotonina a partir de triptófano	28
2.1.2 Regulación de los niveles de serotonina	30
2.1.3 Síntesis de melatonina a partir de serotonina	30
2.2. Degradación de la melatonina	33
2.3. Regulación de la síntesis de melatonina	35
2.3.1 Regulación endógena	35
2.3.2 Regulación ambiental	36
2.4. Funciones oculares de la melatonina	38
2.4.1 Sistema Dopamina-Melatonina	38
2.4.2 Funciones reguladas por el sistema dopamina-melatonina	40
3. CINÉTICA ENZIMÁTICA	41
3.1. Factores que afectan a la actividad enzimática	42
3.1.1 Concentración de enzima	42
3.1.2 Substratos	42
3.1.3 Efecto del pH	46
3.1.4 Efectos de la temperatura	47
3.2. Cinética de las reacciones bisustrato	48
3.3. Inhibidores de enzimas	51
3.3.1 Inhibición por exceso de sustrato	52
3.4. Significado fisiológico de la K_M	54
4. LA TEMPERATURA COMO FACTOR DE ADAPTACIÓN BIOLÓGICA	56
4.1. Coeficiente de temperatura Q_{10}	56

4.2. Mecanismos de adaptación térmica	56
4.3. Adaptaciones enzimáticas frente a la temperatura	57
4.3.1 Conservación de la K_M y la temperatura	58
4.3.2 Estrategias adaptativas	59
II. OBJETIVOS	62
III. MATERIALES Y MÉTODOS	66
1. MATERIALES	67
1.1. Productos	67
1.2. Instrumental	69
1.3. Material biológico: obtención y mantenimiento	70
1.3.1 Animales adultos de <i>Rana perezi</i>	70
1.3.2 Larvas de anfibios anuros	70
2. MÉTODOS	72
2.1. Extracción de los tejidos	72
2.1.1 Obtención de copas ópticas de ejemplares adultos de <i>R. perezi</i>	72
2.1.2 Embriones y larvas de anuros	73
2.2. Diseños experimentales	73
2.2.1 Caracterización de la actividad N-acetiltransferasa de la retina de <i>R. perezi</i>	73
2.2.2 Estudio ontogénico del ritmo de la actividad NAT	77
2.2.3 Ritmos estacionales de la actividad NAT y melatonina en <i>R. perezi</i>	78
2.2.4 Efecto de la temperatura sobre la NAT	79
2.2.5 Modelo <i>in vitro</i> para el estudio de la síntesis de melatonina	81
2.3. Técnicas Instrumentales	85
2.3.1 Radioenzimoinmunoensayo de la actividad NAT	85
2.3.2 Radioinmunoensayo de melatonina	89
2.3.3 Determinación de proteínas	95
2.3.4 Método de cultivo estático	95
2.4. Métodos de calculo y estadística	96
2.4.1 Métodos de regresión	96
2.4.2 Estimación de las constantes cinéticas	99
2.4.3 Ritmos diarios de melatonina y actividad NAT	101
2.4.4 Análisis estadístico para cultivos de copas ópticas	103
IV. RESULTADOS	107

1. CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD NAT DE LA RETINA DE <i>R. perezii</i>	108
1.1. Actividad AA-NAT	108
1.1.1 Optimización del ensayo de la NAT	108
1.1.2 Localización ocular de la NAT	114
1.1.3 Cinética de la NAT. estimación de las constantes cinéticas	115
1.1.4 Dependencia de la actividad NAT ocular con el tamaño corporal	117
1.1.5 Diferencia día-noche en la actividad NAT	119
1.2. Actividad A-NAT	121
1.2.1 Existencia de la actividad A-NAT en la retina	120
1.2.2 Interferencia de la A-NAT en el ensayo	122
2. VALIDACIÓN DEL RIA DE MELATONINA	126
2.1. Valoración de melatonina en los medios de cultivo	128
2.2. Valoración de melatonina en la retina de <i>R. perezii</i>	129
2.3. Sensibilidad y reproductibilidad del RIA	131
3. DESARROLLO ONTOGÉNICO DEL RITMO DIARIO DE ACTIVIDAD NAT	133
3.1. <i>Rana perezii</i>	134
3.2. <i>Xenopus laevis</i>	137
3.3. <i>Discoglossus pictus</i>	139
3.4. <i>Bufo calamita</i>	141
4. RITMO ESTACIONAL DE NAT Y MELATONINA OCULAR EN <i>R. perezii</i>	146
4.1. Primavera	147
4.2. Verano	148
4.3. Otoño	149
4.4. Invierno	150
5. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE LA NAT	156
6. EFECTO DE LA ACLIMATACIÓN TÉRMICA SOBRE LA NAT	171
7. SÍNTESIS DE MELATONINA EN COPAS ÓPTICAS <i>IN VITRO</i>	174
7.1. Condiciones óptimas de cultivo de copas ópticas	175
7.2. Control catecolaminérgico de la síntesis de melatonina ocular	183
7.3. Sistemas de segundos mensajeros	194
V. DISCUSIÓN	204
VI. CONCLUSIONES	241
VII. BIBLIOGRAFÍA	245

I. INTRODUCCIÓN

1. DESCRIPCIÓN MORFOFUNCIONAL DE LA RETINA.

1.1. Anatomía del ojo de anuros.

El ojo de los vertebrados pertenece al tipo de ojo en cámara, las imágenes se forman de forma invertida en el interior de dicha cámara (u globo ocular), la cual se encuentra tapizada por un tejido fotosensible (Land y Fernald, 1992).

El ojo de los anuros tiene la peculiaridad de poder retraerse dentro de las órbitas. La mayoría de las especies poseen párpados que cubren exteriormente al globo ocular, el párpado superior es un pliegue del tegumento con una movilidad limitada, en cambio, el párpado inferior es mucho más móvil, cuya parte superior es transparente o translúcida, denominándose membrana nictitante. A lo largo del borde del párpado inferior existe un tendón que cuando el globo ocular se retrae dentro de la órbita, distiende la membrana nictitante que pasa a cubrir el globo ocular por completo (Duellman y Trueb, 1986).

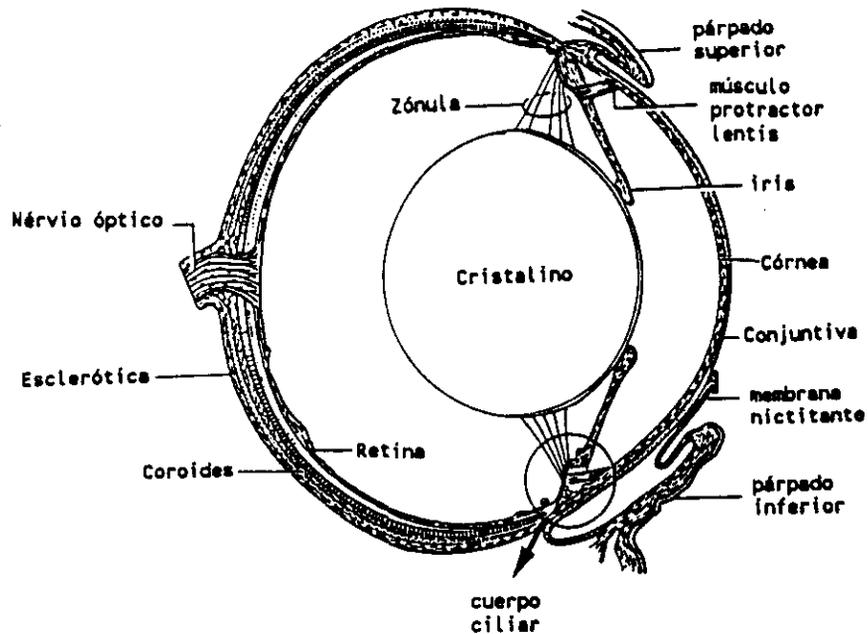
El globo ocular se encuentra lubricado por glándulas lacrimales modificadas que se denominan **glándulas de Harder**, situadas en la parte anterior de la órbita.

El globo ocular está formado por una serie de capas que se envuelven concéntricamente al **humor vítreo**. La capa más externa es de tejido conjuntivo denominándose **esclerótica**. La parte posterior de la misma es de naturaleza cartilaginosa y su función es principalmente de sostén (Tsukamoto, 1987). La parte anterior de la esclerótica se denomina **córnea**, es totalmente transparente permitiendo así el paso de la luz. Recubriendo la cornea y en contacto con el exterior se encuentra una capa epitelial denominada conjuntiva (Duellman y Trueb, 1986).

Tapizando la cara interna de la esclerótica, a excepción de la zona de la cornea, se encuentra la **coroides**, capa profusamente vascularizada y fuertemente pigmentada.

En contacto íntimo con la coroides se encuentra la **retina**. Dicho tejido tapiza el fondo del globo ocular, siendo la única parte fotosensible del ojo. El límite anterior de la retina (*ora serrata*) se une a la esclerótica mediante la estructura denominada **cuerpo ciliar**.

Por debajo de la cornea, se dispone el **crystalino**, estructura totalmente transparente que funciona como una lente convergente, encargándose del enfoque de las imágenes en la superficie de la retina. El cristalino se mantiene suspendido del cuerpo ciliar mediante las fibras de la **zonula** (véase Ilustr. 1). La posición del cristalino dentro del ojo se puede



Ilustr. 1 Diagrama semiesquemático de un corte sagital del ojo de *Rana pipiens* (Duellman y Trueb, 1986).

modificar por acción del **músculo *protractor lentis***, estos movimientos sirven para la acomodación ocular, es decir, permiten el enfoque de objetos situados a distancias variables respecto al animal (Duellman y Trueb, 1986).

Cubriendo la parte anterior del cristalino se encuentra una estructura circular muy pigmentada denominada **iris**. El iris está constituido por dos capas epiteliales, entre las cuales se localizan dos conjuntos de fibras musculares con acciones antagónicas, el **músculo dilatador de la pupila**, con fibras musculares de orientación radial cuya contracción produce la dilatación de la apertura central o **pupila**, y un conjunto de fibras circulares denominadas **esfínter de la pupila** que se encargan de su contracción. El tamaño de la pupila regula la cantidad de luz que pasa al interior del ojo, es decir, el iris funciona de forma análoga al diafragma de una cámara fotográfica.

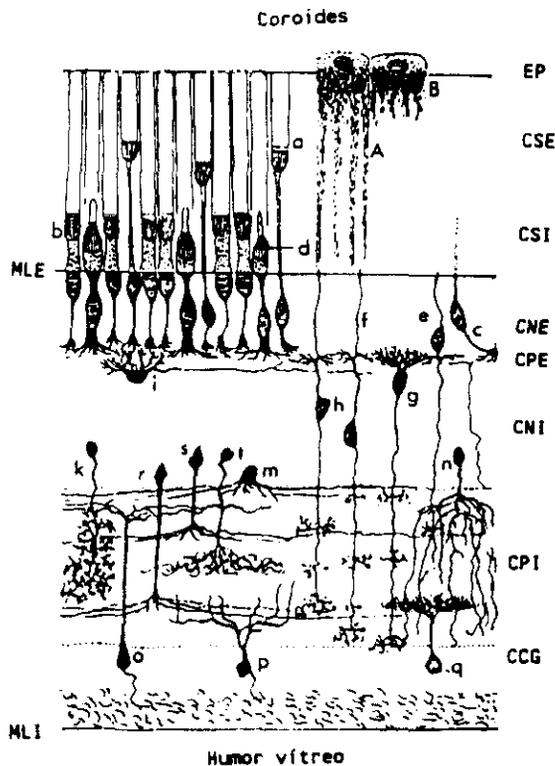
El humor vítreo, es un gel transparente que llena la cavidad interna del globo ocular. Tiene una función fundamentalmente estructural, manteniendo la forma esférica del globo ocular (Duellman y Trueb, 1986).

1.2. Neuroanatomía de la retina.

La retina puede dividirse en dos capas principales. La situada exteriormente es un epitelio uniestratificado de origen neuroepitelial que se denomina **epitelio retinal o pigmentado** debido a la gran cantidad de gránulos de melanina que se encuentran en el citoplasma de estas células. Interiormente a dicho epitelio se sitúa la denominada **retina neural**, formada enteramente por tejido nervioso (Rodieck, 1973).

La retina neural de los vertebrados está invertida, las células fotorreceptoras se encuentran en la parte más alejada de la fuente de luz, que debe atravesar el resto de las neuronas que la componen antes de alcanzar los fotorreceptores (Land y Fernald, 1992). Mediante microscopía óptica la retina neural puede dividirse en una serie de estratos que a continuación se describen brevemente, comenzando desde la capa más externa hacia la más interna (véase Ilustr. 2):

- Capa de los segmentos externos (CSE). En contacto con el epitelio pigmentado, está formada por los segmentos externos de los fotorreceptores, es la única región que posee pigmentos fotosensibles.
- Capa de los segmentos internos (CSI). Parte del cuerpo celular de los fotorreceptores en íntimo contacto con el segmento externo, cuya función principal es satisfacer las necesidades metabólicas de la fotorrecepción.
- Capa nuclear externa (CNE). Formada por los núcleos de las células fotorreceptoras.
- Capa plexiforme externa (CPE). En esta capa tienen lugar los contactos sinápticos entre los siguientes tipos de células: fotorreceptores, células bipolares y células horizontales.
- Capa nuclear interna (CNI). En esta capa se encuentran los núcleos de tres tipos de neuronas (horizontales en la parte más externa, bipolares en el centro, y en la parte más interna los núcleos de las células amacrinas. En esta capa también se localizan los núcleos de las principales células gliales de la retina, las células de Müller.
- Capa plexiforme interna (CPI). En esta capa se localizan los contactos sinápticos entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares.
- Capa de las células ganglionares (CCG). Formada por los núcleos de dichas células.
- Capa de las fibras ópticas. Constituida por los haces de los axones de las células ganglionares. Una vez que abandonan el ojo forman el nervio óptico, que constituye la vía de transmisión de la información visual al sistema nervioso central.



A, Cél. epitelial con el pigmento extendido; B. célula epitelial con el pigmento retraído; a, bastón verde; b, bastón rojo; c, bastón verde oblicuo; d, cono; e, célula bipolar desplazada; f, filamento de Landolt; g, célula bipolar grande; h, célula bipolar pequeña con filamento de Landolt; i, célula horizontal; k, m, n, r, s, t, célula amacrina; o, p, célula ganglionar; q, célula amacrina desplazada.

Ilustr. 2 Sección vertical de la retina de *Rana esculenta* mostrando los distintos tipos celulares (Rodieck, 1973).

En algunas especies de anuros (*Rana*, *Xenopus*) se han descrito fibras retinopetales en el nervio óptico, contienen en su mayoría sustancia P, y corresponden a cuerpos neuronales dispuestos en la *lamina terminalis* en el área septopreóptica (hipotálamo), aunque su importancia funcional se desconoce en la actualidad (Uchiyama *et al.*, 1988).

1.2.1 TIPOS DE CÉLULAS EN LA RETINA.

a) Epitelio pigmentado.

Es un epitelio de células poligonales, que se encuentran unidas entre sí por **complejos de unión**, que incluyen una *zonula adherens* (formada por desmosomas), uniones tipo GAP, y en la parte más apical la *zona ocludens*. A esta última zona los microscopistas ópticos le dieron el nombre de **Membrana de Verhoeff** (Rodieck, 1973).

El epitelio posee una marcada asimetría entre las dos superficies del mismo, la membrana basal muestra una serie de invaginaciones no muy profundas pero que incrementan su superficie en unas 30 veces. En el espacio extracelular en contacto con la membrana basal

se encuentra la **membrana de Bruch**, matriz extracelular formada por la lamina basal del epitelio pigmentado junto con la correspondiente del endotelio vascular coroidal (Hewitt, 1986). La membrana apical posee una serie de interdigitaciones de gran tamaño que envuelven totalmente los segmentos externos de las células fotorreceptoras. El espacio extracelular queda ocupado por la matriz interfotorreceptora, no existiendo contacto entre las membranas del epitelio y la de los fotorreceptores. En el citoplasma de las células epiteliales se han descrito una serie de inclusiones:

- **Gránulos de pigmento.** (melanina), que pueden desplazarse de forma activa dentro del citoplasma.
- **Fagosomas.** Relacionados con la renovación de los segmentos externos de las células fotorreceptoras.
- **Gotas lipídicas.** Donde se almacenan vitamina A y otros retinoides en forma de ésteres con ácidos grasos (Clark, 1986).

El epitelio pigmentado sirve de sostén estructural para los segmentos externos, manteniendo la cohesión de la **matriz interfotorreceptora**, y por tanto la unión entre este epitelio y la retina neural (Ostwald y Steinberg, 1980).

b) Células de Müller.

Son las principales células gliales de la retina neural, y sus citoplasmas se extienden ocupando el ancho total de la retina neural. En la cara externa forman complejos de unión con los segmentos internos de los fotorreceptores formando la membrana limitante externa (MLE). En la cara vitreal (o interna) los extremos de estas células se unen entre sí mediante complejos de unión con *zonula adherens*, formando la **membrana limitante interna (MLI)**, véase Ilustr. 2). En su citoplasma abundan los gránulos de glucógeno (Rodieck, 1973).

c) Fotorreceptores.

La célula fotorreceptora de los vertebrados puede dividirse en una serie de regiones morfológica y funcionalmente especializadas (Ilustr. 3):

1. Segmento externo. Orgánulo membranoso derivado de la membrana plasmática que tiene estructura lamelar formada por discos apilados dispuestos perpendicularmente al eje del fotorreceptor. Incluidas en las membranas de los discos se encuentran los pigmentos visuales (rodopsina) formadas por retinoides unidos covalentemente a una proteína integral de

membrana que llegan a representar el 90 % del total protéico del segmento externo (Besharse, 1986).

2. Segmento interno. Es la parte del fotorreceptor que se encuentra entre los segmentos externos y el núcleo celular, dicha región queda fuera de la MLE. Contiene varias estructuras que a continuación se describen:

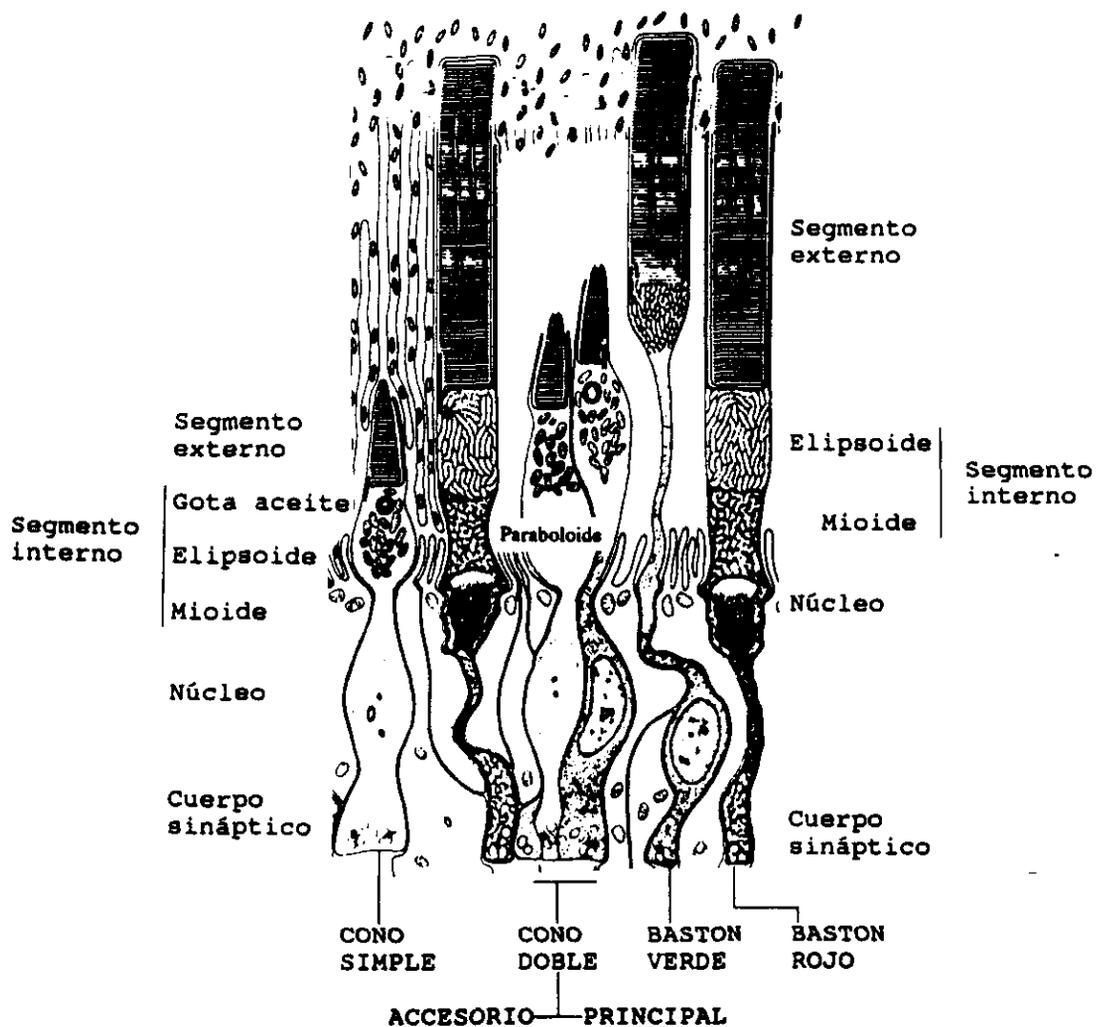
- Cilio. Semejante a los cilios de células sensoriales (sin microtúbulos centrales), se encuentra en contacto con los segmentos externos. Tiene una función estructural manteniendo la diferenciación entre las membranas del segmento externo e interno (Besharse, 1986).
- Gota lipídica. Dependiendo del tipo de fotorreceptor, puede estar presente o no. Está compuesta por lípidos insaturados coloreados por carotenoides. Su función sería actuar como un filtro de color, o funcionar como una lente convergente enfocando la luz incidente sobre los segmentos externos.
- Elipsoide. Está formado por una agregación de mitocondrias encargadas de la producción de energía necesaria para la función visual.
- Paraboloide. Gránulos de glucógeno que podrían ser un almacén de reserva para la actividad metabólica del segmento interno.
- Mioide. Es la región del segmento interno que contiene el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi, en esta zona tiene lugar la síntesis de proteínas del fotorreceptor, incluyendo los propios pigmentos visuales (Bird *et al.*, 1988). El mioide es capaz de modificar su longitud mediante cambios en su citoesqueleto como respuesta a estímulos luminosos (movimientos retinomotores).

3. Pericario. Región que contiene el núcleo celular.

4. Cuerpo sináptico. Terminación especializada donde se producen los contactos sinápticos con las neuronas de segundo orden, las células bipolares y horizontales.

Atendiendo a la morfología de los segmentos externos los fotorreceptores se pueden dividir en dos tipos:

- **Bastones.** Fotorreceptores muy alargados con los segmentos externos cilíndricos de gran longitud abarcando el ancho total de la CSE (Zhang y Straznicky, 1991). Los discos membranosos se encuentran totalmente aislados de la membrana plasmática siendo por tanto, orgánulos intracelulares. Los núcleos se sitúan en la mitad exterior de la CNE. En los anuros se han descrito dos subtipos distintos atendiendo a su morfología y a la naturaleza del pigmento visual. Bastones rojos con una absorción máxima a 502 nm, y bastones verdes más pequeños y con el máximo de absorción a 432 nm (Zhang y Straznicky, 1991).



Ilustr. 3. Tipos de fotorreceptores y regiones especializadas de los mismos de la retina de anfibios anuros (Duellman y Trueb, 1986).

- **Conos.** Los segmentos externos tienen forma cónica y son de menor longitud que la de los bastones, todos los discos membranosos tienen una continuidad con la membrana plasmática, es decir, la membrana fotosensible es en realidad una misma estructura formada por múltiples pliegue apilados. Los núcleos celulares se sitúan en la mitad interior de la CNI (Zhang y Straznicky, 1991).

En los anuros se han descrito dos tipos de conos principales: conos simples que se caracterizan por la posesión de una gota lipídica en el segmento interno, y un máximo de absorción a 580 nm, y conos dobles, dos conos adosados mediante uniones en sus membranas, el elemento principal de la pareja es idéntico a un cono simple mientras que el cono accesorio posee el mismo pigmento que los bastones rojos, sus segmentos externos son más largos y finos y su segmento interno acumula glucógeno (paraboloides) (Röhlich *et al.*,

1989). Recientemente, en *Xenopus* se ha descrito un tipo minoritario de cono enano, que probablemente contenga un pigmento visual con el máximo de absorción en el azul (Röhlich *et al.*, 1989).

Las proporciones relativas de los distintos tipos de fotorreceptores se han determinado en *Rana pipiens*, siendo las siguientes: bastones rojos 50 %, bastones verdes 8%, conos simples 18% y conos dobles 24 % (Liebman y Entire, 1968).

Las cuerpos sinápticos de fotorreceptores se disponen en la CPE a distintas alturas. En la zona más externa se encuentran los terminales de los bastones rojos, mientras que en la más interna están los de los bastones verdes, entre estas dos zonas se encuentran las terminaciones sinápticas de los conos.

Aunque poseen varios pigmentos visuales con longitudes de onda diferentes, la capacidad de visión del color por parte de los anfibios anuros, no se conoce con seguridad. Se sabe que el comportamiento del animal depende de la iluminación, en intensidades altas el individuo muestra fototaxis negativa, respondiendo específicamente al rojo y al violeta. En iluminación baja, tiene comportamiento fototáctico positivo, respondiendo fundamentalmente al azul. En cambio, en iluminaciones intermedias, se muestran indiferentes al color (Hailman y Jaeger, 1976). Recientemente, se ha propuesto que los anuros podrían tener una visión dicromática guiada por los bastones verdes y los conos. (Burggren y Just, 1992).

d) Células horizontales.

Las células horizontales se caracterizan por tener sus núcleos en la CNI y todas sus terminaciones sinápticas dentro de la CPE. En anuros, se pueden dividir en dos subtipos atendiendo a la posición del núcleo (Rodieck, 1973):

- **Células horizontales externas.** Poseen un axón largo sin arborización terminal. Sinaptan tanto con conos como con bastones rojos (Witkovsky *et al.*, 1988a), y son análogas a las denominadas células H1 en otras clases de vertebrados.

- **Células horizontales internas.** De gran tamaño, no poseen axón, y tienen contactos sinápticos con bastones verdes y con conos (Ogden *et al.*, 1985). Posiblemente estén implicadas en la respuesta cromática (Stone *et al.*, 1990).

e) Células bipolares.

Como su nombre indica, estas neuronas cuyo núcleo se encuentra en la CNI, tienen una morfología bipolar, el árbol dendrítico se encuentran dirigido hacia la CPE donde se ramifica

- **Grandes subtipo I.** Árbol dendrítico tipo H, grande, simétrico y biestratificado. (Clase 3 de Pomeranz, 1972).

- **Grandes subtipos II y III.** Árbol dendrítico tipo T, muy amplio, monoestratificado y asimétrico que se ramifica en la parte más interna de la CPI (Tóth y Straznicky, 1989b). El axón se encuentra muy mielinizado (Straznicky *et al.*, 1990). (Clase 4 de Pomeranz, 1972).

Recientemente se ha descrito un subtipo de células ganglionares cuyas dendritas tienen contactos con las dos capas plexiformes (CPE y CPI), su número es reducido y su importancia fisiológica se desconoce (Tóth y Straznicky, 1989a).

La estructura estratificada de la retina se conserva en toda su extensión, pero la densidad celular varía. Los anuros terrestres poseen una banda desde el extremo temporal al nasal de la zona ecuatorial de la retina, denominada **banda visual**. Dicha zona tiene una densidad neuronal y de conos superior al resto de la retina, (Tsukamoto, 1987; Zhang y Straznicky, 1991). Se podría considerar una estructura análoga a la fovea de los primates, cuya función sería aumentar la agudeza visual facilitando la captura de presas vivas. Dicha banda visual no se observa en especies de anuros totalmente acuáticos, como en el género *Xenopus* (Zhu *et al.*, 1990).

1.2.2 IRRIGACIÓN DE LA RETINA.

La retina neural en los anuros es un tejido avascular (Miodoński y Bär, 1987). No obstante, su consumo de oxígeno es muy superior en comparación con otros tejidos nerviosos, lo cual supone la necesidad de un sistema vascular muy elaborado para abastecer los requerimientos respiratorios y de nutrientes. La vascularización de la retina es externa y tiene un componente doble (Miodoński y Bär, 1987):

- **La circulación coroidal.** Proporciona un flujo sanguíneo elevado, que mantiene un alto contenido de O₂ en los capilares coroidales, con lo cual se consigue un gradiente muy favorable a la entrada de O₂ en la retina. Este sistema se encarga de abastecer de O₂ y nutrientes la parte más externa de la retina neural, fundamentalmente los fotorreceptores.

- **El sistema hialoideo superficial (*membrana vasculosa retinae*).** Se trata de una red de capilares que discurre por la cara vitreal de la retina, en contacto con la MLI. El aporte sanguíneo de esta red capilar se lleva a cabo mediante un anillo arterial a altura de la *ora serrata* (arteria hialoidea), mientras que el drenaje se realiza mediante otro anillo venoso paralelo al anterior (vena hialoidea) y por una vena que recorre la parte ventral de la retina

profusamente. El axón se dirige en dirección opuesta hacia la CPI. En los anfibios anuros se han descrito dos subtipos morfológicos:

- **Células bipolares grandes (o externas)**. Con un campo dendrítico amplio, que desarrollan sinapsis con los conos y con los bastones rojos.
- **Células bipolares pequeñas (o internas)**. De menor tamaño. Estas células conservan el contacto con la superficie del neuroepitelio, característico de los neuroblastos embrionarios, también mantienen el cilio, denominándose a esta prolongación **filamento de Landolt**.

f) Células amacrinas.

Son interneuronas que no poseen un axón diferenciado, sus núcleos se disponen en la parte más interna de la CNI. Los árboles dendríticos se dispersan a la largo de la CPI.

En los anuros se han descrito varios tipos morfológicos distintos:

- **Difusas**. Con terminaciones distribuidas por toda la extensión de la CPI.
- **Estratificadas**. Cuyos terminales sinápticos se distribuyen exclusivamente en estratos concretos de la CPI.

g) Células interplexiformes.

Es el subtipo celular descrito más recientemente. El cuerpo celular y el árbol dendrítico son morfológicamente muy similares a los de las células amacrinas, pero se diferencian de ellas en la posesión de un axón que contacta con la CPE (Rayborn *et al.*, 1981), tanto con células bipolares como con células horizontales (Witkovsky *et al.*, 1988a).

h) Células ganglionares.

El árbol dendrítico se desarrolla en la CPI, pudiendo ser difuso o estratificado. Sus núcleos forman la CCG y sus axones forman el nervio óptico.

En anuros, la morfología de este tipo celular es muy variable dependiendo de la especie estudiada. Las clasificaciones se basan normalmente en el tamaño de cuerpo celular y la forma del árbol dendrítico (Frank y Hollyfield, 1987a; Straznický *et al.*, 1990).

- **Pequeñas**. Árbol dendrítico de pequeña extensión, sólo se han descrito en individuos adultos (Clase 1 de Pomeranz, 1972).
- **Medianas**. Árbol dendrítico tipo E, de tamaño mediano y difuso. (Clase 2 de Pomeranz, 1972).

(ramo venoso ventral). Ambos sistemas, arterial y venoso, abandonan el globo ocular a través del punto más ventral del cuerpo ciliar.

La arteria óptica, que en otros vertebrados penetra en la retina a través del nervio óptico y cuyos capilares discurren a través de la CPI, en anuros queda reducida a la irrigación del nervio óptico exclusivamente (Miodoński y Bär, 1987).

Como en el resto del sistema nervioso central, el paso de nutrientes desde la circulación sanguínea hacia las neuronas se encuentra regulado mediante una barrera (barrera hemato-retiniana). En la circulación coroidal, debido al hecho de que los capilares son de tipo fenestrado, dicha barrera queda constituida por los complejos de unión presentes en las superficies laterales del epitelio pigmentado, aunque no se descarta un papel de barrera de filtración selectiva de la membrana de Bruch debido a su elevada carga negativa (Pino *et al.*, 1982). Luego, los nutrientes llegan a los fotorreceptores pasando obligatoriamente a través del citoplasma de las células del epitelio pigmentado. La nutrición de los fotorreceptores se ve también facilitada debido al hecho de que la MLE formada por las prolongaciones de las células de Müller no posee *zona ocludens*.

Los capilares del sistema vascular hialoideo son de tipo continuo, presentando las células endoteliales uniones del tipo *mácula ocludens*. Las prolongaciones de las células de Müller en contacto con la MLI están unidas entre sí mediante complejos de unión con *zona ocludens*, lo que constituye la barrera hemato-retiniana para las neuronas de la parte interna de la retina (Miodoński y Bär, 1987).

1.3. Neuroquímica de la retina de anfibios.

La retina posee una serie de ventajas que merecen ser tenidas en cuenta como modelo experimental para desarrollar estudios funcionales del sistema nervioso. Posee varios tipos celulares anatómicamente y funcionalmente diferenciables, lo que permite el estudio de diversos sistemas de comunicación celular y de circuitos neuronales en este tejido. Es un tejido accesible lo cual permite la administración de fármacos específicos a través del humor vítreo, y además es adecuado para la microdissección, lo que facilita el aislamiento de tipos celulares concretos para su cultivo *in vitro*. Su estructura plana permite que este tejido pueda captar los nutrientes por simple difusión lo cual posibilita su cultivo, convirtiéndose así en un modelo inmejorable para estudios en neuroquímica (Daw *et al.*, 1989). Por último cabe destacar una característica específica de este tejido que acentúa su interés como objeto de estudio, su capacidad de fotorrecepción.

La comunicación intercelular en el sistema nervioso se lleva a cabo mediante mensajeros químicos, que pueden clasificarse en dos tipos distintos atendiendo a su función (Iuvone, 1986a):

- **Neurotransmisores.** Substancias liberadas en el terminal presináptico que se unen un receptor específico de la membrana postsináptica, que por lo general es un canal de iones (receptores Clase I; Strange, 1988). La unión del neurotransmisor provoca una respuesta electrofisiológica rápida, del orden de milisegundos. La eliminación del neurotransmisor debe ser también rápida, mediante degradación enzimática o por recaptura por parte del terminal presináptico.

- **Neuromoduladores.** Mensajeros químicos producidos por las neuronas fundamentalmente, o en algunos casos también por la glía, desarrollan una acción específica sobre las neuronas, al igual que los neurotransmisores, pero las respuestas son mucho más lentas. El receptor implicado es de la Clase II (Strange, 1988), y normalmente se encuentra acoplado a un miembro de la familia de proteínas G. La neuromodulación puede modificar los siguientes aspectos de la función nerviosa (Cooper *et al.*, (1991):

- En el terminal presináptico puede modificar la cantidad de neurotransmisor liberado, sintetizado o recapturado, o también puede afectar a la respuesta electrofisiológica de dicho terminal a un estímulo eléctrico.

- En el terminal postsináptico, puede modificar su sensibilidad frente a los neurotransmisores, alterando la densidad de los receptores o su afinidad mediante procesos de desensibilización e hipersensibilización. También puede modificar la respuesta electrofisiológica postsináptica.

La acción de los neuromoduladores puede llevarse a cabo a corta distancia mediante sinapsis típicas, o a una distancia mayor, en este caso el neuromodulador debe ser capaz de difundir entre las células del tejido nervioso (función paracrina).

En los últimos años, el conocimiento sobre los sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores de la retina de los vertebrados ha tenido un gran avance. A continuación describiremos brevemente el estado de conocimiento actual sobre los neuroquímicos asociados a cada tipo celular específico, poniendo especial atención en la retina de los anfibios.

a) **Células fotorreceptoras.**

Se han propuesto varios neuroquímicos como probables neurotransmisores y neuromoduladores del fotorreceptor:

- **Glutamato y Aspartato.**

El mayor número de pruebas experimentales apuntan hacia el glutamato como neurotransmisor principal del fotorreceptor (Daw *et al.*, 1989). Los fotorreceptores son capaces de recapturar Glu y Asp activamente del espacio extracelular mediante transportadores específicos. Además, los conos y bastones poseen una alta actividad aspartato aminotransferasa citoplasmática encargada de la síntesis tanto de Glu como Asp (Slaughter y Miller, 1983b).

La liberación de Glu tiene lugar de forma continua en oscuridad, deteniéndose ésta como respuesta a la iluminación debido a la hiperpolarización de la membrana del fotorreceptor. En anuros, esta liberación regulada por la luz ha sido demostrada en un estudio realizado por Miller y Schwartz (1983) en los fotorreceptores de *Bufo*.

- **Melatonina (MEL).**

Mientras que el Glu es considerado como el neurotransmisor principal del fotorreceptor responsable de la transmisión de la información luminosa al resto de las neuronas retinales, la MEL podría ser un neuromodulador sintetizado por los fotorreceptores para proporcionar una señal química difusible encargada de la regulación coordinada de los procesos de la adaptación de la retina a la oscuridad (ver apartado 2.5). La regulación de su síntesis y las funciones de este neuromodulador constituyen el objetivo principal de esta Memoria.

b) Células horizontales.

Las células horizontales se encuentran despolarizadas en oscuridad como consecuencia de la liberación de Glu por parte de los fotorreceptores. Estas células poseen en su membrana receptores glutamérgicos de los subtipos AMPA, kainato y quisqualato (Slaughter y Miller, 1983a, 1986; Yang y Wu, 1991).

El posible carácter GABAérgico de estas neuronas que demostrado por la presencia actividad Glu descarboxilasa (GAD) responsable de la síntesis de GABA (Iuvone, 1986a), así como la capacidad de capturar este aminoácido del espacio extracelular (Voaden *et al.*, 1974). Cabe destacar una característica de estas células inusual para una neurona, no acumulan neurotransmisores en gránulos de secreción, la liberación del neurotransmisor se lleva a cabo mediante un cotransporte con Na⁺ por medio de un transportador de membrana específico (Schwartz, 1982).

La función principal de las células horizontales es crear un lazo de retroalimentación negativa sobre los conos, la despolarización de los fotorreceptores (conos y bastones)

promueve la liberación de GABA de las células horizontales, que a su vez hiperpolariza exclusivamente a los conos (Stone *et al.*, 1990).

c) Células bipolares.

Todas las células bipolares responden al Glu de los fotorreceptores, sin embargo se pueden dividir en dos subclases atendiendo a los tipos de receptores glutaminérgicos y a su respuesta electrofisiológica frente al estímulo luminoso.

- **Bipolares OFF.** Se hiperpolarizan con la luz. Los agonistas glutaminérgicos del tipo NMDA despolarizan la membrana, indicando la existencia de este subtipo de receptor en estas células (Slaughter y Miller, 1983b).

- **Bipolares ON.** Se despolarizan con la luz. Estas células poseen una sinapsis inversora de signo, es decir, responden a la hiperpolarización del fotorreceptor provocada por la luz despolarizándose. Esta respuesta se debe a que poseen receptores glutaminérgicos del tipo APB (Slaughter y Miller, 1981).

d) Células amacrinas.

Se han descrito varios subtipos morfológicos de células amacrinas, y dicha heterogeneidad viene avalada por el gran número de neurotransmisores y neuromoduladores localizados en estas células.

- **Acetilcolina (AcCh).**

Un subtipo de células amacrinas, que morfológicamente se ha asociado al tipo estrellado (Daw *et al.*, 1989), posee la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis y degradación de la AcCh. Además, este tipo de neuronas es capaz de recapturar colina activamente (Iuvone, 1986a).

Tanto la luz como agentes despolarizantes (como el potasio) promueven la liberación de AcCh. Estudios electrofisiológicos demuestran que la AcCh modifica la respuesta de las células ganglionares a través de receptores de los tipos nicotínico y muscarínico (Iuvone, 1986a).

- **Dopamina (DA).**

Las células amacrinas dopaminérgicas representan el 2-5 % del total de este tipo celular (Nguyen-Legros y Savy, 1988). Morfológicamente se caracterizan por tener un cuerpo celular grande, con árbol dendrítico amplio, uniestratificado y distribuido fundamentalmente en la

parte más externa de la CPI, también presentan tirosina hidroxilasa en su citoplasma (Sarthy *et al.*, 1981; Zhu y Straznicky, 1990a).

Como en el caso de la AcCh, la luz y el potasio promueven la síntesis y liberación de DA por las células amacrinas (Iuvone, 1986a). Aunque en un principio se consideraron que sólo tenían sinapsis con otras células amacrinas, recientemente se han descrito ejemplos de contactos sinápticos entre células amacrinas conteniendo tirosina hidroxilasa y células bipolares y ganglionares (Gábrriel *et al.*, 1992b).

A la DA se le han asignado funciones de neuromodulador en la función visual, modificando la respuesta electrofisiológica de las células amacrinas AII glicinérgicas (Voigt y Wassle, 1987). Además, la DA actúa como factor paracrino.

- Adrenalina (A) y noradrenalina (NA).

Aunque se han descrito en la retina de teleosteos (Brujan *et al.*, 1989) y algunas especies de mamíferos (Osborne y Nesselhut, 1983), la existencia de células amacrinas adrenérgicas o noradrenérgicas en la retina de anfibios es un tema debatido, en la actualidad. Algunos autores consideran que la NA medida en la retina de algunas especies procede del sistema simpático, siendo la A el verdadero neurotransmisor de las neuronas adrenérgicas retinales (Hadjiconstantinou *et al.*, 1983).

- Serotonina (5-HT).

Células amacrinas serotoninérgicas se han descrito en varias especies de anuros (*Rana*, Gläsener *et al.*, 1988; *Xenopus*, Frederick *et al.*, 1989). Constituyen una población de células amacrinas dispuestas en la cara interna de la CNI, con un árbol dendrítico difuso y muy amplio (Zhu y Straznicky, 1990b). Análogamente al caso de la DA, a la 5-HT se le ha asignado un papel de neuromodulador en la retina interna, debido tanto a la morfología como por la densidad de las células serotoninérgicas. Interviene, mediante un proceso de retroalimentación positiva, en la transmisión nerviosa entre las células bipolares y las amacrinas (Brunken y Daw, 1987).

- GABA.

Es el aminoácido inhibitor más abundante en la CPI, demostrándose su existencia en células amacrinas (Gábrriel *et al.*, 1992a) tanto por la localización de la GAD (Brandon *et al.*, 1980), como por el sistema de recaptura de GABA (Voaden *et al.*, 1974). Las células amacrinas GABAérgicas parecen tener una importancia destacable dentro de la fisiología de la retina interna, son postsinápticas respecto a las células bipolares, con lo que la estimulación luminosa afecta directamente la actividad de estas células. Tienen contactos

presinápticos con células ganglionares del canal ON y otros tipos de células amacrinas (colinérgicas y dopaminérgicas fundamentalmente) sobre las que ejercen un papel de interneuronas inhibitorias (Yang et al., 1992).

- Glicocola (Gly).

El aminoácido inhibidor Gly está presente en un tipo específico de células amacrinas que son capaces de captar activamente este aminoácido del medio extracelular (Voaden *et al.*, 1974). Su función se relaciona con el procesamiento lateral de la información visual en la CPI, llevando acciones inhibitorias análogas a las células amacrinas GABAérgicas (Daw *et al.*, 1989).

- Neuropéptidos.

Se han descrito un gran número de neuropéptidos en las células amacrinas de los anfibios, como colecistocinina, somatostatina, sustancia P, Glucagón, VIP, etc (Yamada *et al.*, 1981; Yamada y Basinger, 1982; Eskay *et al.* 1980 y 1981; Hiscock y Straznicky, 1989 y 1990). Suelen localizarse en neuronas de cuerpo celular pequeño y de campo dendrítico ancho, uni- o biestratificadas (Hiscock y Straznicky, 1989 y 1990). Se les asigna un papel de neuromoduladores, modificando los niveles de AMPc intracelular (glucagón y VIP) así como la actividad eléctrica de las células ganglionares (sustancia P y encefalina) (Iuvone, 1986a).

e) Células interplexiformes.

Se han descrito células interplexiformes glicinérgicas para *Xenopus laevis* (Rayborn *et al.*, 1981). Dichas neuronas tienen principalmente contactos presinápticos con las células horizontales externas (Smiley y Yazulla, 1990), cuya función es despolarizar dicha células promoviendo la liberación de GABA (Smiley y Basinger, 1990).

Recientemente, se han descrito terminaciones dopaminérgicas en la CPE de células procedente de la CPI en anuros, indicando la posible existencia de células interplexiformes dopaminérgicas en estos animales (Gábríel *et al.*, 1991).

Las funciones atribuidas a las células interplexiformes están relacionadas con la actividad de las células horizontales.

f) Células ganglionares.

La mayoría de las células ganglionares presentan receptores NMDA en su membrana presináptica, recibiendo la aferencia de las células bipolares. No obstante, estas células

también reciben la aferencia de células amacrinas colinérgicas a través de receptores muscarínicos y nicotínicos (Iuvone, 1986a). En cuanto al neurotransmisor sintetizado y liberado por estas células en el sistema nervioso central parece ser mayoritariamente Glu, aunque también se han descrito neuronas colinérgicas y GABAérgicas en *Bufo* (Oswald *et al.*, 1979; Gábel *et al.*, 1992a), siendo estas últimas minoritarias con respecto a las glutaminérgicas.

1.4. Desarrollo ontogénico de la retina.

El desarrollo de la retina puede dividirse en dos etapas consecutivas, morfogénesis y citodiferenciación. Para cada uno de ambos procesos embriológicos se hará referencia a las tablas de desarrollo de Gosner, 1960 (G) y Nieuwkoop y Faber, 1967 (NF).

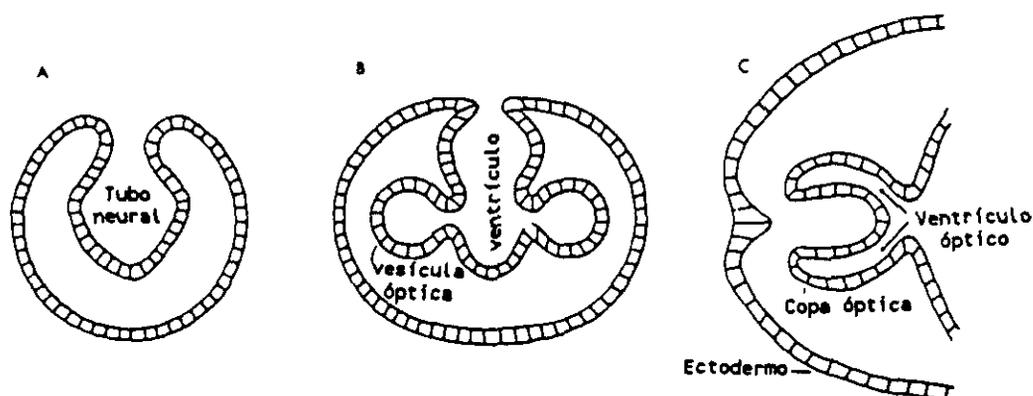
a) Morfogénesis.

La retina procede de una evaginación del tubo neural que formará la vesícula óptica primaria (16 G; 21 NF). El neuroepitelio de la vesícula sufre una invaginación secundaria para dar lugar a la fisura óptica que desaparecerá en estados posteriores (Grün, 1982), quedando definitivamente la forma de la copa óptica (19 G; 26-31 NF), (véase Ilustr. 4) (Rodieck, 1973).

La zona del ectodermo en contacto con la vesícula óptica sufre una invaginación que terminará aislándose del exterior formando la vesícula del cristalino (20 G; 33-34 NF). Alrededor de la copa óptica y del cristalino se forma una capa de tejido de origen mesodérmico que se transformará en la pared del globo ocular, del cual forman parte la esclerótica y la cornea.

Aunque en un principio se conserva la comunicación del ventrículo óptico con el ventrículo del cerebro, posteriormente, la aparición del nervio óptico colapsa dicha comunicación (21 G; 35 NF). El ventrículo óptico también resultará colapsado, quedando como resto del mismo la matriz interfotorreceptora.

Todo el proceso de morfogénesis de la vesícula óptica parece estar regulado por el ácido retinoico, ya que la administración de altas dosis de este morfógeno inhibe la formación de la copa óptica, aunque no logra detener la citodiferenciación, siendo posible identificar neuronas ganglionares y fotorreceptores en el ventrículo cerebral de los embriones sin ojos tratados con ácido retinoico (Manns y Fritsch, 1991).



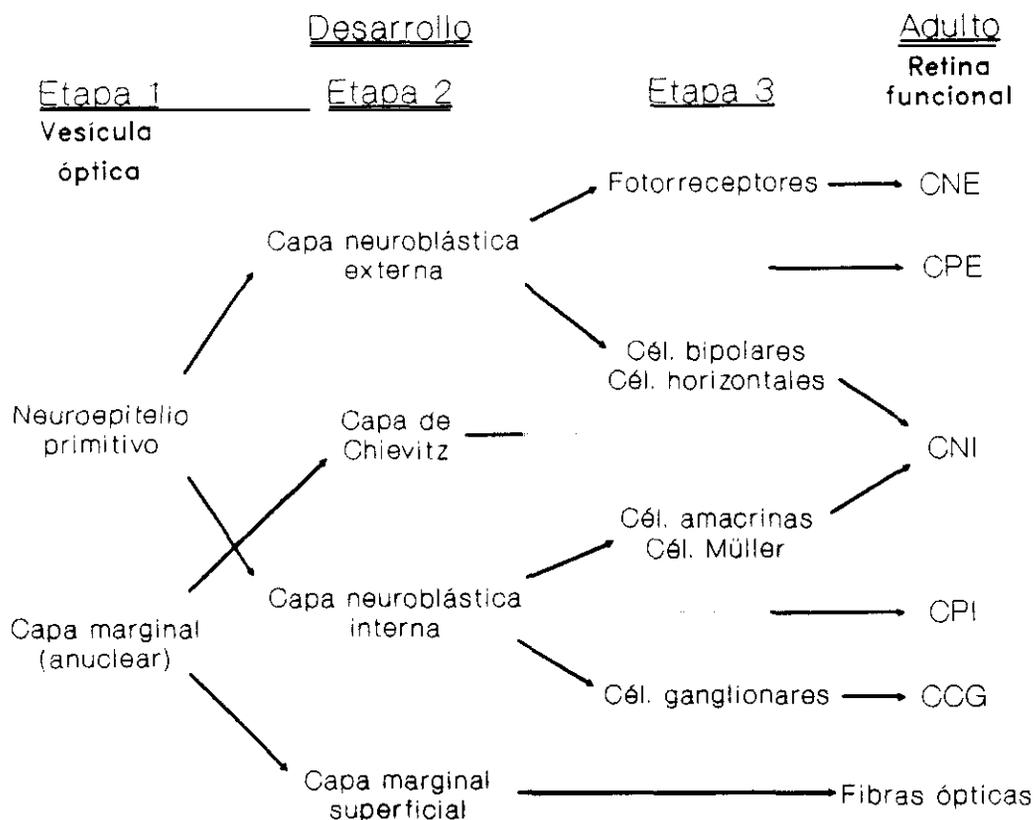
Ilustr. 4 Génesis de la vesícula óptica a partir del tubo neural embrionario (Rodieck, 1973).

b) Citodiferenciación.

En un principio tanto la pared interna como la externa del epitelio de la copa óptica son monoestratificados. La pared externa se diferenciará en el epitelio pigmentado. De este mismo tejido embrionario proceden también los epitelios del cuerpo ciliar y del iris del ojo adulto. La pared interna sufre una serie de mitosis para dar lugar a un neuroepitelio pluriestratificado formado por neuroblastos de cuya citodiferenciación posterior se originarán todos los tipos de neuronas retinianas. En la primera etapa se produce una migración de parte de los neuroblastos hacia el borde marginal del neuroepitelio dando lugar a la capa nuclear secundaria (o capa neuroblástica interna), quedando el resto de los neuroblastos en la parte más cercana del ventrículo (capa nuclear primaria, o capa neuroblástica externa), esta última capa conserva aún su capacidad de mitosis. Entre ambas capas se establece la capa transitoria de Chievitz.

En este momento del desarrollo (Estado 2, Ilustr. 5) la estructura en estratos es análoga a la corteza cerebral. Dicha disposición se conservará en la retina adulta de los ciclóstomos (Fritsch, 1991), aunque en el resto de los vertebrados sufrirá cambios importantes.

El proceso de citodiferenciación tiene lugar de forma progresiva comenzando desde la parte más interna y prosiguiendo hacia el ventrículo de la vesícula óptica. En primer lugar, la capa neuroblástica interna se diferenciará en células ganglionares, amacrinas y células de Müller. En una segunda etapa, la capa neuroblástica externa dará lugar a las células bipolares y células horizontales, y en último lugar se diferenciarán los fotorreceptores (Rodieck, 1973).



Ilustr. 5. Esquema de la citodiferenciación de la retina neural de vertebrados, desde el estado de vesícula óptica hasta la retina funcional.

La capa transitoria de Chievitz desaparecerá durante el desarrollo y los núcleos de las células amacrinas, horizontales, bipolares y de Müller formarán conjuntamente la CNI en el adulto. Las células de Müller se alargan ocupando el ancho de la retina neural, estas células sirven de sostén para la diferenciación del resto de neuronas.

La superficie del ventrículo óptico se encuentra tapizada por células endoteliales ciliadas, a partir de estos cilios se formarán los segmentos externos y dichas células se diferenciarán en fotorreceptores.

La superficie externa del tubo neural se encuentra recubierta por una lámina basal característica de todos los epitelios. Dicha estructura se conserva en la retina del adulto estando situada en la cara vitreal de la retina, en contacto directo con las prolongaciones de las células de Müller. Mientras que en la superficie externa formará parte de la membrana de Bruch (Hewitt, 1986).

El desarrollo ontogénico de la retina de *Xenopus* se conoce con detalle, pudiendo dividirse en etapas sucesivas, comentándose a continuación los sucesos más sobresalientes dentro de cada una de ellas (Grün, 1982):

1. **Estados 28-34.** Comienza la migración de las células ganglionares a su situación definitiva. El resto de las células terminan su proceso de mitosis excepto las precursoras de las células bipolares.
2. **Estados 35-37.** El axón de las células ganglionares se desarrolla, entrando en contacto con el techo óptico, mientras que el árbol dendrítico comienza su desarrollo. Finaliza la mitosis de las células bipolares. Se pueden distinguir ya las dos capas plexiformes. Indicios de síntesis de acetilcolina.
3. **Estados 37-38.** Árbol dendrítico de las células ganglionares completo. Se distingue la capa de células amacrinas. Se diferencia el segmento interno de los fotorreceptores. Las células horizontales desarrollan prolongaciones estableciendo sinapsis con los fotorreceptores. Aparecen los primeros discos del segmento externo. Primera identificación de GABA en las neuronas (Marc, 1986).
4. **Estados 39-40.** Se distinguen ya todas las capas retinianas. Los segmentos externos de los fotorreceptores ya están formados. Aparición del 11-cis retinal en la retina (Azuma *et al.* 1988 y 1990).
5. **Estados 41-43.** Fotorreceptores funcionales distinguiéndose entre conos y bastones. Sinapsis entre células bipolares y fotorreceptores. Respuesta electrofisiológica del nervio óptico a estímulos luminosos. Indicios de síntesis de catecolaminas.
6. **Estados 44-46.** Sinapsis entre células horizontales y bipolares. Al final de esta etapa se observa la liberación activa de DA en la CPI (Sarthy *et al.*, 1981).
7. **Estados 46-47.** Mielinización de los axones del nervio óptico. Las células horizontales desarrollan una respuesta electrofisiológica madura. Los fotorreceptores acumulan glucógeno.
8. **Estados 47-66.** Morfología y fotorrespuesta de la retina similar a la del adulto. Células ganglionares maduras.
9. **Modificaciones postmetamórficas.** Aparición del antagonismo centro-alrededor de los canales visuales ON Y OFF (Marc, 1986).

Este orden cronológico de la citodiferenciación de la retina se repite para otros anuros, aunque en las especies de anuros terrestres tienen lugar una serie de modificaciones postmetamórficas que no suceden en *Xenopus*, entre otras la aparición de la banda visual

especializada (Zhu *et al.*, 1990), asociada con una diferenciación tardía de un subtipo concreto de células ganglionares grandes (Frank y Hollyfield, 1987b).

El crecimiento postmetamórfico de la retina ocurre a lo largo de toda la vida del individuo, siempre por la adición concéntrica de nuevas neuronas a partir de la división de los neuroblastos existentes en la *ora serrata* (Burggren y Just, 1992). El crecimiento es simétrico respecto al nervio óptico en los anuros terrestres, pero en *Xenopus* es muy asimétrico (Straznický y Hiscock, 1984).

Durante la vida larvaria, el pigmento visual es la porfiropsina, formada por la proteína opsina unida al 3-deshidrorretinal (Vitamina A₂) para dar lugar a la porfiropsina con un máximo de absorción a una longitud de onda 30-50 nm más larga que la rodopsina, lo que parece ser una adaptación de los fotorreceptores al espectro luminoso existente en el ambiente acuático de las larvas. Durante la metamorfosis los pigmentos visuales sufren un cambio en el retinoide unido a la opsina que pasa a ser retinal (Vitamina A₁) formándose la rodopsina. El cambio de pigmento puede no llegar a ser total, por ejemplo los adultos de *R. catesbeiana* conservan porfiropsina en el tercio superior de la retina, pudiendo ser una adaptación a la caza de presas sumergidas en el agua (Reuter *et al.* 1971).

Durante la metamorfosis se producen también una serie de cambios morfológicos del ojo, las dos córneas que existieron durante toda la fase larvaria (la conjuntiva de origen ectodérmico y la cornea propiamente dicha de origen mesodérmico) se fusionan en una única estructura. El cristalino que tenía forma esférica se aplanan en las formas terrestres, para acomodar la visión al medio aéreo (Burggren y Just, 1992).

1.5. Neurofisiología de la retina. Fotorrecepción.

La fototransducción consta de una serie de procesos fotoquímicos, bioquímicos y electrofisiológicos mediante los cuales la absorción de un fotón por una molécula fotosensible dispara la cascada de sucesos que finalmente conducen a cambios en el potencial de membrana del fotorreceptor. Dicha célula se comporta, frente al estímulo, de forma contraria a las neuronas, en respuesta a la luz se hiperpolariza, mientras que las neuronas se despolarizan como respuesta al estímulo eléctrico. En oscuridad, que puede ser considerado como el estado de reposo (ausencia de estímulo), los fotorreceptores se encuentran despolarizados como consecuencia de tener abiertos sus canales de iones en la membrana.

a) Mensajeros intracelulares implicados.

En los bastones, la ausencia de una conexión entre los discos de los segmentos externos (parte fotosensible de la célula) y la membrana plasmática (donde se producen los movimientos iónicos) implica la existencia de un mensajero intracelular soluble que se encargue de la transducción de la señal entre estas dos estructuras celulares. El GMPc es considerado como el candidato más probable, tanto en los conos como en los bastones, para la regulación de los movimientos iónicos a través de la membrana, mediante la apertura de un canal específico para Na^+ y Ca^{++} activado por la unión del GMPc a la cara citoplasmática del canal (Pugh, 1987).

El calcio intracelular, puede ser considerado como otro mensajero intracelular que mediante modificaciones de sus niveles regula una serie de funciones como la sensibilidad del fotorreceptor, y la velocidad de recuperación del mismo tras la estimulación luminosa (Kaupp y Koch, 1992).

b) Absorción del fotón.

La opsina es una proteína transmembrana con un peso de 40 kDa, perteneciente a la superfamilia de receptores con 7 dominios de hélice α transmembranales. Dicha proteína está unida covalentemente a una molécula de 11-cis retinal, que es el grupo fotosensible del complejo denominado rodopsina (Rh). El primer paso tras la captura de un fotón es la isomerización del 11-cis retinal a trans retinal (metarrodopsina I) proceso que tiene lugar en un tiempo de 10^{-3} s. A continuación se producen una serie de cambios conformacionales en la parte proteica, dando lugar a la metarrodopsina II (Rh*), forma activada de la rodopsina, de corta vida media y capaz de activar a la siguiente proteína de la cascada visual, la transducina (T). La transducina es una proteína periférica de membrana perteneciente a la familia de proteínas G (ligantes de GTP) relacionadas con los sistemas de transducción de señales intracelulares (ej. AMPc y Ca^{++}). La transducina (T) está formada por tres subunidades (α, β, γ) de las cuales la subunidad α tiene un sitio de unión para nucleótidos de guanosina. La unión de la Rh* a la transducina favorece el recambio de una molécula de GDP por GTP (Chanbre y Deterre, 1989), con lo cual la subunidad α se separa del complejo de la transducina. Cada molécula de Rh* puede difundir dentro de la membrana de los discos activando cientos de moléculas de $T\alpha\beta\gamma$, lo que constituye un paso de amplificación de la señal de 10^2 - 10^3 veces (Chanbre y Deterre, 1989). El siguiente paso en el proceso de fototransducción se basa en la unión de la subunidad α de la transducina ($T\alpha$) a la

fosfodiesterasa de GMPc (PDE). Dicha enzima es también una proteína periférica de membrana compuesta por tres subunidades formando un tetrámero de la forma $PDE\alpha\beta\tau_2$ de las cuales τ es una subunidad inhibidora de la actividad enzimática, estando la capacidad catalítica situada en el dímero $PDE\alpha\beta$ (Takemoto y Cunnick, 1990). La activación de la PDE se basa en el secuestro de las subunidades τ por parte de la $T\alpha_{(GTP)}$ (Yamazaki, 1992), cuando ambas subunidades τ son retiradas, la actividad de $PDE\alpha\beta$ es máxima (Takemoto y Cunnick, 1990). La hidrólisis del GMPc por la $PDE\alpha\beta$ constituye otro paso de amplificación en la cascada visual, resultando un factor final de amplificación del proceso de fotorrecepción de 10^5 veces (Chambre y Deterre, 1989).

El descenso de la concentración de GMPc inducido por la luz provoca el cierre de los canales $Na^+ : Ca^{++}$ de la membrana del fotorreceptor, por lo que la célula se hiperpolariza (Bauer y Drechsler, 1992). En este momento, el intercambiador de $Na : Ca - K$ (Schnetkamp *et al.*, 1991) reduce las concentraciones de calcio intracelulares, es decir, secundariamente a la reducción del GMPc inducida por luz, el calcio intracelular también disminuye.

c) Terminación de la señal.

Existe una incongruencia entre la duración del proceso completo de fotorrecepción (0,5 s), y la desactivación espontánea de la metarrodopsina II (varios minutos), es necesario pues, la existencia de mecanismos específicos que aceleren este proceso de terminación de la señal.

En primer lugar, la desactivación de la rodopsina se lleva a cabo por la acción de otras dos proteínas presentes en el segmento externo, la rodopsina quinasa (Rh-K) que fosforila el dominio intracelular de la Rh^* , lo que favorece su unión a la arrestina (Arr, proteína reguladora específica), bloqueándose totalmente la activación de nuevas moléculas de transducina (Palczewski y Benovic, 1991).

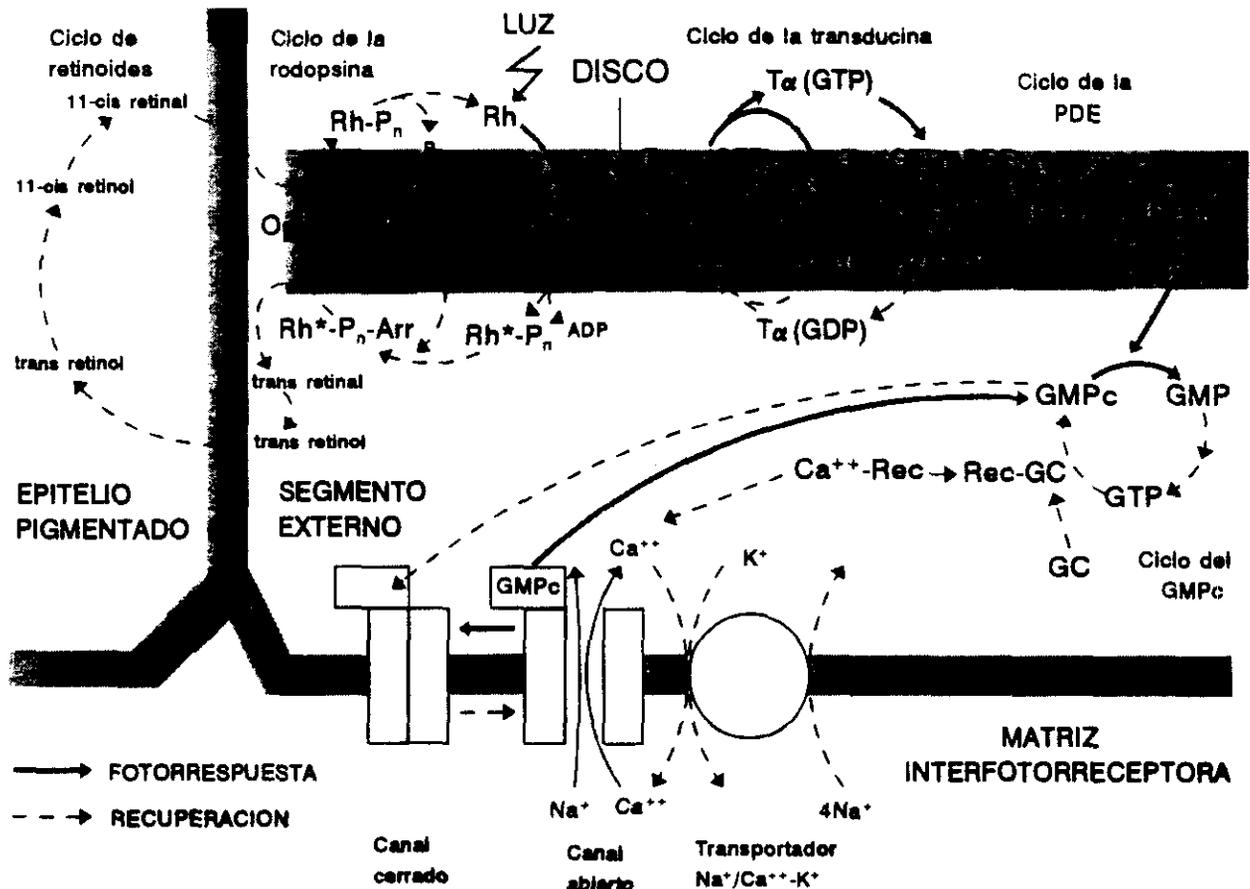
El siguiente paso es la desactivación de la $PDE\alpha\beta$, para lo cual se debe liberar la subunidad inhibidora τ del complejo $PDE\tau - T\alpha_{(GTP)}$. La $T\alpha$ posee una actividad GTPasa lenta. La reducción de los niveles de GMPc provocados por la $PDE\alpha\beta$ activan esta actividad GTPasa provocando la hidrólisis del GTP unido a ella (Arshavsky *et al.*, 1991). La forma $T\alpha_{(GDP)}$ se separa de la $PDE\tau$ que ahora puede formar el tetrámero inactivo $PDE\alpha\beta\tau_2$ (Yamazaki, 1992).

Por último, es necesario restaurar los niveles de GMPc intracelulares, la guanilato ciclasa (GC), proteína soluble del fotorreceptor, esta regulada por una proteína semejante a la calmodulina denominada recoverina (Rec) (Lambrecht y Koch, 1991; Pugh y Lam, 1990).

Tras el pulso de luz, el calcio intracelular se encuentra reducido debido a la acción del intercambiador iónico Na:Ca-K, en esta situación la recoverina se une a la GC activándola, restaurando así los niveles de GMPc. Por último, este nucleótido cíclico abre el canal Na⁺-Ca⁺⁺ de la membrana recuperando el estado inicial despolarizado de la célula (Kaupp y Koch, 1992) así como los niveles estacionarios de calcio.

d) Regeneración del pigmento visual.

En primer lugar, se produce la hidrólisis del grupo trans retinal de la metarrodopsina II fosforilada (Liebman *et al.*, 1987), que debe ser isomerizado a su forma 11-cis para poder ser reutilizado, dicha reacción tiene lugar en el epitelio pigmentado (Perlman, *et al.*, 1982).



Ilustr. 6. Ciclo visual de los fotorreceptores de vertebrados, incluyendo los procesos de respuesta a la luz y los mecanismos de recuperación tras el estímulo luminoso. Las abreviaturas vienen explicadas en el texto.

El trans retinal, que es inmediatamente reducido a trans retinol, abandona el fotorreceptor pasando a la matriz interfotorreceptora donde se une a la proteína

transportadora específica IRBP (proteína ligante de retinoides de la matriz interfotorreceptora) (Rayborn *et al.*, 1984; Okajima *et al.*, 1990). El trans retinol es captado rápidamente por el epitelio pigmentado, donde es isomerizado a 11-cis retinol. Dentro del epitelio pigmentado tanto el 11-cis retinol como el trans retinol puede almacenarse temporalmente en forma de ésteres con ácidos grasos. Por último, el 11-cis retinol sufre una oxidación para dar 11-cis retinal y en esta forma ser captado por el segmento externo. El lugar de esta oxidación no se conoce con exactitud, aunque parece ser que tiene lugar fuera del fotorreceptor (Okajima *et al.*, 1990).

Excepcionalmente, en anuros se propone la existencia de una vía rápida de regeneración del pigmento mediante una isomerasa situada en el fotorreceptor, que transforma el trans retinal directamente en 11-cis retinal, que es captado rápidamente por la opsina. No obstante, la cantidad de pigmento visual recuperado de esta forma parece ser mínima (Rodieck, 1973).

e) Diferencias en el proceso de fotorrecepción entre conos y bastones.

Las principales diferencias entre conos y bastones, estriban en la sensibilidad y en la rapidez de recuperación en ambos tipos de fotorreceptores, estas características posibilitan la visión bajo condiciones de iluminación muy distintas, como las que se dan durante el día o la noche.

Los bastones tienen una sensibilidad mucho mayor (visión escotópica o nocturna), poseen mayor superficie fotosensible para captar los fotones incidentes y la cantidad total de rodopsina por célula es muy superior. Además, existen sinapsis químicas entre los bastones, con lo cual se aumenta el campo efectivo de fotorrecepción (Wu, 1991), sumándose los impulsos eléctricos de cada uno de ellos.

Los conos están adaptados a la visión con iluminación elevada (visión fotópica o diurna), bajo la cual son capaces de responder muy rápidamente (5 veces más rápido que los bastones). Se ha propuesto al calcio como responsable de esta diferencia, al existir una conexión entre los discos y la membrana plasmática de los conos, hay una mayor superficie por la cual el calcio puede entrar y salir del segmento externo acelerando los cambios en los niveles intracelulares de Ca^{++} (Liebman *et al.*, 1987; Pugh, 1987).

f) Canales visuales.

La capa de fotorreceptores puede considerarse como un mosaico sobre el cual se crea la imagen por la alternancia de zonas claras y oscuras. La retina neural tiene como función

principal la integración de la información tanto espacial como temporal procedente de dicho mosaico, mientras que el sistema nervioso central se encargará de la interpretación de las imágenes recibidas de la retina.

La retina se puede dividir electrofisiológicamente en una serie de canales visuales, constituidos por el sistema sináptico fotorreceptor-célula bipolar-célula ganglionar, que se pueden clasificar en dos tipos atendiendo a su respuesta eléctrica a la luz (Schiller, 1992):

- Canal ON. Cuando las neuronas se despolarizan debido al impulso luminoso.
- Canal OFF. Cuando las neuronas se despolarizan en oscuridad.

La diferencia entre ambos tipos de canales se debe tanto a caracteres morfológicos como neuroquímicos de las células bipolares. Cada tipo de célula bipolar tiene un receptor glutaminérgico distinto, la célula bipolar OFF tiene en su membrana postsináptica receptores del tipo NMDA (excitatorio), es decir, la sinapsis es conservadora de la señal, en cambio la célula bipolar ON tiene receptores glutaminérgicos del tipo APB (inhibitorio). Este tipo de sinapsis es inversora de la señal, es decir la unión del agonista provoca la hiperpolarización de la membrana, inhibiéndose la transmisión del impulso eléctrico (Nawy y Jahr, 1991).

Los criterios morfológicos para distinguir los dos tipos de células bipolares se basan en la altura de sus terminaciones sinápticas dentro de la CPI. Las sinapsis de las células bipolares OFF tienen lugar en la mitad externa de la CPI (sublámina a). Mientras que, las células bipolares ON tienen sus contactos sinápticos con las células ganglionares más profundamente, en la sublámina b (mitad interna de la CPI).

La estructura en canales ON y OFF es la solución utilizada a lo largo de la evolución para la codificación de la información luminosa, el canal ON respondería específicamente a los puntos con luminosidad creciente, mientras que el canal OFF sería sensible a los puntos con luminosidad decreciente (Schiller, 1992).

2. MELATONINA OCULAR EN LOS VERTEBRADOS.

2.1. Síntesis de melatonina.

La ruta biosintética de MEL es común para todos los vertebrados estudiados (Binkley, 1981; Dodt y Meissl, 1982), tanto para la glándula pineal como para la retina (Zawilska y Nowak, 1992). Consta de cuatro actividades enzimáticas que actúan de forma sucesiva, siendo el precursor inmediato el triptófano circulante (Ilustr. 7). Las dos primeras enzimas

son comunes a la ruta de síntesis de 5-HT, mientras que las dos últimas se encuentran específicamente en los órganos que pueden sintetizar este metoxindol, fundamentalmente la glándula pineal y la retina.

Hemos subdividido el estudio de la síntesis de melatonina en la retina en varias partes atendiendo al conocimiento actual de cada una de ellas.

2.1.1 SÍNTESIS DE SEROTONINA A PARTIR DE TRIPTÓFANO.

Debido a la escasez de referencias específicas para la retina, nos hemos basado en los estudios llevados a cabo sobre la glándula pineal, fundamentalmente para los datos concernientes a las características enzimáticas, suponiéndose que tales propiedades generales deben ser similares para estos dos órganos (Weichmann, 1986).

El triptófano, amino ácido esencial precursor de la MEL, procede de la dieta y es distribuido por la circulación hasta la retina (Pang y Allen, 1986). La captación del triptófano se lleva a cabo a través del transportador de membrana de aminoácidos aromáticos. Dicho transportador posee una afinidad de 60 μM para el Trp (Redburn y Mitchell, 1989), en la retina de pollo se ha descrito una elevación significativa en la concentración de triptófano coincidiendo con la noche (Siuciak *et al.*, 1992).

a) Triptófano hidroxilasa.

La L-triptófano, tetrahidropterina:oxígeno oxidorreductasa 5-hidroxilante (TPH) (EC.1.14.16.4) se encuentra emparentada molecularmente con otras hidroxilasas de aminas aromáticas presentes en el sistema nervioso, como la tirosina hidroxilasa o la fenilalanina hidroxilasa (Cooper *et al.*, 1991). Estas analogías se extienden también a su localización celular en la matriz mitocondrial, al tipo de cofactor que utilizan (tetrahidrobiopteridina) y a los sistemas de regulación de su actividad. El pH óptimo para la actividad enzimática se encuentra entre 7,7 y 8, que coincide con el pH mitocondrial (Roos y Baron, 1981). Para la glándula pineal de mamíferos se han descrito las siguientes constantes cinéticas: 16-100 μM para el triptófano y 5-40 μM para el cofactor (King y Steinlechner, 1985), desconociéndose hasta el momento su valor para la retina. En condiciones *in vivo*, puede considerarse que esta enzima se encuentra saturada por el O_2 debido a su alta afinidad por el mismo. Estudios llevados a cabo sobre la capacidad sintética de 5-HT en la retina de *Xenopus* parecen indicar que la triptófano hidroxilasa trabaja a concentraciones saturantes de triptófano (Cahill y

Besharse, 1990), lo cual indicaría un posible papel de esta enzima como regulador de flujo de la ruta.

Su regulación parece llevarse a cabo mediante varios mecanismos que difieren en su velocidad de actuación:

1. Fosforilación de la enzima preexistente mediante proteínas quinasas, que produciría un incremento de la actividad (McLennan y Lees, 1978). Dicha fosforilación puede llevarse a cabo mediante la PKA (Makita *et al.* 1990) o la PK(Ca⁺⁺/CM)II (Sawada y Nagatsu, 1988), con lo cual queda implicado tanto el sistema de mensajeros intracelulares del AMPc como el del Ca⁺⁺ intracelular.
2. Estimulación de la síntesis *de novo* de la TPH. Se sabe que esta enzima presenta un ritmo diario en su actividad en la glándula pineal de los mamíferos, mostrando el máximo durante la noche (Shibuya *et al.*, 1978), pero hasta hace pocos años no se han obtenido datos relativo a dicho ritmo en la retina.

Se han descrito variaciones diarias en su actividad, incrementándose en unas 4,4 veces en la retina de *Gallus* durante la noche, dependiendo dicho ritmo diario de la síntesis de proteínas *de novo* (Thomas y Iuvone, 1991). Parece ser que la regulación de la expresión génica través de AMPc es la responsable final de la aparición de dicho ritmo (Ehret *et al.*, 1991). Como consecuencia de la actividad rítmica de la TPH, y aunque los niveles endógenos de 5-hidroxitriptófano son difíciles de estudiar debido a su baja concentración, en la retina de *Gallus* este indol muestra una oscilación diaria con valores superiores durante la noche (Thomas y Iuvone, 1991; Siuciak *et al.*, 1992).

b) 5-hidroxitriptófano descarboxilasa.

La L-aminoácido aromático carboxilasa (AAAD) (EC.4.1.1.28), no ha sido estudiada en la retina pero si extensamente en la glándula pineal. Tiene una localización citoplasmática, con un pH óptimo para su actividad entre 7,5 y 8. Utiliza como cofactor piridoxal 5-fosfato, interviniendo en la síntesis de varias monoaminas cerebrales (catecolaminas fundamentalmente) dado el amplio número de posibles aminoácidos aromáticos sobre los que puede actuar.

La alta actividad de esta enzima provoca que el 5-hidroxitriptófano se mantenga en concentraciones bajas en la glándula pineal (5-20 μ M; King y Steinlechner, 1985), similares a los valores de la Km (5-16 μ M; Cooper *et al.*, 1991), no siendo, por lo tanto, una enzima

limitante en la ruta biosintética. No parece presentar un ritmo diario, aunque puede tener cambios a largo plazo como respuesta a la iluminación ambiental (Klein *et al.*, 1981).

2.1.2 REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE SEROTONINA.

El análisis de los niveles de 5-HT en la retina es complejo debido al hecho de que la retina de los vertebrados posee neuronas serotoninérgicas en la CNI, salvo la retina de rata que posee un número reducido de dichas neuronas (Redburn y Mitchell, 1989). Este hecho imposibilita identificar la fracción de la 5-HT que actúa como neurotransmisor de la que es precursora de la melatonina.

Los estudios sobre la evolución diaria de la concentración total de esta indolamina en la retina dan resultados contradictorios. En el ratón se han descrito niveles de 5-HT 2,5 veces más elevados durante el día (Baker y Hoff, 1978), y en la retina de rata la luz estimula la acumulación de 5-HT en los fotorreceptores (Redburn y Mitchell, 1989). Estos trabajos apoyan la existencia de un ritmo diario de 5-HT similar al descrito para la glándula pineal (Mahapatra *et al.*, 1986; Vivien-Roëls *et al.*, 1979). En cambio, en la retina de pollo aparece el caso contrario, mostrando un máximo en su contenido durante la noche (Ehinger y Rose, 1988).

En el fotorreceptor, además de la síntesis endógena de 5-HT a partir del triptófano, no se puede excluir una posible contribución de la 5-HT de origen extrafotorreceptor como una fuente alternativa (Zawilska y Nowak, 1992), en base a la existencia de un eficaz sistema de captura de esta monoamina (afinidad aparente del transportador $0,2 \mu\text{M}$, Redburn y Mitchell, 1989).

La monoamino oxidasa (MAO; amina:oxígeno oxidoreductasa, desaminante, conteniendo flavina E.C.1.4.3.4) se localiza en la membrana externa mitocondrial de las neuronas monoaminérgicas. En la retina de bóvidos, la 5-HT es oxidada exclusivamente por la MAO tipo A, presentando una K_M elevada para la 5-HT ($113 \mu\text{M}$, Fernández de Arriba *et al.*, 1991), lo que indica que dicha enzima solamente puede regular activamente los niveles de 5-HT cuando éstos sean elevados, mientras que su papel sería despreciable en el momento del ciclo diario en el que sus niveles estén reducidos.

2.1.3 SÍNTESIS DE MELATONINA A PARTIR DE SEROTONINA.

a) Arilalquilamina N-acetiltransferasa.

La Acetil CoA:arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT; E.C.2.3.1.87) es una enzima citoplasmática (Klein y Weller, 1970) con pH óptimo de 6,5-6,8. Posee una K_M para la 5-HT inferior a otras enzimas de la ruta, lo cual apoya su papel como enzima reguladora de la síntesis de MEL.

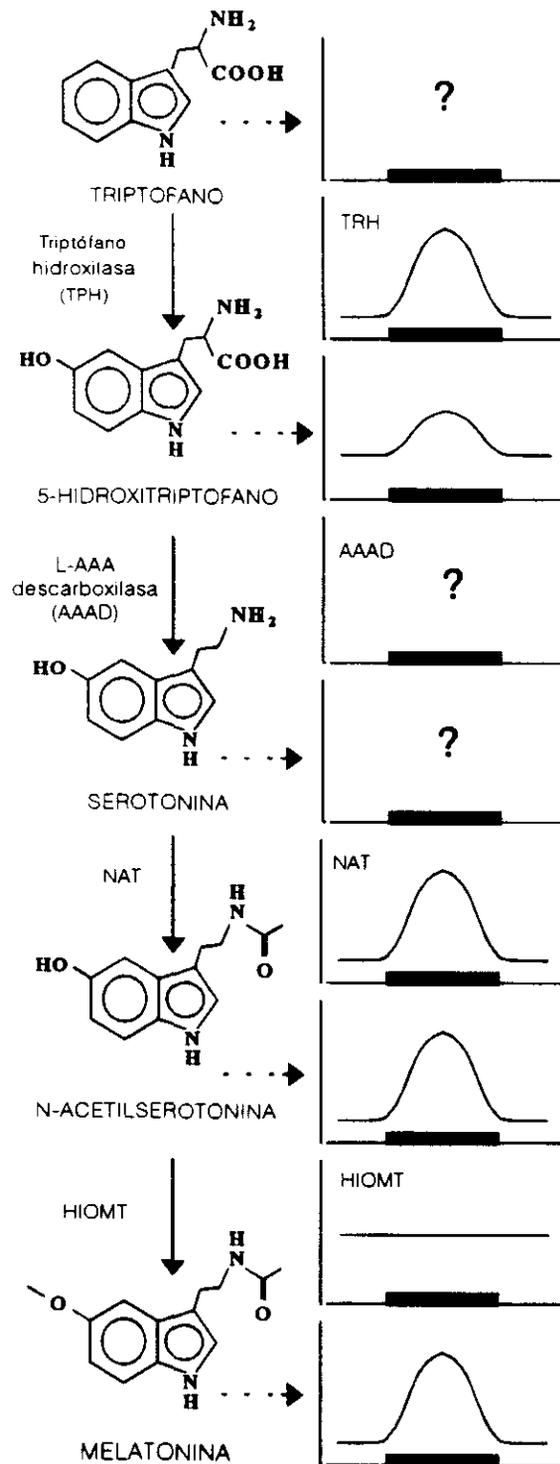
Se han demostrado oscilaciones diarias en la actividad AA-NAT en la retina de un gran número de vertebrados (anfibios, Besharse y Iuvone, 1983; aves, Binkley *et al.*, 1979; Hamm y Menaker, 1980; Zawilska y Iuvone, 1989 y mamíferos, Miller *et al.*, 1980; Nowak *et al.*, 1988; Olcese y Moller, 1989), alcanzándose niveles significativamente más altos durante la noche que durante el día. En la glándula pineal se ha demostrado que esta oscilación no se debe a modificaciones en sus características cinéticas (Chan y Ebadi, 1980) sino a cambios en la cantidad de enzima.

Como consecuencia de la acción rítmica de la NAT, la concentración de su producto (N-acetilserotonina) muestra un perfil rítmico paralelo al de la actividad NAT en la retina (Pang *et al.*, 1981 y 1983).

b) Hidroindol-O-metiltransferasa.

La S-adenosil-1-metionina: N-acetilserotonina O-metiltransferasa (HIOMT; E.C.2.1.1.4) es una enzima citoplasmática (Cardinali y Wurtman, 1972) con un pH óptimo entre 7,5 y 8 (King y Steinlechner, 1985), que además de la N-acetilserotonina es capaz de metilar otros 5-hidroindoles, utilizando como donador de acetilos la S-adenosil-metionina. Las constantes cinéticas (K_M) de la retina de *Rana pipiens* para la acetilserotonina y para el cofactor son 8,5 μM y 7,8 nM, respectivamente (Eichler y Moore, 1975). En condiciones *in vivo* la enzima se encuentra saturada por el cofactor debido a la alta concentración de éste en la célula (0,1 mM; King y Steinlechner, 1985), muy superior al valor de su K_M . De forma análoga a lo que sucede con la AAAD, la alta actividad de la HIOMT enzimática determina que no sea un paso limitante en la síntesis de MEL, manteniendo siempre muy bajos los niveles de su principal sustrato (N-acetilserotonina).

La HIOMT no muestra una oscilación rítmica día-noche (Wainwright 1979; Gern *et al.*, 1984) en la retina. En la glándula pineal de mamíferos se han descrito cambios a largo plazo, reduciéndose dicha actividad considerablemente como consecuencia de largos períodos de luz continua (Sugden y Klein, 1983). También se han descrito cambios estacionales en la glándula pineal (Balemans *et al.*, 1981).



Ilustr. 7. Síntesis de la melatonina en la retina de los vertebrados, incluyendo las oscilaciones cíclicas día-noche de las actividades enzimáticas e indoles intermedios.

En resumen, la producción de metoxindoles por la HIOMT *in vivo* sigue la ley de

acción de masas, es decir, depende exclusivamente de la concentración de los substratos y de su afinidad por la enzima (Morton, 1987b).

c) Localización de la síntesis de melatonina.

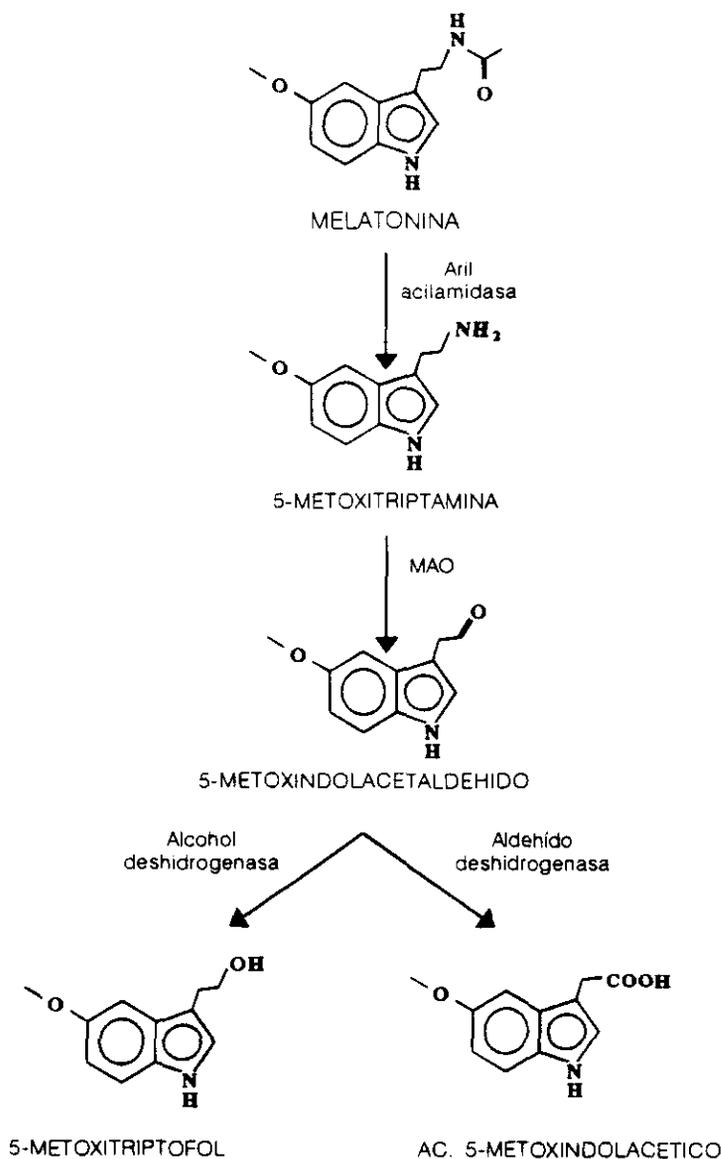
En cuanto a la localización de la síntesis de MEL dentro de la retina, existen una serie de pruebas que indican que se produce enteramente en el cuerpo celular de los fotorreceptores. Estas células son capaces de acumular 5-HT (Redburn y Churchill, 1987), habiéndose descrito las actividades enzimáticas específicas (NAT y HIOMT) en esta capa celular (Wiechmann *et al.*, 1985; Wiechmann y Hollyfield, 1989; Iuvone *et al.*, 1990). Además, se ha localizado la MEL por inmunohistoquímica en estas células (Bubenik *et al.*, 1976; Vivien-Roëls *et al.*, 1981). Por último, en estudios *in vitro* utilizando células de retinoblastoma humano (Y79), que derivan de la línea celular de los conos (Bogenmann *et al.*, 1988), se ha demostrado que son capaces de expresar NAT y HIOMT en cultivo (Kyritsis *et al.*, 1987; Janavs *et al.*, 1991).

2.2. Degradación de la melatonina.

La MEL es metabolizada siguiendo varias vías distintas dependiendo de su origen. La MEL periférica es catabolizada principalmente en el hígado, donde sufre una hidroxilación en la posición 6 del anillo indólico, y una posterior conjugación con grupos sulfato o ácido glucurónico, aumentando así su solubilidad en medios acuosos. Estos compuestos se excretan por la orina (Reiter, 1984; Arendt, 1985) de forma rápida, siendo su vida media en el plasma de los mamíferos de unos 20 minutos (Gibbs y Vriend, 1981).

La liposolubilidad de la MEL favorece su liberación directa desde los órganos productores a la circulación sin pasar por una etapa de almacenamiento previa (Redburn y Mitchell, 1989). Esta hipótesis viene corroborada por el alto coeficiente de permeabilidad de la MEL, cuyo paso a través del epitelio pigmentado sería por difusión simple (Pautler y Hall, 1987). Según la literatura consultada, en algunas especies esta contribución de la MEL ocular a la total circulante puede llegar a ser importante dependiendo de determinadas circunstancias (Yu *et al.*, 1981; Underwood *et al.*, 1984; Pang, *et al.*, 1987; Delgado y Vivien-Roëls, 1989) mientras que otros trabajos indican que es metabolizada en su totalidad de forma intraocular (Cahill y Besharse, 1989).

La degradación rápida de la MEL dentro del ojo ha sido descrita en varias especies de vertebrados (Cahill y Besharse, 1989; Grace *et al.*, 1989; Nowak, 1990). Se lleva a cabo



Ilustr. 8. Catabolismo de la melatonina en la retina de los vertebrados.

mediante varias etapas sucesivas (ver Ilustr. 9), que incluyen una desacetilación de la MEL mediante la arilacilamidasa (aril-acilamida amidohidrolasa, E.C. 2.5.2.13) y una posterior desaminación oxidativa de la 5-metoxitriptamina mediante la MAO. Por último, el 5-metoxindolacetaldehído resultante puede sufrir una oxidación o una reducción, dando lugar al ácido 5-metoxindolacético o 5-metoxitriptofol, respectivamente, metabolitos finales de la degradación de la MEL en el ojo.

2.3. Regulación de la síntesis de melatonina.

2.3.1 Regulación endógena.

Una oscilación diaria en la MEL sintetizada por la retina ha sido demostrada en varios grupos de vertebrados: anfibios (Besharse y Iuvone, 1983; Delgado y Vivien-Roëls, 1989), aves (Hamm y Menaker, 1980; Underwood *et al.*, 1984), y mamíferos (Pang *et al.*, 1980 y 1983). En estos trabajos se señala el estrecho paralelismo entre MEL y NAT, siendo considerada esta enzima como el paso limitante de la síntesis del metoxindol.

La regulación intracelular de la actividad NAT está íntimamente ligada a los niveles de AMPc intracelulares, el incremento de los mismos tiene como consecuencia dos efectos, una estimulación de la síntesis *de novo* de la NAT a través de un incremento de su expresión génica (Iuvone y Besharse, 1983; Wiechmann, 1986), y una estabilización de la enzima preexistente (Janavs *et al.*, 1991).

Los tratamientos farmacológicos que incrementan el AMPc, como puede ser la activación de la adenilato ciclasa por forskolín o la inhibición de las fosfodiesterasas por IBMX, también tienen como consecuencia un incremento de la NAT (Iuvone y Besharse, 1983; Iuvone *et al.* 1990) y de la MEL (Pierce *et al.*, 1989). La utilización de análogos no hidrolizables del AMPc que pueden permear las células también provoca el mismo tipo de respuesta, estimulando tanto la NAT (Iuvone y Besharse, 1986a) como la MEL (Pierce *et al.*, 1989) en la retina.

La estimulación de la adenilato ciclasa en las células eucariotas puede realizarse mediante varias vías alternativas: estimulación directa por medio de las proteínas G (Neer y Clapham, 1988) acopladas a receptores de membrana de la superfamilia de la rodopsina y del receptor β -adrenérgico (Janssens, 1987), o indirectamente mediante componentes del sistema de mensajeros intracelulares fosfatidilinositol-calcio. En el caso de los fotorreceptores de la retina, parece ser que la estimulación de la adenilato ciclasa en oscuridad depende de los niveles de calcio intracelular: mientras que la adición de inhibidores de canales de calcio dependientes de voltaje o la omisión de este catión en el medio de cultivo reduce de forma importante la NAT (Iuvone y Besharse, 1986b), la entrada de calcio a través de la membrana estimulada por la despolarización con potasio eleva los niveles de AMPc (Iuvone *et al.*, 1991) y la actividad NAT (Avendano *et al.*, 1990).

En resumen, la síntesis de MEL ocular podría estar regulada mediante mecanismos que dependen del calcio y AMPc como mensajeros intracelulares. En los pinealocitos de mamíferos el papel del calcio está subordinado a la estimulación mediada por receptores β -adrenérgicos (Ho *et al.*, 1992), en cambio en los fotorreceptores de la retina, el incremento

del AMPc debe estar precedido por una entrada de calcio extracelular al citoplasma (Avendano *et al.*, 1990).

La primera enzima de la ruta de síntesis de MEL, la TPH, presenta en la retina de *Gallus* las mismas propiedades que la NAT en cuanto a su ritmicidad y a su sensibilidad a los inhibidores de síntesis de proteínas (Thomas y Iuvone, 1991), sugiriéndose que probablemente el ritmo de MEL ocular en esta especie dependa de la regulación conjunta de ambas enzimas de la ruta (TPH y NAT).

2.3.2 REGULACIÓN AMBIENTAL.

a) Efecto de la luz y el fotoperíodo.

Está demostrado que la MEL ocular (Cahill y Besharse, 1990) y dos enzimas de su ruta sintética, la NAT (Hamm y Menaker, 1980; Iuvone y Besharse, 1983) y la TPH (Thomas y Iuvone, 1991) presentan un ritmo circadiano que puede mantenerse en oscuridad constante con un período aproximado de 24 horas. Además, esta ritmicidad es anulada por el efecto directo de la luz (MEL: Reppert y Sagar, 1983; Pang *et al.*, 1982 y 1985; NAT: Iuvone y Besharse, 1983; Nowak y Zurawska, 1989; Nowak, 1990; Hamm *et al.*, 1983; TPH: Thomas e Iuvone, 1991).

La influencia de la longitud del fotoperíodo sobre el carácter rítmico de la síntesis de melatonina en la glándula pineal ha sido ampliamente estudiado en los vertebrados: (peces: Duston y Bromage, 1989; Kezuka *et al.*, 1988, reptiles: Underwood, 1985; Vivien-Roëls *et al.*, 1988, aves: Zeman y Illnerová, 1988 y mamíferos: Arendt *et al.*, 1981; Darrow *et al.*, 1986; Brainard *et al.*, 1982; Steinlechner *et al.*, 1987; Iason y Ebling, 1989; Ravault *et al.*, 1986). Sin embargo el número de trabajos realizados sobre la melatonina ocular es mucho menor, restringiéndose sólo a los anfibios (*R. perezii*: Delgado y Vivien-Roëls, 1989) y aves (*Coturnix coturnix*: Underwood y Siopes, 1985). En todos ellos se ha demostrado una relación directa entre la extensión de la fase oscura y la duración del pico nocturno de melatonina, no modificándose ni la altura del máximo nocturno de melatonina ni las pendientes del pico como consecuencia del fotoperíodo.

b) Efecto de la temperatura.

La respuesta de ritmo de MEL a los cambios de temperatura ha sido mucho menos estudiada, centrándose fundamentalmente en la glándula pineal. En poiquilotermos existe una correlación positiva entre la temperatura ambiental y la amplitud máxima del pico de MEL

(Vivien-Roëls et al., 1979, 1988; Firth *et al.*, 1989 M-548; Rawding y Hutchison, 1992), desapareciendo el ritmo a temperaturas bajas (*Anolis*, Underwood y Calaban, 1987). Con respecto a la MEL de la retina, parece ser que muestra una respuesta similar a la variación de temperatura en *R. perezii* (Delgado y Vivien-Roëls, 1989).

Esta inhibición del pico de melatonina parece ser una consecuencia directa de la temperatura baja, ya que también se da en los mamíferos hibernantes (*Marmota*: Florant *et al.*, 1984; hámster: Darrow *et al.*, 1986; Vanecek *et al.*, 1984). En cambio, en aves que no entran en hibernación, se produce un aumento de la MEL ocular como respuesta al frío (Lee *et al.*, 1989).

La interacción de la luz y la temperatura se pone de manifiesto, cuando ambos factores oscilan independientemente, en *Anolis* se ha demostrado que la aparición del pico de MEL tiene lugar durante la oscuridad, o en su lugar, en la fase fría del termociclo, siendo este último factor tan eficaz que sólo una oscilación de 2°C pueden desencadenar el pico de melatonina en condiciones de iluminación constante (Underwood y Calaban, 1987). Este efecto del termociclo también se ha demostrado en otras especies, normalmente la temperatura alta durante la noche anula totalmente el pico nocturno, en cambio un descenso moderado de la temperatura coincidiendo con la fase oscura aumenta la síntesis de MEL en este período (Zachmann *et al.*, 1991; Firth y Kennaway, 1989).

No hay que olvidar que la MEL es fundamentalmente un mensajero químico que integra la información ambiental regulando funciones cíclicas en los vertebrados. En los mamíferos se han propuesto una serie de hipótesis para tratar de indicar qué componente del ritmo de melatonina codifica la información temporal (Reiter, 1991).

- **Hipótesis de la duración.** Partiendo de la base de que la duración de los niveles elevados de melatonina que se corresponden con la extensión de la noche, los órganos diana recibirían entonces una información puramente temporal. Una serie de pruebas experimentales, basadas en la simulación del ritmo endógeno de MEL mediante infusión intravenosa de melatonina en animales pinealectomizados, apoyan esta hipótesis (Reiter, 1991).

- **Hipótesis de la coincidencia interna.** El órgano diana tiene una variación diaria en su sensibilidad a la melatonina, luego la melatonina sólo actúa eficazmente si los niveles elevados de este metoxindol coinciden con la ventana temporal de sensibilidad máxima del órgano diana. La duración total del pico nocturno de melatonina tendría una importancia secundaria. Apoyándose en esta hipótesis se ha tratado de explicar la existencia de períodos refractarios al fotoperiodo en algunos mamíferos (Reiter *et al.*, 1979).

- **Hipótesis de la amplitud.** Según esta hipótesis, la acción de la melatonina depende de su concentración, como en la mayoría de los sistemas hormonales de los vertebrados. Hay pocas evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis.

2.4. Funciones oculares de la melatonina.

La retina presenta una serie de mecanismos de adaptación frente a los cambios de intensidad luminosa para conservar su funcionalidad durante todo el ciclo diario y anual (Wu, 1991). Dichos mecanismos están regulados de forma endógena mediante neuromoduladores retinales. Entre ellos la MEL tiene un papel central, coordinando la sucesión temporal de dichos mecanismos así como, regulando la síntesis de los otros neuromoduladores encargados de esta misma función.

Se han descrito receptores específicos para MEL en la retina de rana, situados concretamente en la CPI (Wiechmann y Wirsig-Wiechman, 1991). No obstante, la gran mayoría de los trabajos describen los receptores de MEL en distintas regiones del sistema nervioso central de mamíferos (Krause y Dubocovich, 1991) y en la hipófisis (Morgan *et al.*, 1991), lo que hace suponer un extenso espectro de acciones de este metoxindol, tanto oculares como extraoculares. Aparte de su localización, se conoce poco sobre la naturaleza de los receptores y los sistemas de segundos mensajeros implicados en la respuesta, la mayoría de los trabajos apuntan hacia receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de la rodopsina (Morgan *et al.*, 1991), y que estarían acoplados negativamente a la AC, modificando también la entrada de calcio extracelular en las células dianas, como se ha demostrado en los melanóforos, y en las células dopaminérgicas de la retina (Krause y Dubocovich, 1991) y del cerebro (Zisapel *et al.*, 1985).

2.4.1 SISTEMA DOPAMINA-MELATONINA.

Se ha propuesto que la DA de la retina actuaría como factor paracrino, debido a la ausencia de contactos sinápticos entre las neuronas dopaminérgicas situadas en la CPI y sus correspondientes células diana de la retina externa (células horizontales, fotorreceptores y epitelio pigmentado). En apoyo de esta hipótesis, se ha demostrado que la degradación de la DA se lleva a cabo exclusivamente de forma intracelular en las neuronas monoaminérgicas (ausentes en la retina externa), y además la retina muestra una alta concentración de ácido ascórbico que reduce su oxidación espontánea (Witkovsky y Schütte, 1991).

El paso limitante en la síntesis de DA es la primera enzima de la ruta, la tirosina hidroxilasa (TH) (L-tirosina tetrahidropterina: oxígeno oxidoreductasa, E.C.1.14.3). Esta enzima hidroxila la tirosina dando lugar a L-DOPA, a continuación la L-DOPA sufre una descarboxilación por la AAAD para dar lugar a la DA. Las analogías con la síntesis de 5-HT implican tanto a la TH, estrechamente emparentada con la TPH, como a la AAAD, que es común para ambas rutas biosintéticas (Iuvone, 1986a).

La regulación de los niveles de DA se realiza mediante procesos que implican tanto su síntesis como su liberación. El número de neuroquímicos que ejercen control sobre el sistema dopaminérgico es muy amplio, tanto con acciones estimuladoras como inhibitoras. La AcCh, sustancia P, α -MSH y la 5-HT (procedentes de células amacrinas) estarían entre los agentes activadores de la síntesis y liberación de DA, mientras que las acciones inhibitoras estarían desarrolladas por GABA, adrenalina (mediante receptores α_2) y péptidos opiáceos (Iuvone, 1986a), concretamente, la inhibición mediada por GABA ha sido ampliamente estudiada (Kamp y Morgan, 1981; O'Connor *et al.*, 1986), proponiéndose una liberación tónica de este aminoácido que inhibiría las células dopaminérgicas durante la oscuridad. En luz, desaparecida esta inhibición, la DA sería liberada durante esta fase del fotociclo (Boatright y Iuvone, 1989b).

El efecto directo de la luz tanto sobre la actividad TH como sobre la liberación de DA, determina la ritmicidad en los niveles de esta catecolamina en la retina, aunque en este caso el perfil se encuentra invertido respecto a la melatonina (Iuvone, 1986a; Witkovsky *et al.*, 1988a). Además del efecto directo de la luz, el carácter rítmico de la liberación de ambos neuromoduladores se conserva en condiciones de iluminación constante, implicando una regulación coordinada de los mismos, que se realiza mediante dos lazos de retroalimentación negativa:

- a) La MEL inhibe directamente la liberación de DA afectando directamente el proceso de exocitosis dependiente de calcio, como se ha demostrado con la utilización de agentes despolarizantes de la membrana, como el potasio o la estimulación eléctrica (Dubocovich, 1983; Nowak, 1988).
- b) La DA inhibe la síntesis de MEL a través de receptores D_2 presentes en el fotorreceptor (Iuvone y Besharse, 1986c; Witkovsky *et al.*, 1988a; Zawilska y Iuvone, 1989; Nowak *et al.*, 1989). La adenilato ciclasa resulta inhibida y por tanto desciende la actividad NAT y la síntesis de MEL (Iuvone, 1986b; Qu *et al.*, 1989).

2.4.2 FUNCIONES REGULADAS POR EL SISTEMA DOPAMINA-MELATONINA.

Se han descrito numerosas funciones intraoculares del sistema DA-MEL, a continuación resumiremos las más importantes.

a) Acciones sobre las células horizontales.

La DA liberada durante el día modifica la respuesta electrofisiológica de las células horizontales mediante la activación de la adenilato ciclasa a través de receptores D_1 (Witkovsky *et al.*, 1988a), como consecuencia de esto se favorece la transmisión de la información eléctrica procedente de los conos hacia las células horizontales (funcionalmente activos durante el día) en contra de la importancia de los bastones (Witkovsky *et al.*, 1988b; Witkovsky y Shi, 1990).

b) Movimientos retinomotores.

Se denominan movimientos retinomotores a una serie de movimientos celulares que experimentan los fotorreceptores de peces, anfibios y aves como respuesta a los cambios de iluminación. Dichos movimientos se deben fundamentalmente a cambios en la longitud del mioide, mostrando una ritmicidad cíclica que en muchas especies es endógena, manteniéndose en condiciones de oscuridad constante (Burnside y Dearry, 1986).

Cada tipo de fotorreceptor responde de forma contraria y característica, los conos se contraen en luz mientras que en oscuridad se distienden (Dearry *et al.*, 1990; Besharse y Witkovsky, 1992; Besharse, 1992). En cambio, los bastones muestran una extensión del mioide hasta que sus segmentos externos quedan ocultos a la luz dentro del epitelio pigmentado, mientras que la oscuridad contrae el mioide exponiendo los segmentos externos a la escasa luz incidente (Dearry *et al.*, 1990; Burnside y Dearry, 1986).

La administración de MEL reproduce los movimientos retinomotores nocturnos de los fotorreceptores (Pierce y Besharse, 1987), mientras que la DA simula la acción de la luz (Deary *et al.*, 1990; Besharse, 1992), indicando que estos dos compuestos son los responsables de estos movimientos.

c) Migración del pigmento del epitelio pigmentado.

El epitelio pigmentado experimenta una serie de movimientos de su pigmento citoplasmático coordinados con los movimientos retinomotores de los fotorreceptores, lo que determina que los vertebrados posean una retina funcionalmente doble, adaptada a la

variación diaria de intensidad luminosa. Durante la fase de luz, se produce una rápida dispersión de los gránulos de pigmento del epitelio pigmentado a la zona apical del mismo, lo cual protege de la luz incidente a los segmentos externos de los bastones. En cambio, en oscuridad, los gránulos se agregan en la parte basal de las células del epitelio, quedando los bastones expuestos (Burnside y Dearry, 1986). En los anuros, el sistema DA-MEL regula dichos movimientos del pigmento, la DA, a través de receptores D_1 del epitelio, capaz de provocar la dispersión del pigmento (Dearry *et al.*, 1990), mientras que la MEL tiene una acción antagónica provocando la agregación del mismo (Pang y Yew, 1979), probablemente mediante modificaciones en el calcio intracelular (Mondragón y Frixione, 1989).

d) Recambio de discos.

Al igual que los otros tipos de neuronas, los fotorreceptores no se dividen, sin embargo los segmentos externos se renuevan constantemente. Discos nuevos se forman en la base y migran hacia la punta de cono o del bastón, donde son fagocitados por las células del epitelio pigmentado. El recambio de discos es rítmico y esta acoplado al ciclo de luz-oscuridad (Dahl y Gordon, 1992; Besharse, 1986).

El proceso rítmico de fagocitosis sólo se dispara al comienzo de la fase luminosa del ciclo para los segmentos externos de los bastones (Dahl y Gordon, 1992), y al final de la fase luminosa para los conos (Besharse, 1986), implicándose en su regulación tanto a la MEL como a la DA (Besharse y Dunis, 1983a; Dahl y Gordon, 1992; Dahl, 1992)).

3. CINÉTICA ENZIMÁTICA.

Las propiedades más características de las enzimas son, por un lado su capacidad para acelerar las reacciones químicas en condiciones compatibles con la vida (catalizadores biológicos), y por otro su gran especificidad respecto a los compuestos sobre los que pueden actuar como substratos.

El conocimiento de la cinética enzimática es un paso de vital importancia cuando se pretende comprender la función de las enzimas en procesos biológicos. La cinética proporciona una información muy valiosa e inalcanzable con otros métodos de estudio, sobre la función de la misma.

Debido a la gran dependencia de la funcionalidad de la enzima respecto a factores como el pH, la temperatura, substratos, etc., se impone conocer en primer lugar los requerimientos óptimos de la misma para poder cuantificar, de forma fiable y reproducible, dicha actividad.

Concretamente, para la realización de estudios cinéticos deberían cumplirse una serie de condiciones:

- Linealidad de la reacción respecto al tiempo del ensayo, cantidad de enzima y temperatura.
- Actividad enzimática máxima a pH, temperatura y concentración de sustratos óptimos.

Si se dispone de una solución de enzima purificada se obtendrán los resultados más válidos, evitándose así interferencias en el ensayo provocadas por otras enzimas o metabolitos presentes en las muestras biológicas. Sin embargo, muy pocas enzimas se disponen en estado puro, debido a que el proceso de purificación suele ser largo, lo que conlleva la pérdida de una parte de la enzima activa durante el proceso. Si no es posible disponer de la enzima purificada, debe llevarse a cabo una serie de pruebas previas con el fin de demostrar la validez de la preparación enzimática para los estudios cinéticos.

3.1. Factores que afectan a la actividad enzimática.

3.1.1 CONCENTRACIÓN DE ENZIMA.

Manteniendo el resto de las condiciones constantes, la velocidad de la reacción debe ser directamente proporcional a la cantidad de enzima ($v = k [E]$). En esta premisa se basan los métodos de estimación de enzimas utilizando su actividad como parámetro cuantitativo. Este es el caso más general para las enzimas purificadas, pero cuando se utilizan preparaciones sin purificar, frecuentemente se pierde dicha proporcionalidad entre actividad y $[E]$ debido a diversas causas:

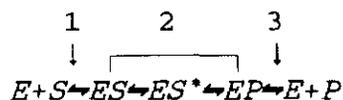
- Presencia de pequeñas cantidades de activadores o inhibidores en algún componente de la mezcla de reacción (tampón, sustratos, cofactores, etc.).
- Presencia de un cofactor necesario para la catálisis en la muestra biológica. Cuando se utiliza la enzima muy diluida dicho cofactor también resulta diluido. En los dos casos anteriores la falta de linealidad de la reacción se corrige utilizando grandes concentraciones de enzima.
- Cambios en la actividad enzimática relacionados con la dilución de la muestra. Las enzimas oligoméricas pueden disociarse como consecuencia de un efecto de dilución, que conlleva cambios en su actividad.
- Agotamiento de algún componente de la mezcla durante la reacción, o la aparición de un producto de la reacción que inhibe la enzima.

3.1.2 SUBSTRATOS.

a) Modelo cinético de Michaelis-Menten.

La reacción catalizada por una enzima puede dividirse en tres etapas:

1. Formación del complejo enzima-substrato.
2. Catálisis, formación del producto.
3. Disociación del complejo enzima-producto



Como se observa en el esquema, la etapa 1 indica el equilibrio químico del complejo enzima-substrato con sus correspondiente formas libres. La etapa 2 es el paso limitante de la reacción, en el que se forma el complejo activado (ES^*). La formación del producto es directamente proporcional a la concentración del complejo ES ($v = k [ES]$) donde k indica la velocidad de formación de ES^* . El paso 3, la disociación del producto P, puede considerarse irreversible al comienzo del ensayo cuando su concentración es despreciable.

Si se mantiene la enzima en una concentración constante y limitada, el efecto de la concentración de sustrato sobre la reacción se puede dividir en dos etapas.

- Cuando la concentración de sustrato es baja, la formación del complejo ES depende de forma casi lineal de la $[S]$, consecuentemente, se observa un incremento cuasilineal de la velocidad de la reacción respecto a $[S]$.
- A concentraciones altas de sustrato, debido a que la enzima se encuentra mayoritariamente en la forma ES, la cantidad de enzima se hace limitante, no pudiéndose incrementar más la velocidad de reacción, en esta situación se dice de la enzima se encuentra saturada ($[E]_{total} = [ES]$).

Como consecuencia de este comportamiento la representación de la velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato para una cantidad fija de enzima tiene una forma de hipérbola rectangular que pasa por el origen y con una asíntota horizontal ($v = V_{max}$) que se denominada ecuación de Michaelis-Menten (Cleland, 1967).

$$v = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

K_M indica la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima (V_{max}), está relacionada con la afinidad del sustrato por la enzima y corresponde a la constante del equilibrio I. La V_{max} representa la velocidad de reacción cuando toda la enzima se presenta en forma ES (saturada) que viene determinada por la velocidad de los pasos 2 y 3. Este parámetro cinético se relaciona linealmente con la cantidad de enzima a

través de la constante k_{cat} ($V_{max} = k_{cat}[E]$) la cual indica la capacidad catalítica de la enzima o el número de moléculas de sustrato que puede transformar una enzima en una unidad de tiempo.

Para la aplicación del modelo de Michaelis-Menten a una cinética enzimática, se requieren dos condiciones:

- La formación del complejo ES debe encontrarse en equilibrio, es decir, la formación del complejo ES (paso 1) debe ser más rápida que el progreso de la reacción (pasos 2 y 3).
- La [S] libre se debe mantener constante a lo largo del ensayo, es decir, que la [ES] debe ser pequeña frente [S], para lo cual la [E] debe ser muy baja.

Puede darse el caso que la reacción sea demasiado rápida (k_{cat} alta) como para que la formación de ES se encuentre en equilibrio (paso 1), se habla entonces del **modelo cinético del estado estacionario**. Las cinéticas siguen presentando el perfil hiperbólico pudiendo aplicarse los métodos de cálculo tradicionales, pero en este caso aunque la K_M sigue indicando la [S] a la cual se alcanza la $V_{max}/2$, este parámetro no representa la afinidad de la enzima por el sustrato, ya que las velocidades relativas del paso 1 y del paso 2 contribuyen al valor de esta constante.

b) Métodos de cálculo de las constantes cinéticas.

El cálculo de las constantes cinéticas debe realizarse siempre con las velocidades iniciales, es decir, cuando se cumplen todas las condiciones de proporcionalidad entre actividad enzimática, [E] y tiempo de reacción. Cuando esto no es posible, como sucede en el caso del método de valoración de la actividad enzimática denominado "a punto final" (método empleado en esta Memoria para valorar la actividad NAT), es necesario probar previamente que se conserva la linealidad de la reacción respecto a la cantidad de enzima utilizada y durante todo el período de tiempo del ensayo.

- **Métodos algebraicos.** Son muy precisos para la estimación de las constantes cinéticas, debido a la aplicación de técnicas de cálculo complejos, como por ejemplo, la regresión no lineal (Wilkinson, 1961). Además, poseen una gran flexibilidad a la hora de aplicar modelos cinéticos complicados (Duggleby, 1981). Se comentarán en profundidad en la sección de materiales y métodos de esta memoria.

- **Métodos gráficos.** Son mucho menos precisos para la estimación de las constantes cinéticas, pero no se han abandonado debido a su gran valor como aproximación cualitativa para la clasificación de tipos de cinéticas, tipos de inhibición, etc. La más utilizada es la

representación doble recíproca (Lineweaver-Burk, $1/v$ frente a $1/S$), que transforma la curva hiperbólica de la cinética en una recta. La linealidad de dicha representación gráfica, se toma como un criterio de validez del ensayo enzimático.

La falta de linealidad en la representación de Lineweaver-Burk puede deberse a varias causas, como la existencia de una reacción espontánea (no catalizada), que no se satura a concentraciones altas de sustrato, este problema se puede corregir utilizando unos tubos blanco (sin enzima) apropiados (Dixon y Webb, 1979). La presencia de sustrato endógeno en la preparación enzimática también puede dar lugar a la desaparición de la linealidad, debido a que la concentración real de sustrato no coincide con la añadida, lo que provoca errores significativos en las caracterizaciones cinéticas especialmente a bajas concentraciones de sustrato (Dixon y Webb, 1979).

c) Especificidad de la reacción.

Cuando se utilizan preparaciones enzimáticas sin purificar es necesario comprobar la especificidad de la reacción, incluyendo tanto la especificidad de la enzima por el sustrato utilizado como la de dicho sustrato por la enzima a determinar. Para comprobar estas cuestiones se pueden utilizar una serie de criterios cinéticos.

- UNA ENZIMA ACTUANDO SOBRE DOS SUBSTRATOS.

Cuando una enzima no es completamente específica para un sustrato, es posible que pueda actuar sobre dos sustratos distintos al mismo tiempo. La utilización simultánea de dos sustratos se ha utilizado como aproximación experimental para los estudios de especificidad enzimática. No puede ser considerado simplemente como un caso de dos reacciones paralelas, debido a que la cantidad de enzima es limitada, estableciéndose una competencia entre los sustratos por el sitio activo del enzima (Dixon y Webb, 1979).

Si se dispone de varias muestras enzimáticas de orígenes distintos, el criterio más sencillo es la utilización de un estudio de correlación entre las actividades valoradas con cada sustrato, una correlación significativa indica que solamente existe una enzima en las muestras capaz de actuar sobre ambos sustratos.

En el caso de utilizar una sola preparación enzimática, se dispone de dos criterios cinéticos:

a) En el caso de valorar sólo uno de los productos posibles, cada sustrato (a ó b) debe ejercer una inhibición competitiva sobre el otro, luego los datos experimentales deben ajustarse a la cinética:

$$v_a = \frac{V_{\max_a}}{1 + \frac{K_a}{a} \left(1 + \frac{b}{K_b}\right)}$$

b) Método de los sustratos mezclados o test de la aditividad, en el que se valora la suma de los productos procedentes de ambos sustratos. Este método ha sido utilizado para conocer si dos reacciones distintas son llevadas a cabo por la misma enzima de la preparación enzimática o por dos enzimas. Para este fin se necesita conocer las respectivas V_{\max} para cada sustrato y la V_{\max} cuando se utiliza una mezcla equimolecular de los mismos (V_M). Los posibles resultados y sus correspondientes conclusiones se resumen a continuación:

$$\begin{aligned} V_M &= V_{\max_a} + V_{\max_b} \quad (\text{existen 2 enzimas}) \\ V_M &< V_{\max_a} + V_{\max_b} \quad (\text{existe 1 enzima}) \end{aligned}$$

- DOS ENZIMAS ACTUANDO SOBRE UN MISMO SUBSTRATO.

En el caso de tener una única preparación enzimática se puede utilizar la representación de Lineweaver-Burk, la pérdida de la linealidad determinaría la existencia de dos enzimas distintas actuando sobre el mismo sustrato. No obstante la conservación de la linealidad de la representación Lineweaver-Burk no es un criterio concluyente sobre la existencia de una enzima única, debido a que si las enzimas tienen K_M similares, o sus V_{\max} son muy distintas, la representación no podría distinguirse de una verdadera recta (Dixon y Webb, 1979).

Si se utilizan varias preparaciones enzimáticas un método válido sería la comparación de la razón de las actividades enzimáticas obtenidas a dos concentraciones de sustrato (v_{S1}/v_{S2}). En muestras con una sola enzima la razón v_{S1}/v_{S2} debe conservarse, independientemente de la cantidad total de enzima en cada muestra, debido a que dicha razón depende exclusivamente del valor de la K_M y de las concentraciones S1 y S2 utilizadas en el ensayo.

$$\frac{v_{S1}}{v_{S2}} = \frac{S1(K_M + S2)}{S2(K_M + S1)}$$

En cambio, si en las muestras existe más de una enzima cinéticamente distintas, la razón v_{S1}/v_{S2} dependerá de la cantidad relativa de cada una de las enzimas, luego pequeños cambios en la cantidad de alguna de ellas provoca que la razón v_{S1}/v_{S2} no se conserve.

3.1.3 EFECTO DEL pH.

Normalmente las enzimas sólo pueden permanecer activas en un intervalo muy estrecho de valores de pH. Fuera de este intervalo óptimo, característico de cada enzima, se produce la pérdida de la actividad, debido a diversas causas (Dixon y Webb, 1979):

- Alteración de la integridad estructural de la enzima lo que provoca la inactivación irreversible de la misma.
- Cambios en la K_M , cuando la afinidad de la enzima por el sustrato depende del estado de ionización del sustrato o del centro activo. La utilización de [S] saturantes deberían anular los efectos del pH sobre la K_M .
- Cambios en la V_{max} , cuando el proceso de formación del complejo ES^* es dependiente del pH. Aunque se utilicen [S] saturantes la velocidad de reacción resulta afectada por el pH.

La inhibición reversible se debe a cambios en el estado de ionización de E, S ó ES , lo cual provoca un pico simétrico en la actividad enzimática alrededor del pH óptimo, la enzima pasa por varios estado de ionización distintos, de los cuales el intermedio es la forma catalíticamente activa, la pérdida o la ganancia de un protón de esta conformación óptima inactiva la enzima.

3.1.4 EFECTOS DE LA TEMPERATURA.

Los efectos de la temperatura sobre la actividad enzimática suelen ser extremadamente complejos. De forma análoga a los efectos del pH, la temperatura puede afectar a la integridad de la estructura de la enzima, o sólo a sus características cinéticas (K_M y V_{max}).

La termoestabilidad de la enzima se puede tratar estudiando la linealidad de la reacción con el tiempo, incubando la enzima a varias temperaturas en condiciones saturantes de los sustratos, con el fin de evitar interferencias debidas a cambios en la afinidad por los sustratos como consecuencia de la temperatura. En este tipo de estudios se pueden observar dos efectos distintos y simultáneos provocados por la temperatura, el efecto estimulador sobre la velocidad de la reacción, y la destrucción de la enzima a altas temperaturas. La temperatura óptima de la enzima queda determinada por la combinación más favorable de ambos efectos, es decir, la temperatura más alta a la cual no se observe destrucción de la enzima en el tiempo que dure el ensayo.

- Ecuación de Arrhenius.

Cada uno de los pasos de la catálisis enzimática puede asimilarse a un equilibrio químico entre especies distintas, cada equilibrio está asociado a un cambio en la energía del

sistema, para cada temperatura dicha relación termodinámica viene definida por la ecuación general:

$$\Delta G = -RT \ln(K) \quad K = \text{constante del equilibrio químico.}$$

La acción de la temperatura sobre la velocidad de la reacción fue explicada por primera vez por Arrhenius (revisión Hill y Wise, 1992). De la población total de moléculas cuya energía se distribuye siguiendo la ecuación de Maxwell-Boltzman, sólo una mínima parte de ellas es capaz de reaccionar, ya que poseen la energía cinética suficiente para superar la barrera que supone la energía de activación (E_a) de la reacción.

La ecuación de Arrhenius relaciona la tasa de una reacción y la temperatura de la siguiente forma.

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad R = \text{Constante de los gases}$$

K_1 y K_2 representan la tasa de reacción medida a las temperaturas T_1 y T_2 (°K) respectivamente.

De dicha relación se puede concluir que un incremento pequeño en la temperatura de sólo unos 10°K, que significa un pequeño aumento en la energía total de la población de moléculas (3-4 %), supone un gran incremento en la velocidad de la reacción debido a que se duplica, en la mayoría de los casos, el número de moléculas que pasan la barrera de la E_a .

A partir de la ecuación de Arrhenius se puede obtener la información termodinámica de cualquier constante cinética. Despejando el $\ln K_2$ de la ecuación de Arrhenius se obtiene:

$$\ln(K_2) = \underbrace{\ln(K_1)}_{T \rightarrow \infty} + \frac{E}{R} \frac{1}{T_1} - \frac{E}{R} \frac{1}{T_2}$$

Esta **representación de Arrhenius** es una regresión lineal en la que el término constante es el valor de $\ln(K)$ cuando la temperatura al infinito y la pendiente de la recta ($\Delta H/R$) indica una constante relacionada con el cambio de energía del equilibrio químico.

Este tratamiento matemático puede aplicarse al cálculo de los parámetros termodinámicos que gobiernan cada equilibrio químico que constituye el proceso completo de la catálisis, concretamente se pueden calcular los cambios de entalpía asociados al equilibrio de formación del complejo ES (relacionada con la constante de la K_M), o formación del complejo EI (relacionada con la K_i , cuando exista un inhibidor en el reacción). La

energía de activación (o entalpía de activación, E_a) puede ser calculada tomando la constante V_{max} ya que este parámetro cinético representa la constante de equilibrio de la formación de complejo ES activado (ES^*), paso limitante de la velocidad de reacción.

Resumiendo, a partir de la representación de Arrhenius se puede calcular:

<u>K</u>	<u>pendiente</u>	<u>ΔE</u>
V_{max}	$-E_a/R$	E_a (Energía de activación)
K_M	$\Delta H/R$	ΔH_{ES} (Entalpía de formación ES)
K_i	$\Delta H/R$	ΔH_{EI} (Entalpía de formación EI)

Si la formación del complejo ES es exotérmica el valor del la K_M aumentará con la temperatura, en cambio si la formación del complejo es endotérmica, la K_M se reducirá con la temperatura.

La E_a toma siempre un valor positivo, debido a que este parámetro termodinámico representa una barrera energética para la reacción. La E_a parece ser característica de cada enzima, no siendo modificada de forma importante por la naturaleza del substrato utilizado.

La aparición de discontinuidades en la representación de Arrhenius, observadas como cambios en la pendiente, puede deberse a varias causas (Dixon y Webb, 1979):

- Cambio de fase en el solvente, típico de las enzimas asociados a membranas biológicas, que pueden sufrir un cambio de fase (Kumamoto *et al.*, 1971) por acción de la temperatura, pasando del estado de gel al de cristal líquido.
- Dos reacciones paralelas. Cuando dos enzimas o dos isoformas de la misma enzima sensibilidades térmicas distintas llevan a cabo la misma reacción. A temperaturas altas predomina la acción de la enzima térmicamente más sensible (pendiente mayor).
- Cuando el proceso estudiado incluye dos reacciones consecutivas con sensibilidades térmicas distintas, el proceso menos sensible térmicamente limita la velocidad final del sistema a temperaturas altas.

3.2. Cinética de las reacciones bisustrato.

La mayoría de las reacciones enzimáticas se basan en la transferencia de grupos químicos de una molécula a otra (transferasas), esto supone que las enzimas suelen actuar sobre varios substratos distintos durante el mismo proceso de catálisis. La cinética enzimática de estas reacciones es mucho más compleja que para el caso de un solo substrato, ya que además de depender de la concentración de cada substrato, también depende del mecanismo

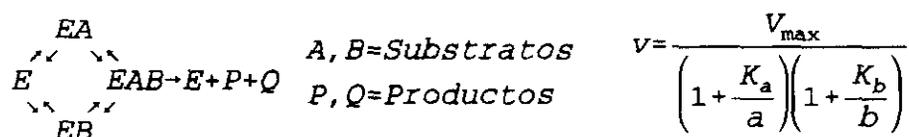
seguido durante la reacción, como por ejemplo, el orden en el que los sustratos se unen al centro activo de la enzima.

El análisis cinético de estas reacciones se puede simplificar si se mantiene constante uno de los cosustratos y se varía el otro. La cinética se convierte en una curva de tipo Michaelis-Menten, pero el valor de la K_M y la V_{max} estimadas depende de la concentración de cosustrato utilizada, debido a lo cual se denominan K_M y V_{max} aparentes. Cuando el cosustrato se añade en concentración saturante, el valor de las constante aparentes se aproximan a su verdadero valor.

A continuación se comentarán los dos mecanismos catalíticos más característicos:

a) Reacciones con unión aleatoria de los sustratos.

Los sustratos se pueden unir al centro activo de forma aleatoria. El modelo más general de este tipo de cinética, supone que la unión de cada sustrato a la enzima puede modificar la afinidad de la enzima por el otro. Una simplificación de este modelo general supone que la afinidad por cada sustrato es independiente entre sí. Este tipo de cinética se ha descrito para multitud de transferasas como para la carnitina acetiltransferasa (Dixon y Webb, 1979).



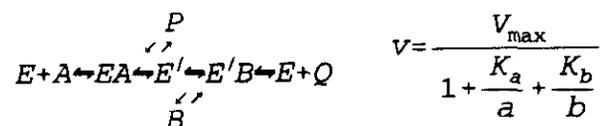
En este caso, las representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas para varias concentraciones fijas del cosustrato, se cruzan en el mismo punto sobre el eje $1/S$, lo cual indica que la K_M se mantiene constante independientemente de la concentración de cosustrato utilizada. Por tanto, el valor de dicha constante puede calcularse utilizando una única concentración fija de cada cosustrato.

b) Mecanismo de unión ordenada de los sustratos.

En este caso, la unión de cada cosustrato se realiza en una forma ordenada, esta restricción del modelo tiene como consecuencia más llamativa que la K_M para cada sustrato depende de la concentración del otro cosustrato (K_M aparente).

Multitud de transferasas, muestran un subtipo específico de este mecanismo de unión denominado transferencia en dos etapas o mecanismo ping-pong, tras la unión del primer

substrato, la enzima queda modificada covalentemente por un grupo químico (E') y es en esta forma cuando se une el segundo substrato que acepta el grupo unido a la enzima, recuperándose ésta en el estado inicial.



Las representaciones de Lineweaver-Burk de esta cinética para varias concentraciones fijas del cosustrato dan lugar a rectas paralelas, indicando que según se aumenta la concentración del cosustrato ambas constantes cinéticas (V_{\max} y K_M) aumentan de forma proporcional.

3.3. Inhibidores de enzimas.

Se denominan inhibidores enzimáticos a una serie de sustancias químicas que tienen la propiedad de reducir la capacidad catalítica de una enzima. En el campo de las ciencias básicas, los inhibidores han sido utilizados como herramientas imprescindibles para profundizar en el estudio enzimático. Atendiendo a su forma de actuación se pueden dividir en dos grandes grupos.

- **Irreversibles.** Cuando se unen a la enzima inactivándola de forma irreversible. Se caracterizan por un progresivo incremento de la inhibición con el tiempo. La eficacia del inhibidor viene expresada por una constante de velocidad en lugar de una constante de equilibrio, lo cual indica que aunque se utilice una concentración baja del inhibidor, si transcurre el tiempo suficiente, puede conseguirse la inhibición total de la enzima .

- **Reversibles.** Cuando la unión del inhibidor con la enzima depende de un equilibrio químico, y por lo tanto puede ser definido con una constante (K_i) que es una medida de la afinidad de la enzima por el inhibidor. Esta inhibición es reversible debido a que siempre puede ser eliminada reduciendo la concentración del inhibidor.

Los inhibidores reversibles se clasifican atendiendo a sus efectos sobre las constantes cinéticas en las siguientes categorías (Dixon y Webb, 1979):

a) **Inhibición competitiva.** El inhibidor se une al centro activo de la enzima desplazando al substrato. El efecto sobre la cinética es un incremento de la K_M aparente. El carácter competitivo se demuestra utilizando grandes concentraciones de substrato, condiciones que determina la desaparición de la inhibición (se debe conservar la V_{\max}).

b) Inhibición no competitiva. La unión del inhibidor a la enzima afecta al proceso de catálisis del complejo ES (y por tanto a la V_{\max}), pero no a la unión del sustrato con la enzima (se conserva la K_M). Idealmente, a concentración infinita del inhibidor la actividad enzimática tiende a cero. Un aumento en la $[S]$ no revierte la inhibición. Es un caso de inhibición que raramente se da en condiciones experimentales, debido a que la acción del inhibidor difícilmente puede afectar exclusivamente a la V_{\max} sin modificar la unión del sustrato a la enzima.

c) Inhibición mixta. El inhibidor modifica ambas constantes cinéticas (V_{\max} y K_M). Es el tipo de inhibición más común tras la inhibición competitiva.

d) Inhibición acompetitiva. Puede considerarse un tipo especial de inhibición mixta, en el que como consecuencia de la acción del inhibidor quedan modificadas tanto la K_M como la V_{\max} en la misma proporción, conservándose la razón K_M/V_{\max} .

Para distinguir entre los distintos tipos de inhibición, tradicionalmente se viene utilizando las representaciones de Lineweaver-Burk, usando varias concentraciones del inhibidor.

En la inhibición competitiva, el punto de intersección de las representaciones coincide con el eje Y ($1/V_{\max}$ se conserva), mientras que dicha intersección tiene lugar en el eje X en el caso de inhibición no competitiva ($-1/K_M$ se mantiene). Cuando la intersección tiene lugar en cualquier otro punto fuera de los ejes estamos ante una inhibición mixta, mientras que si se obtienen rectas paralelas (intersección en el infinito) significa que es un caso de inhibición acompetitiva.

A partir de los valores de V_{\max} y K_M aparentes ($V_{\max_{ap}}$ y $K_{M_{ap}}$) estimadas a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk en presencia y ausencia del inhibidor, puede calcularse la constante de afinidad del inhibidor:

$$K_i = \frac{I}{\frac{K_{M_{ap}} (1 + I/K_i')}{K_M} - 1}$$

$$K_i' = \frac{I}{\frac{V_{\max}}{V_{\max_{ap}}} - 1}$$

I = concentración inhibidor

K_i inhibición competitiva

K_i' inhibición no competitiva

En el caso de la inhibición mixta han de calcularse los dos valores de la constante de inhibición (K_i y K_i'), mientras que en la inhibición competitiva K_i' toma valor infinito.

3.3.1 INHIBICIÓN POR EXCESO DE SUBSTRATO.

Es frecuente observar en muchas reacciones que mientras que las concentraciones de sustrato se mantienen bajas la cinética cumple la ecuación de Michaelis-Menten, pero cuando se utilizan concentraciones altas de sustrato, la enzima muestra un descenso en la actividad.

En muchas ocasiones, sucede que un determinado comportamiento cinético puede interpretarse como una inhibición por sustrato cuando en realidad no lo es. Esta falsa inhibición puede deberse a varias causas (Dixon y Webb, 1979):

a) Existencia de pequeñas cantidades de un compuesto que acompaña al sustrato y que puede actuar como un inhibidor competitivo de éste (por ejemplo, cuando la solución de sustrato contiene una mezcla de isómeros ópticos). En el caso de utilizar concentraciones altas de sustrato, el inhibidor acompañante puede producir una inhibición considerable de la actividad enzimática. Dicho comportamiento anómalo se corrige utilizando el sustrato purificado.

b) Agotamiento de un activador esencial. En este caso el compuesto que se une al centro activo (sustrato verdadero) suele ser un complejo del sustrato con un ión, la utilización de altas concentraciones de sustrato sin el efector acompañante supone que el sustrato mismo inhibe la enzima, impidiendo la formación del complejo ES activo. El efecto inhibidor desaparece si se utiliza una cantidad suficiente del ión esencial.

Cuando existe una verdadera inhibición por sustrato ésta se debe a la formación de un complejo inactivo ES a altas concentraciones de sustrato. Dicho complejo ES inactivo puede formarse por la unión de más de una molécula de sustrato a un mismo sitio activo, lo que provoca una orientación errónea del sustrato, y por tanto a un descenso de la actividad. O también, en el caso de las reacciones bisustrato con un mecanismo catalítico ordenado, es muy corriente la aparición de la inhibición por sustrato, debido a que cuando se utiliza el sustrato que se une en segundo lugar en alta concentración, se impide que el primer sustrato se una al centro activo, apareciendo la inhibición. Este sistema fue tratado por primera vez por Haldane (Dixon y Webb, 1979).

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad K_i = \text{constante de inhibición}$$

Como puede observarse en el modelo, S aparece dos veces en el denominador, lo que provoca que la representación Lineweaver-Burk de este tipo de enzimas no origine líneas rectas.

La K_i se define de forma análoga a la K_M , pero en este caso representa el valor de [S] cuando la inhibición es la mitad de la máxima. A partir de dicho modelo se pueden obtener una serie de parámetros derivados:

r = constante de inhibición relativa ($r = K_i/K_M$).

S_{opt} = Concentración óptima de substrato $S_{\text{opt}} = \sqrt{K_M \times K_i}$.

V_{alta} = velocidad a S_{opt} $V_{\text{alta}} = V_{\max} \times \sqrt{r}/(2 + \sqrt{r})$

La representación de la cinética de la inhibición por substrato (velocidad frente a $\log[S]$) da lugar a curvas simétricas respecto a $\log[S_{\text{opt}}]$, los valores de K_M y K_i se pueden obtener de los dos puntos de inflexión de esta curva. Esta representación se puede considerar análoga a las curvas que presentan efecto del pH sobre la actividad enzimática (recordemos que el pH se representa en escala logarítmica), indicando que la forma activa de la enzima es el estado intermedio de ionización de la misma, donde la unión del primer H^+ actúa como activador, pero la unión del segundo la inhibe.

El método gráfico más utilizado para la estimación de las constantes cinéticas para este tipo de reacción se basa en la utilización conjunta de dos representaciones distintas, la representación de Lineweaver-Burk para la estimación de la K_M , despreciando las [S] que se alejan del tramo lineal, y la estimación de K_i utilizando la representación de Dixon ($1/v$ frente a S; Dixon y Webb, 1979), utilizando exclusivamente los puntos de [S] alta, calculándose dicha constante a partir del punto de corte de la recta con el eje X ($-K_i$), esto es posible debido a que cuando la concentración de S es alta el término K_M/S de la ecuación de Haldane se hace despreciable frente a S/K_i .

La estimación de la V_{\max} se obtiene del punto de corte de la recta con el eje Y ($1/V_{\max}$), cuyo valor debe coincidir en ambas representaciones (Lineweaver-Burk y Dixon).

3.4. Significado fisiológico de la K_M .

Las enzimas vienen caracterizadas por su constante de afinidad por los sustratos (K_M), el significado fisiológico del valor de dicha constante cinética ha sido explicado en numerosas ocasiones mediante una serie de hipótesis, intentando relacionarla con la función de la enzima en condiciones *in vivo* (Hochachka y Somero, 1984).

Dependiendo de la situación de la enzima dentro de la ruta metabólica, el valor de la K_M viene condicionado por distintas circunstancias.

a) Para las enzimas no reguladoras se supone que, en condiciones normales, deben trabajar a una concentración de sustrato endógeno alrededor de su K_M . En este punto la enzima tiene suficiente capacidad de respuesta tanto frente a aumentos como disminuciones de la concentración de sustrato, amortiguando dichas oscilaciones. Fuera de este rango, si la concentración de sustrato estuviera muy por encima de la K_M , aumentos progresivos de la concentración supondrían que el sustrato no podría ser transformado a una velocidad suficiente por la acción de la enzima, creciendo de forma exponencial, pudiendo llegar a tener efectos perturbadores o incluso tóxicos para el metabolismo de la célula (Atkinson, 1969). En apoyo de esta hipótesis, conviene indicar que normalmente la concentración endógena de sustrato suele coincidir con la K_M , además esta relación está filogenéticamente conservada (Hochachka y Somero, 1984).

b) En el caso de las enzimas reguladoras de rutas metabólicas también se puede dar una coincidencia entre el valor de la K_M y la concentración endógena de sustrato, pero esto se debe a que la regulación se realiza modificando la afinidad por el sustrato (debido por ejemplo a la acción de factores alostéricos).

c) Existen también una serie de situaciones donde no se conserva la relación entre K_M y concentración de sustrato, como por ejemplo, las enzimas reguladoras cuyo control se basa en cambios de su V_{max} y no de su afinidad, normalmente, en condiciones basales se encuentran saturadas limitando así la síntesis del producto. Cuando la enzima es activada, su V_{max} aumenta considerablemente, lo que deriva en una aceleración de la reacción.

d) En otras enzimas, normalmente su K_M se encuentra muy por encima de la concentración de sustrato, con lo cual conservan una gran capacidad de respuesta frente a incrementos bruscos en la concentración de sustrato respondiendo rápidamente a los mismos. Las enzimas detoxificantes (Lehninger, 1982; Martin *et al.*, 1989), o sistemas implicados en la terminación de la señal de mensajeros celulares (Thompson, 1991) son ejemplos de enzimas que muestran este comportamiento.

4. LA TEMPERATURA COMO FACTOR DE ADAPTACIÓN BIOLÓGICA.

Quizás la adaptación sea la propiedad más característica de los seres vivos, en un sentido general se puede definir como la modificación de las características de los organismos con el fin de facilitar y aumentar la capacidad de supervivencia y reproducción (Hochachka y Somero, 1984).

Desde hace mucho tiempo se ha intentado sistematizar los mecanismos de adaptación que presentan los seres vivos como respuesta al ambiente, con el fin de poseer un substrato teórico bajo el cual llegar a entender dichos fenómenos. Jean Claude Bernard introdujo el concepto de homeostasis como el objetivo principal de la adaptación, es decir, la conservación del medio interno frente a los cambios del medio ambiente. Más adelante, Magnus y Towle (1977) extendieron este concepto definiendo la enantioestasis, que se puede resumir como la conservación de la función como objetivo principal de la adaptación, aún a costa de no conservar el medio interno.

En nuestra opinión, la temperatura es quizás el factor ambiental que de forma más clara influye sobre los seres vivos, desencadenando una serie de mecanismos de adaptación, con el fin de conservar tanto la integridad estructural de las macromoléculas, como asegurarse de un suministro adecuado de energía aprovechable (fundamentalmente en forma de ATP), manteniendo un flujo constante en las rutas metabólicas (Hochachka y Somero, 1984).

4.1. Coeficiente de temperatura Q_{10} .

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

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

El coeficiente de temperatura refleja la sensibilidad térmica del parámetro K. Cuando el valor de Q_{10} se mantiene constante en un intervalo amplio de temperaturas significa que

el parámetro estudiado varía exponencialmente con la temperatura, es decir, incrementos aditivos de la temperatura provocan aumentos multiplicativos del parámetro (Hill y Wyse, 1992).

4.2. Mecanismos de adaptación térmica.

Los procesos biológicos se encuentran sometidos a las leyes termodinámicas, concretamente la temperatura alta tiende a acelerar irremediamente todos los procesos fisico-químicos, a este hecho se le ha denominado la tiranía de la ecuación de Arrhenius (Hill y Wyse, 1992), por tanto la adaptación de los seres vivos a la temperatura se puede resumir en desarrollar mecanismos que le permitan escapar de dicha tiranía. Las soluciones seguidas por los seres vivos para llevar a cabo dicho fin se pueden agrupar en dos grandes opciones (Bligh y Johnson, 1973):

a) **Homeotermia.** Mantenimiento de la temperatura del organismo constante e independiente de la temperatura ambiental. Esta solución tiene una ventaja obvia, el metabolismo se mantiene estable. A pesar de sus ventajas, esta estrategia no ha sido utilizada por un gran número de organismos, posiblemente debido al gran costo energético que supone tener un metabolismo basal altísimo, lo cual restringe la extensión de este fenómeno a unos nichos ecológicos muy concretos, de los que se pueda obtener un suministro de energía suficiente para mantener dicho metabolismo elevado.

b) **Poiquilotermia.** Frente a la homeotermia como estrategia derrochadora, energéticamente hablando, los animales poiquilotermos optan por reducir la sensibilidad térmica de todos sus procesos biológicos al mínimo, remodelando su maquinaria bioquímica para alcanzar, en la situación ideal, un coeficiente de temperatura $Q_{10} = 1$. Los mecanismos utilizados para lograrlo se pueden resumir en dos estrategias distintas:

- **Estrategia cuantitativa.** Implica cambios en la concentración de los componentes biológicos, para compensar el efecto de la temperatura y mantener constante la función biológica.

- **Estrategia cualitativa.** Conlleva cambios en las características estructurales de las macromoléculas, determinando alteraciones en la estructura primaria de las proteínas. Se da por tanto, a escala evolutiva.

4.3. Adaptaciones enzimáticas frente a la temperatura.

La funcionalidad de las macromoléculas (enzimas) depende de la estructura terciaria de las mismas, determinada por enlaces no covalentes, siendo este tipo de uniones muy sensible a los cambios de temperatura. A continuación profundizaremos en los efectos de la temperatura sobre las enzimas y los mecanismos de compensación que se pueden presentar.

- **Equilibrio entre labilidad y termoestabilidad. Concepto de Semiestabilidad** (Alexandrov, 1977).

La catálisis de una enzima conlleva un cierto grado de flexibilidad del centro activo, son imprescindibles ligeros cambios conformacionales inducidos por la unión del sustrato para la orientación correcta de los sustratos y cofactores. Si la enzima no puede sufrir estos cambios conformacionales por tener una estructura terciaria demasiado rígida, la reacción es imposible, en cambio, si la enzima es demasiado flexible corre el riesgo de no unir eficientemente los sustratos. Como consecuencia de estas restricciones una enzima es sólo funcional en un estrecho intervalo de temperaturas, lo suficientemente alto como para que exista flexibilidad en el centro activo, pero no excesivo como para desnaturalizarla.

- **Relación entre energía de unión del sustrato y E_a .**

La adaptación a las temperaturas altas provoca un incremento en la termoestabilidad de la enzima, que conlleva un descenso en la eficacia catalítica. Las razones de esta situación no se conocen en profundidad, pero posiblemente se deba a que se ha de optar por una solución de compromiso, cuando la temperatura asciende, debe aumentarse la estabilidad del complejo ES con el fin de conservar su K_M , esto conlleva una pérdida de flexibilidad del centro activo y por tanto una reducción en la velocidad de catálisis, que se muestra como un incremento de la energía de activación (E_a) de la reacción enzimática.

4.3.1 CONSERVACIÓN DE LA K_M Y LA TEMPERATURA.

Si se comparan los valores de la K_M , cuantificados en su correspondiente intervalo fisiológico de temperaturas, de enzimas homólogas correspondientes a seres vivos que habitan en climas distintos, se observa que estos valores se conservan (Somero, 1978). Dicho intervalo de valores de K_M suele coincidir con la concentración endógena de sustrato. Parece ser pues, que esta concordancia de K_M y $[S]$ *in vivo* no es accidental, la evolución intenta conservar la K_M , posiblemente porque las rutas metabólicas no pueden trabajar fuera de un estrecho margen de valores de la concentración de los sustratos sin afectar de forma negativa al organismo completo.

4.3.2 ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS.

A continuación comentaremos los distintos tipos de respuestas adaptativas de los poiquiloterms frente a la temperatura, clasificándola atendiendo al tiempo necesario para llevarse a cabo. No obstante estos niveles de adaptación no son excluyentes entre sí, y su importancia depende de la duración temporal de los cambios ambientales.

a) Adaptación térmica inmediata.

La respuesta a cambios bruscos de temperatura debe llevarse a cabo con las macromoléculas preexistentes. La adaptación bioquímica inmediata actúa a nivel celular o tisular, implicando cambios en las propiedades cinéticas de las enzimas. Se puede resumir fundamentalmente en dos tipos (Hochachka y Somero, 1973).

- **Modulación térmica positiva.** Se produce cuando el aumento de la temperatura se traduce en incrementos de la K_M , es decir aparece un descenso de la afinidad por los substratos. Sirve como un mecanismo de compensación frente a cambio bruscos de temperatura, ya que el incremento en la velocidad de reacción debido a la temperatura se compensa con una pérdida de la eficacia catalítica debido al aumento de la K_M . Este hecho se pone de manifiesto en los valores de Q_{10} para la actividad enzimática medidos a concentraciones subsaturantes de substrato (condiciones fisiológicas), que son muy inferiores a los correspondientes a la V_{max} de la misma enzima (Walsh y Somero, 1982). La gran mayoría de las enzimas de los poiquiloterms muestran este comportamiento.

- **Modulación térmica negativa.** Se produce cuando la K_M se reduce con la temperatura. A temperatura baja se observan los efectos combinados de una reducción en la energía cinética de las moléculas, y por tanto un enlentecimiento en la catálisis, junto con una reducción de la capacidad enzimática debido al incremento de la K_M . Por tanto, en condiciones subsaturantes se obtienen valores de Q_{10} muy elevados, lo que puede ser muy perjudicial para el mantenimiento de una actividad enzimática adecuada a temperaturas bajas. La modulación térmica negativa solamente sería útil para enzimas que necesitan aumentar su capacidad catalítica de forma muy importante a temperaturas elevadas, como en el caso de las enzimas detoxificantes, debido a que a temperaturas elevadas, la formación de productos tóxicos resulta muy incrementada (Hazel y Prosser, 1974).

b) Aclimatación térmica.

Actúa a nivel de organismo. Los cambios ambientales son de mayor duración no alcanzando en ningún caso una duración mayor que la propia del ciclo vital del organismo. Suelen incluir cambios en la expresión génica, que tiene como consecuencia cambios fenotípicos en el animal (Rome *et al.*, 1992). La activación o represión génica es un sistema eficaz y específico para producir cambios en la concentración de enzimas concretas. Este nivel de adaptación tiene el inconveniente de su lentitud, que puede prolongarse hasta varias semanas. Es un ejemplo de estrategia cuantitativa, muy extendido en la adaptación estacional, tanto en plantas como en animales (Hochachka y Somero, 1984).

La finalidad de los estudios de aclimatación es establecer si dicho tratamiento experimental provoca cambios en la cantidad de enzima y en su sensibilidad térmica (**respuesta aguda** a la temperatura). Para lo cual, se comparan entre sí las respuesta agudas obtenidas de cada grupo de aclimatación (**respuesta crónica**), valorando la actividad enzimática en el intervalo de temperaturas correspondientes a la aclimatación. Los posibles resultados son (Hazel y Prosser, 1974):

- **No compensación.** Cuando las respuestas agudas de los grupos de aclimatación son idénticas, no apreciándose ningún cambio como consecuencia del tratamiento experimental.
- **Compensación completa.** Cuando tras el período de aclimatación, la actividad enzimática es idéntica para los grupos experimentales valorada a su correspondiente temperatura de aclimatación ($Q_{10} = 1$). Gráficamente se observa que la pendiente de la respuesta crónica es igual a cero.
- **Compensación parcial.** Cuando la aclimatación no llega a compensar totalmente el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. La pendiente de la respuesta crónica es mayor que 0, pero menor que la que presentan las respuestas agudas de cada grupo. El coeficiente Q_{10} se reduce.
- **Sobrecompensación.** Cuando la compensación supera al valor del grupo experimental de referencia. La pendiente de la respuesta crónica es negativa ($Q_{10} < 1$).
- **Compensación inversa.** Cuando la aclimatación produce una respuesta inversa, aumentando en lugar de disminuir la sensibilidad térmica de la enzima, y por tanto se incrementa el valor de Q_{10} . Esto provoca que la pendiente de la respuesta crónica es mayor que la de las respuestas agudas.

La estrategia cuantitativa como mecanismo de adaptación térmica sólo es útil frente a variaciones moderadas de temperatura, debido a que cada enzima en particular está adaptada a un estrecho intervalo térmico.

Para salvar estas limitaciones, como adaptación a grandes cambios estacionales de la temperatura, sería la adquisición de varios tipos de isoenzimas con comportamientos térmicos distintos y cuya expresión depende de la temperatura ambiental. Se consigue pues conservar la funcionalidad de una actividad enzimática en un intervalo muy amplio de temperaturas ambientales.

La posesión de varias isoenzimas térmicamente distintas, permitiría escapar de los efectos perjudiciales de la modulación térmica negativa. Cuando, como consecuencia de la temperatura baja, el coeficiente k_{cat}/K_M toma un valor demasiado bajo, otra isoenzima mejor adaptada (k_{cat}/K_M óptimo) ocuparía su lugar.

c) Adaptación genética o evolutiva.

Actúa a nivel de población. Incluye cambios genotípicos (modificaciones en la estructura primaria de las macromoléculas), que se traducen en cambios fenotípicos estables. Tiene importancia como mecanismo de adaptación a escala evolutiva, como supone la conquista de nuevos hábitats, o cambios climáticos globales.

Se ha observado que un cambio de sólo unos cuantos grados en la temperatura ambiental media es un estímulo suficiente como para que a escala evolutiva se observen cambios en las características de las enzimas (Graves y Somero, 1982).

Las respuestas adaptativas observadas en las poblaciones biológicas frente a cambios de temperatura de larga duración se pueden resumir en dos opciones:

- Adaptación evolutiva a la temperatura baja, se basa en un aumento de su eficacia catalítica, es decir, tienden a reducir la E_a de la reacción, y por tanto se observa un incremento la k_{cat} .
- Adaptación evolutiva a la temperatura alta, se basa en un aumento de su termoestabilidad, aún a costa de la pérdida de su eficacia catalítica. Esta pérdida en la eficacia se ve compensada por la aceleración de la reacción causada por la temperatura elevada.

En resumen, la adaptación evolutiva intenta optimizar el cociente k_{cat}/K_M (indicativo de la eficacia catalítica a concentraciones fisiológicas) a la temperatura ambiental propia de cada población biológica, dicha respuesta se ha observado en multitud de trabajos realizados en vertebrados e insectos (ver Hochachka y Somero, 1984).

II. OBJETIVOS

El conocimiento actual sobre distintos aspectos relacionados con la melatonina y la regulación de su síntesis se halla restringido fundamentalmente a los mamíferos, siendo estos aspectos mucho menos conocidos en el resto de los vertebrados. Teniendo en cuenta el carácter adaptativo de la melatonina, como molécula intermediaria entre el ambiente y el animal, nos planteamos estudiar la regulación de la síntesis de melatonina en un grupo de vertebrados poiquiloterms, los anfibios anuros, en los que existe una gran dependencia de su fisiología respecto a los factores externos.

Partiendo de trabajos previos realizados en nuestro equipo de investigación acerca de la regulación ambiental de los ciclos reproductores estacionales de *Rana perezii*, y el papel desempeñado por la melatonina en la sincronización de estas funciones cíclicas con el ambiente, consideramos interesante profundizar en ciertos aspectos relacionados con la regulación de la síntesis de melatonina en esta especie. Aunque inicialmente se descubrió la melatonina en la glándula pineal, en la última década han sido numerosos los estudios que demuestran que la síntesis de melatonina extrapineal puede ser muy notable, al menos en determinados grupos zoológicos. Concretamente en el género *Rana* la retina parece ser el órgano principal productor de melatonina.

El objetivo global de esta tesis doctoral ha sido profundizar en los factores ambientales y endógenos que determinan la producción de melatonina en la retina de los anuros. La arilalquilamina N-acetiltransferasa (NAT), considerada como enzima limitante en la síntesis de melatonina, se ha utilizado como indicador de la capacidad biosintética de la retina.

La primera parte del estudio se centró en la realización de los experimentos necesarios para poner a punto en nuestro laboratorio las técnicas instrumentales necesarias para el desarrollo de los objetivos. En la bibliografía no existen trabajos que determinen la actividad NAT en la retina de anfibios, por ello el primer objetivo era caracterizar el ensayo radioenzimático, incluyendo la estabilización de la enzima *in vitro* y la optimización de las condiciones físico-químicas del método, que permitiesen una estimación fiable de la actividad enzimática. El radioinmunoensayo de melatonina hubo de ser validado como método para la determinación de los niveles de melatonina producidos por la retina de anuros. Por último, adaptamos un método de cultivo estático para las copas ópticas de *Rana perezii*, con el fin de

obtener un modelo experimental apropiado para el análisis de la regulación endógena de síntesis de melatonina.

Una de las propiedades más representativas de la NAT y la melatonina es su síntesis rítmica diaria, bien caracterizada en adultos de numerosas especies, sin embargo se desconoce las relaciones existentes entre dicho ritmo y el desarrollo ontogénico, por ello consideramos importante conocer la ontogenia del ritmo diario de la NAT en anuros, marcándonos como objetivos concretos el análisis del momento de la aparición del ritmo de NAT ocular, la evolución de las características cronobiológicas del perfil del citado ritmo a lo largo del desarrollo larvario, y la influencia del proceso de la metamorfosis sobre la actividad cíclica de la enzima. Este estudio, realizado en varias especies de anuros con distintas adaptaciones ambientales e historias evolutivas, nos permitiría establecer desde un punto de vista comparado, correspondencias entre los ritmos diarios de NAT y los factores ambientales y filogenéticos.

Estudios preliminares realizados por nuestro grupo establecían una dependencia directa entre niveles estacionales de melatonina y condiciones ambientales en *R. perezi*. Un planteamiento a resolver es si estos efectos ambientales sobre la melatonina están regulados a través de la NAT, tal y como se ha propuesto para la glándula pineal de homeotermos. En otras palabras, había que averiguar los posibles fenómenos de adaptación experimentados por la NAT frente a los cambios ambientales.

Para abordar este objetivo, seguimos dos aproximaciones experimentales, por un lado realizamos el seguimiento estacional de los ritmos diarios de actividad NAT y melatonina en la retina de *R. perezi*. Por otro, y conociendo la importancia de la temperatura como regulador del ritmo de melatonina en los poiquilotermos, evaluamos la respuesta de la actividad NAT ocular a este factor ambiental. Específicamente se analizó la dependencia de la eficacia catalítica de la NAT respecto a la temperatura, mediante posibles modificaciones de las constantes cinéticas, completándose este apartado con el estudio del efecto de la aclimatación térmica sobre la actividad enzimática. El análisis combinado de los efectos agudos y crónicos nos permitiría obtener una información más completa acerca de los mecanismos que operan en la integración de la temperatura a través de la NAT.

Por último, y para completar el cuadro de mecanismos de regulación de la síntesis de melatonina ocular a través de NAT, nos pareció interesante, mediante un modelo de cultivo de copas ópticas, estudiar algunos aspectos del control endógeno de la NAT y la

síntesis de melatonina. Considerando la información bibliográfica existente sobre los estudios realizados en la glándula pineal y retina en otros vertebrados, por una parte nos planteamos analizar los neuroquímicos que podrían canalizar la información extracelular al fotorreceptor, centrándonos en el papel de las catecolaminas, utilizando agonistas y antagonistas específicos para los distintos tipos de receptores adrenérgicos y dopaminérgicos. Por otra parte, se evaluó el papel desempeñado por los sistemas de mensajeros intracelulares en la expresión del ritmo día/noche de NAT y melatonina, eligiendo AMPc, GMPc y calcio como representantes de este control intracelular.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1. Productos.

a) Reactivos.

- Acetil Coenzima A (101.893, Boehringer Mannheim)
- Ácido acético (141008, Panreac)
- Ácido ascórbico (A-4544, Sigma)
- Ácido clorhídrico (317, Merck)
- Ácido ortofosfórico (573, Merck)
- Agua bidestilada (Laboratorios Navarro, S.A.).
- Albúmina sérica bovina (A-7030, Sigma)
- Alcohol isoamilo (I-1381, Sigma)
- Azida sódica (S-2002, Sigma)
- Bicarbonato sódico (141638, Panreac)
- Carbógeno (SEO)
- CO₂ (Carburos metálicos)
- Carbonato sódico (6392, Merck)
- Cloroformo (2445, Merck)
- Cloruro potásico (P-4504, Sigma)
- Cloruro sódico (141659, Panreac; S-9888, Sigma)
- Creatina, hemisulfato de (C-0264, Sigma)
- Diclorometano (17-3, Sigma)
- 2,5-Difeniloxazol (PPO) (D-5879, Sigma)
- Dimetil-POPOP (D-3879, Sigma)
- Dimetilsulfóxido (D-5879, Sigma)
- EGTA (E-4378, Sigma)
- Etanol (983, Merck)
- p-Fenetidina (P 1481-5, Aldrich)
- Fosfato dipotásico (141512, Panreac)
- Fosfato disódico (6586, Merck)
- Fosfato monopotásico (141509, Panreac)
- Fosfato monosódico (9090, Merck)

- Gelatina (4070, Merck)
- HEPES (H-3375, Sigma)
- Hidróxido potásico (141515, Panreac)
- Hidróxido sódico (6498, Merck)
- Manitol (M-9647, Sigma)
- Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (074-01600, GIBCO)
- Melatonina (M-5250, Sigma)
- Polietilenglicol 6000 (807491, Merck)
- Reactivo de Folin-Ciocalteau (251567, Panreac)
- Serotonina, hidrocloreuro de (H-5755, Sigma)
- Serotonina, creatinina-sulfato de (H-7752, Sigma)
- Sulfato cúprico (52367, Probus)
- Tartrato sódico-potásico (8087, Merck)
- Tolueno (8317, Merck)
- Tricina (T-0377, Sigma)
- Triptamina, hidrocloreuro de (T-9628, Sigma)
- Triton X-100 (37238, Serva)

b) Fármacos.

- Actinomicina D (A-1410, Sigma)
- Calmidazolium (C-1278, Sigma)
- Cicloheximida (C-6255, Sigma)
- Clonidina (C-7897, Sigma)
- Dibutilil-5',3'adenosin monofosfato (D-0627, Sigma)
- Dibutilil-5',3'guanosin monofosfato (D-3510, Sigma)
- Eserina (E-8500, Sigma)
- Fenilefrina (P-6126, Sigma)
- Forscolín (F-6886, Sigma)
- Gonadotropina coriónica humana, Physex (Leo)
- Isobutilmetilxantina, IBMX (I-5879, Sigma)
- Isoproterenol (I-6504, Sigma)
- Nifedipina (C-7634, Sigma)
- Prazosín (P-7791, Sigma)
- Propranolol (P-5419, Sigma)

- Quinpirol (Q-102, RBI)
- R-SCH 23390 (D-054, RBI)
- R-SKF 38393 (S-101, RBI)
- Sulpirida (S-7771, Sigma)
- Yohimbina (Y-3125, Sigma)

c) Sueros y anticuerpos.

- Anticuerpo antimelatonina (Stockgrand RR/19549-16876)
- Suero de asno anti-inmunoglobulina de conejo (Stockgrand SAB/D/06)
- Suero de conejo (R-4505, Sigma)

d) Radionucléidos.

- 1-[¹⁴C] Acetil-Coenzima A (act. esp. 60 mCi/mmol) (Amersham)
- 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina (act. esp. 2000 Ci/mmol) (Amersham)

1.2. Instrumental.

- Agitador multitubos (Corning, modelo 4010)
- Balanzas de precisión (Sartorius y Sauter 404)
- Baño de órganos termostatzado (Unitronic, modelo 320 OR).
- Cámara de aclimatación con fotoperíodo y temperatura regulable
- Cámaras de cultivo herméticas, transparentes y opacas.
- Centrífuga refrigerada. (Sigma, modelo 3K-2)
- Colorímetro (Atom, modelo Data-test atom 366).
- Congelador a -25°C (Liebherr).
- Evaporador-concentrador (Howe, modelo Giro vap)
- Microcentrífuga (Heraeus, Modelo Biofuge 13)
- Contador τ (LKB, modelo 1275 minigamma)
- Contador β (Beckman, modelo LS 3801)
- Lupa binocular (Zeiss y Meiji EMT)
- Material de disección
- Pipetas automáticas (Gilson y Kartell)
- Placas de cultivo de 24 pocillos (volumen 3 ml) (NUNCLON)
- Sonicador (Sonics and Materials Inc., modelo Vibra Cell)

1.3. Material biológico: obtención y mantenimiento.

1.3.1 ANIMALES ADULTOS DE *Rana perezi*.

Todos los individuos de *R. perezi*, utilizados en la realización del trabajo experimental, procedían de Pontevedra. Una vez en el laboratorio, los animales fueron mantenidos en acuarios con agua previamente desclorada por filtración con carbón activado durante al menos 2 días. El agua era completamente renovada de los acuarios 3 veces por semana.

La alimentación se realizó de dos formas distintas, alimentación forzada a base de hígado de pollo, o alimentación *ad libitum* con larvas de dípteros (*Calliphora*). El tipo de dieta y la frecuencia de alimentación dependía de la época del año y del diseño experimental utilizado para cada trabajo.

1.3.2 LARVAS DE ANFIBIOS ANUROS.

A continuación se describen los métodos de obtención y mantenimiento en el laboratorio de las larvas de anuros utilizadas para el desarrollo de esta Memoria.

a) *Rana perezi*.

- Fecundación *in vitro*.

Hembras sexualmente maduras (Marzo) fueron inyectadas por vía intraperitoneal con un homogeneizado de hipófisis de animales adultos de la misma especie (5-6 hipófisis por hembra). A partir de este momento las hembras se mantuvieron a 20°C hasta la aparición de los primeros huevos en el agua (2-3 días). En este momento, machos sexualmente maduros (con callosidades nupciales bien desarrolladas) fueron sacrificados y los testículos extraídos, los espermatozoides fueron liberados mediante desgarrado de la pared del testículo en una placa Petri con solución de Ringer para anfibios diluida (1:10), obteniéndose una suspensión de espermatozoides cuya movilidad se comprobó con ayuda de un microscopio. La suspensión de espermatozoides se ajustó a una dilución equivalente a 1 testículo en 5 ml de Ringer diluido.

Los huevos se obtuvieron aplicando un masaje abdominal a las hembras estimuladas, y se depositaron sobre la suspensión de espermatozoides. La fecundación se confirma a los 60 minutos por la rotación de orientación que determina que el polo animal de los huevos fecundados se sitúe en la parte superior, quedando el polo vegetativo orientado hacia abajo. El porcentaje de fecundación fue superior al 90 %.

- Puesta espontánea.

Las puestas espontáneas se produjeron en el laboratorio, durante la época de reproducción natural para esta especie (Abril-Junio), el porcentaje de huevos fecundados obtenidos fué superior al 90 %.

b) *Xenopus laevis*.

Las larvas se obtuvieron por puesta inducida en el laboratorio mediante gonadotropina coriónica humana (GCh). Los adultos sexualmente maduros de ambos sexos fueron inyectados en días sucesivos con GCh en el saco linfático dorsal:

- 1° día. Machos inyectados con 50 U.I. Hembras inyectadas con 150 U.I.
- 2° día. Machos inyectados con 200 U.I. Hembras inyectadas con 300 U.I.

La temperatura del agua se mantuvo a 20-22°C durante este período. Los huevos fecundados fueron inmediatamente retirados del acuario y depositados en bandejas con agua desclorada.

c) *Discoglossus pictus*.

Estudios sistemáticos recientes realizados sobre esta especie, tienden a considerar la existencia de varias especies pertenecientes al género *Discoglossus* en la península Ibérica (Barbadillo, 1987). Debido a la falta de acuerdo en cuanto a los límites de distribución de las distintas especies de este género de anuros, en esta Memoria se sigue conservando el nombre anterior (*D. pictus*) indicando la localidad de procedencia de los individuos utilizados (Pontevedra).

De forma similar al proceso utilizado con *Xenopus laevis*, la puesta se realizó de forma inducida, durante los meses de Marzo y Abril, mediante la inyección de una única dosis de GCh. (250 U.I.) a individuos sexualmente maduros de ambos sexos.

d) *Bufo calamita*.

Huevos recién fecundados fueron recogidos de una charca temporal en un prado de la provincia de Soria durante el mes de Mayo. La identidad de la especie se realizó en base a la existencia de animales adultos en el misma charca, y fue confirmada posteriormente por los caracteres larvarios específicos (Barbadillo, 1987).

Todas las larvas fueron mantenidas en un fotoperíodo 12 L:12 D y a una temperatura de 23-25°C durante todo el desarrollo. La alimentación se realizó *ad libitum* a base de espinacas hervidas. En el caso de *Xenopus laevis*, debido a su alimentación por filtración,

las espinacas debieron ser previamente trituradas. El agua, desclorada con antelación, se renovaba diariamente.

2. MÉTODOS.

2.1. Extracción de los tejidos.

2.1.1 OBTENCIÓN DE COPAS ÓPTICAS DE EJEMPLARES ADULTOS DE *R. perezii*.

Una vez decapitado y desmedulado el animal, se procedió a la extracción del globo ocular con unas tijeras de cirugía de punta curva, a continuación con unas tijeras de iridectomía y con ayuda de una lupa binocular se procedió a retirar la cornea y el iris cortando el globo ocular a nivel de la *ora serrata*. Seguidamente se extrajo el cristalino y el humor vítreo, quedando la copa óptica preparada para su posterior procesamiento. Dependiendo del destino de la copa óptica se realizaron las siguientes modificaciones al protocolo general descrito:

a) Valoración de melatonina ocular. La copa óptica recién obtenida se congeló de inmediato en hielo seco. Las copas congeladas se conservaron a -25°C hasta el momento de la determinación de MEL.

b) Valoración de la actividad NAT. Todo el proceso de extracción se realizó con el ojo inmerso en tampón fosfato salino pH 7,2 (fosfato sódico 0,1 M, NaCl 0,14 M, EGTA 10 mM). La retina neural se separa del epitelio pigmentado y se sumerge en 300 μl de tampón de homogeneización del ensayo (ver apartado 2.3.1.a), congelándose inmediatamente sobre hielo seco. Las muestras se mantuvieron a -25°C hasta el momento en que se realizó el ensayo enzimático.

c) Cultivos *in vitro* de copas ópticas. La obtención de las copas se realizó con el ojo inmerso en el medio de cultivo (ver apartado 2.3.4.a), preincubándose en el mismo durante 30 minutos antes del comienzo del cultivo.

2.1.2 EMBRIONES Y LARVAS DE ANUROS.

Debido al pequeño tamaño de los embriones en los primeros estados del desarrollo (estado 37 de *Xenopus laevis* y estado 21-22 de *Rana perezii*), la actividad enzimática NAT se valoró en la región cefálica completa, para lo cual se seccionó la región cefálica inmediatamente por detrás de los ojos.

En el caso de larvas de anuros, los globos oculares se extrajeron enteros e inmediatamente fueron congelados sobre hielo seco inmersos en el tampón de homogeneización (150 μ l), tras lo cual, se conservaron a -25°C hasta el momento de la determinación de la actividad NAT.

Cuando la preparación de las muestras se realizó durante la fase oscura del fotociclo diario, tanto para los adultos como para las larvas, todas las operaciones fueron llevadas a cabo bajo una tenue luz roja (15 w).

2.2. Diseños experimentales.

Con el fin de evitar ambigüedades en la especificación del fotoperíodo en los distintos diseños experimentales, por convenio se indica en primer lugar la duración de la fase luminosa en horas seguido de la letra L, y a continuación la fase oscura seguido de la letra D. Ambas fases se separan por dos puntos. Ejemplo 12L:12D.

Cuando el factor tiempo aparece como una variable experimental ésta se expresa en forma centesimal para facilitar el cálculo y tratamiento estadístico de los resultados.

2.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD N-ACETILTRANSFERASA DE LA RETINA DE *R. perezii*.

2.2.1.1. Arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT)

Los animales adultos de *R. perezii* se mantuvieron en condiciones de fotoperíodo y temperatura naturales durante el período de Abril a Septiembre. La alimentación se realizó con larvas de dípteros dos veces por semana. Los animales siempre fueron sacrificados en la mitad de la fase oscura (2:00 h). Se caracterizaron los siguiente puntos:

a) Optimización del ensayo de la AA-NAT.

- **Estabilidad de la enzima en las preparaciones biológicas.** Se estudió el efecto estabilizador de determinados compuestos (EGTA y AcCoA) sobre la enzima NAT en homogeneizados, para lo cual retinas se homogeneizaron en los siguientes tampones:

- a) Tampón fosfato 0,1 M Ph 6,5.
- b) Tampón fosfato suplementado con 85 μ M de AcCoA.
- c) Tampón fosfato suplementado con 20 Mm de EGTA.

Los distintos tipos de homogeneizados fueron sometidos a una preincubación desde 0 a 30 minutos a 25°C . Una vez transcurrido este período de tiempo, se dió comienzo a la

reacción (15 min) añadiendo los substratos correspondientes (conc. finales: AcCoA = 62,5 μ M, triptamina = 12,5 mM, EGTA 10 mM).

En un segundo experimento se probó la duración del efecto protector del EGTA (20 mM) durante largos períodos de tiempo, para lo cual alícuotas de homogeneizados de retina se incubaron de 0 a 200 min. a 25°C (conc. finales: EGTA 10 mM, AcCoA 50 μ M, triptamina 10 mM).

Se realizó también la curva dosis-respuesta de la NAT frente a la concentración de EGTA. Una vez homogeneizadas las retinas en tampón fosfato 0,1 M pH = 6,5, se añadieron cantidades crecientes de EGTA al homogeneizado de retina para conseguir una concentración final de EGTA en el intervalo de 0 a 40 mM (conc. finales de los substratos: AcCoA 62,5 μ M, triptamina 10 mM).

Por último, se comprobó la conservación de la actividad NAT de la retina de *R. perezi* en congelación (-25°C), para lo cual se valoró la actividad enzimática de cada ojo del mismo animal tras 1 ó 20 días en congelación.

- Optimización de las características fisico-químicas del ensayo. Se han estudiado una serie de condiciones con el fin de conocer las condiciones óptimas del ensayo enzimático:

- Concentración del tampón del ensayo. Las retinas fueron homogeneizadas en tampón fosfato potásico pH 6,5, 50 mM suplementado con EGTA 25 mM, y a continuación se añadieron cantidades crecientes de tampón fosfato (pH 6,5) para conseguir una concentración final en el intervalo de 50-500 mM (conc. finales: EGTA 10 mM, AcCoA 50 μ M, triptamina 10 mM).

- pH del tampón. Para cada pH seleccionado, se homogeneizaron dos retinas en tampón fosfato 0,25 M (EGTA 20 mM) con un pH en el intervalo 6-7. La valoración de la actividad NAT se realizó por duplicado para cada ojo (conc. finales: EGTA 10 mM, AcCoA 50 μ M, triptamina 10 mM).

- Cantidad de tejido. Diferentes fracciones de homogeneizado de retina (equivalentes a 1/30 hasta 1/3 de retina) fueron analizados para estudiar la linealidad del desarrollo de la reacción enzimática (conc. finales de los substratos: AcCoA 62,5 μ M, triptamina 10 mM).

- Tiempo y temperatura del ensayo. Con el fin de probar la termoestabilidad de la enzima en el ensayo, se valoró la actividad NAT durante distintos tiempos de reacción (5 a 30 minutos) y a dos temperaturas distintas 25 y 35°C. El ensayo se repitió utilizando dos concentraciones distintas de AcCoA (50 μ M y 250 μ M) (conc. finales: EGTA 10 mM, triptamina 10 mM).

- **Preparación de los tubos blanco del ensayo.** Se estudió la forma de obtener los tubos blanco más reproducibles dependiendo de los substratos utilizados (serotonina y triptamina).

b) Localización de la actividad NAT.

Se consideró necesario comprobar la asociación de la actividad NAT con la retina neural, tal y como se ha descrito en otras especies de vertebrados. Para lo cual, partiendo de copas ópticas enteras se aisló la retina neural limpiando los restos de epitelio pigmentado, pasando a continuación a valorar la NAT en homogeneizados de retina neural y de copa óptica sin retina neural (complejo esclerótica-epitelio pigmentado).

En segundo lugar, y a fin de conocer localización de la actividad NAT dentro del homogeneizado del tejido, éste se sometió a centrifugación (10.000 g., 30 min.), determinándose la actividad NAT tanto en el sobrenadante resultante, como en el precipitado previamente reconstituido en el tampón del ensayo (tampón fosfato 0,25 M pH 6,5, EGTA 20 mM).

c) Cinética enzimática.

Con el fin de averiguar el tipo de cinética enzimática que muestra dicha enzima, así como los requerimientos de las concentraciones de substratos necesarias para el desarrollo del ensayo, se realizó la caracterización cinética de la NAT respecto a los dos substratos de la reacción (AcCoA y triptamina). En ambos casos la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 20 min. en alícuotas equivalentes a 1/3 de retina.

d) Dependencia de la actividad NAT ocular del tamaño corporal.

Puesto que los animales adultos utilizados en la presente Memoria proceden de la naturaleza, por lo cual existe una cierta variabilidad en el tamaño de los mismos, se estudió como afecta este parámetro en la actividad NAT ocular. Para lo cual se sacrificaron individuos postmetamórficos hembras de *R. perezii* con un peso corporal de 3 a 80 gramos, valorándose la actividad NAT de la retina neural aislada.

e) Correlación entre la actividad NAT de ambos ojos procedentes del mismo animal.

Se escogió el análisis regresión lineal como el mejor método estadístico, si la actividad NAT fuera idéntica en ambos ojos del mismo animal, los datos experimentales se deberían ajustar a la recta $Y = X$. Sin embargo, para obtener resultados válidos con este

método de análisis hay que tener en cuenta las siguientes precauciones. Los animales deben ser de tamaños muy similares para eliminar el efecto debido al tamaño de la retina sobre el resultado de la regresión, y además, los animales deben estar en el mismo momento dentro del fotociclo para eliminar los efectos del ritmo diario de la NAT.

Se escogieron diez animales adultos de *R. perezi* de un peso corporal entre 17 y 24 g. ($19,17 \pm 0,78$) y fueron todos sacrificados a la medianoche.

f) Diferencia día-noche en la actividad NAT.

En la primera parte, se estudió la evolución de la actividad NAT a lo largo del ciclo día/noche, para lo cual se seleccionaron dos puntos representativos del ciclo diario, mediodía y medianoche. A su vez se estudió el efecto de la luz sobre la actividad NAT nocturna exponiendo a individuos de *R. perezi* durante 10 minutos a una luz intensa (100 W).

En segundo lugar, se estudió la evolución diaria de las características cinéticas de la enzima respecto a la concentración de triptamina, utilizando retinas extraídas durante el mediodía y durante la medianoche.

2.2.1.2. Arilamina N-acetiltransferasa (A-NAT)

Las condiciones de mantenimiento de los animales utilizados en este apartado coinciden con las descritas en el apartado anterior para la AA-NAT. Excepto que el sacrificio se realizó durante el día.

g) Identificación de la actividad A-NAT en la retina.

En primer lugar, es necesario probar la existencia de la actividad A-NAT en la retina neural de *R. perezi*. Para ello, se utilizó p-fenetidina como sustrato específico de la A-NAT con retinas obtenidas durante el día, a fin de reducir a niveles basales la actividad AA-NAT. Se probaron dos factores distintos, el pH del tampón en el intervalo 6-8 y la concentración de p-fenetidina.

h) Interferencia de la A-NAT en el ensayo de la AA-NAT.

A fin de determinar si la A-NAT puede interferir en el ensayo de la NAT ocular, para lo cual se realizaron las siguientes aproximaciones experimentales:

- **Diferencias entre ambas actividades enzimáticas con respecto a la concentración de los sustratos del ensayo (triptamina y AcCoA).** Se realizó el ensayo de la actividad NAT en

retinas procedentes de animales durante el mediodía y durante la medianoche incubando cada ojo del mismo animal a dos concentraciones para cada cosustrato.

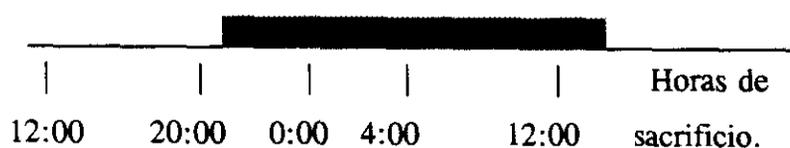
- **Valoración simultánea de ambas actividades enzimáticas.** A partir del mismo homogenado de retina y de forma simultánea se valoró la actividad AA-NAT, (utilizando triptamina 1 mM) y la actividad A-NAT, (p-fenetidina 5 mM). Estas determinaciones se realizaron con retinas procedentes de animales sacrificados a medianoche y a mediodía.

- **Cinética de la inhibición competitiva de la serotonina con respecto a los sustratos para ambas actividades NAT.** Para evaluar si existen diferencias en el proceso de catálisis entre las dos actividades NAT, se realizó el estudio cinético utilizando como un inhibidor competitivo para ambas enzimas la serotonina (100 μ M y 10 mM). La aparición de N-acetilserotonina por la acción enzimática no se valoró ya que se utilizó cloroformo para la extracción.

2.2.2 ESTUDIO ONTOGÉNICO DEL RITMO DE LA ACTIVIDAD NAT.

Debido al carácter nocturno de la NAT y a la limitación en el número de larvas disponibles, los puntos de muestreo diario se seleccionaron para conseguir un mayor número de puntos situados en la fase oscura del fotociclo diario, con el fin de caracterizar el perfil nocturno de la enzima.

Las horas de sacrificio se distribuyeron según el siguiente esquema:



Para la determinación del estado de desarrollo de los embriones y larvas se utilizaron las siguientes tablas:

- *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1967; NF)
- *R. perezi*, *D. pictus* y *B. calamita* (Gosner, 1960; G). Esta tabla de desarrollo ofrece una gran ventaja frente a las tablas específicas, pues se basa en caracteres externos fácilmente identificables en las especies de anuros utilizadas, facilitando así la comparación de los resultados.

El desarrollo larvario se dividió en las siguientes etapas:

1. Eclosión.

2. Comienzo de la ingestión.
3. Premetamorfosis.
4. Prometamorfosis.
5. Postmetamorfosis.

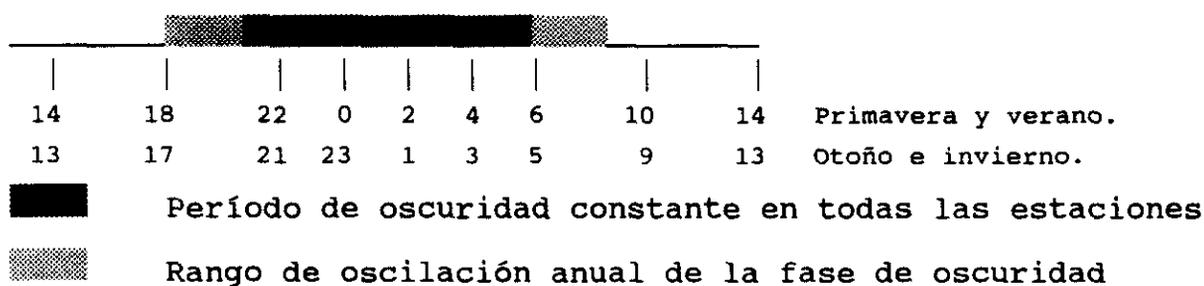
Debido al rápido desarrollo de las larvas en los primeros estados y al gran número de embriones necesarios, en el estado más temprano utilizado para *R. perezi* (estado 21-22, Tabla de Gosner, 1961) se utilizaron larvas obtenidas mediante fecundación *in vitro* en nuestro laboratorio. El resto de los estados para esta especie se utilizaron larvas obtenidas por puesta espontánea.

Para *D. pictus* y *B. calamita* sólo se utilizaron larvas en las etapas 4 y 5 de desarrollo.

2.2.3 RITMOS ESTACIONALES DE LA ACTIVIDAD NAT Y MELATONINA EN *R. perezi*.

Se utilizaron animales adultos de *R. perezi* de ambos sexos, con un peso corporal de 15-30 g, manteniéndose en el laboratorio en condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura. La alimentación se realizó de forma no forzada *ad libitum* con larvas de dípteros.

Los puntos seleccionados para la toma de muestras fueron distribuidos de la siguiente forma, cada cuatro horas durante la fase luminosa, y cada 2 horas durante la fase de oscuridad del fotociclo. Se utilizó un diseño por bloques para distribuir los animales atendiendo a sus pesos corporales. En todos los puntos estacionales, la recogida de las muestras comenzó en el primer punto correspondiente a la fase de luz (10 ó 9 h).



Las épocas del año elegidas para el estudio estacional de los niveles de MEL y NAT en la retina de *R. perezi*, corresponden a un mes después de los solsticios y equinoccios. Las condiciones

- Triptamina y Serotonina, (intervalo 0-10 mM).

Las caracterizaciones cinéticas se realizaron en el intervalo de temperaturas 10-35°C.

b) Efecto de la aclimatación térmica sobre la actividad NAT.

Para estudiar el efecto a largo plazo de la temperatura sobre la actividad NAT de la retina de *R. perezii*, se realizaron dos experimentos de aclimatación térmica:

- Efecto de la aclimatación sobre la cantidad de enzima.

Este experimento de aclimatación térmica se realizó con animales adultos de *R. perezii* aclimatados en las siguientes condiciones:

- Aclimatación a calor: 24 ± 1°C.
- Aclimatación a frío: 4 ± 1°C.
- Fotoperíodo: 12L:12D (para ambos grupos).
- Duración: 1 mes (Diciembre).

Los animales se sacrificaron en dos momentos distintos del fotociclo: a mediodía y a medianoche, que fueron tomados como puntos representativos del ciclo luz-oscuridad diario. Ambos ojos procedentes del mismo animal se sonicaron juntos con el fin de conseguir suficiente homogeneizado para llevar a cabo el ensayo de la NAT a tres temperaturas distintas (10, 20 y 30°C).

- Efecto de la aclimatación sobre las constantes cinéticas.

Las condiciones fueron las siguientes:

- Aclimatación a calor: 26 ± 1°C.
- Aclimatación a frío: 10 ± 1°C.
- Fotoperíodo: 12L:12D (para ambos grupos).
- Duración: 1 mes. (Mayo).

Los animales se sacrificaron en la mitad del período oscuro y todos los ojos correspondientes a cada grupo de aclimatación fueron homogeneizados juntos para realizar la caracterización cinética de la NAT.

La alimentación en ambos experimentos de aclimatación se realizó de forma forzada con hígado de pollo (0,5-0,7 g), tres veces por semana en el grupo aclimatado a calor, y una vez por semana en el grupo aclimatado a frío. Con este régimen de alimentación el peso corporal de los animales se mantuvo constante durante todo el período de aclimatación.

2.2.5 MODELO *in vitro* PARA EL ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA.

Para la realización de los experimentos de cultivo de copas ópticas se utilizaron animales adultos de *R. perezii* con un peso corporal de 15-25 gramos. Se aclimataron a fotoperíodo 12 L:12 D y temperatura 22-25°C durante al menos un período de 15 días antes del cultivo.

a) Síntesis de melatonina *in vitro* en copas ópticas de *R. perezii*.

En primer lugar se estudió la viabilidad de un modelo *in vitro* para el estudio de la producción de MEL por parte de la retina de *R. perezii*. Para ello se realizaron una serie de estudios previos con el fin de buscar las condiciones óptimas de cultivo, así como la capacidad de las copas ópticas de reproducir *in vitro* las características ya observadas *in vivo*. Se analizaron los siguientes puntos:

1. Cantidad óptima de tejido. Se cultivó durante un período de 12 horas (6 en luz, 6 en oscuridad), fracciones de copa óptica de *R. perezii* (1/4 y 1/2), comparándose con los resultados de NAT y MEL obtenidos cultivando las copas ópticas completas.
2. Cultivo de la retina neural aislada. Se estudió la viabilidad del cultivo de la retina neural aislada en lugar de la copa óptica completa, por un período de 12 horas.
3. Producción rítmica de melatonina. Se analizó la posibilidad de reproducir *in vitro* la síntesis rítmica diaria de MEL *in vivo*. Para lo cual se cultivaron copas ópticas de *R. perezii* durante un ciclo completo valorándose la MEL producida.

Para el estudio de los efectos de fármacos específicos sobre la síntesis de MEL por parte de copas ópticas de *R. perezii*, se escogió el período de las primeras 6 horas de la fase oscura, debido a que es el momento más sensible del ciclo frente a estímulos externos que sean capaces de modificar el ritmo.

4. Respuesta a la luz. Se evaluó cultivando copas ópticas en luz y en oscuridad durante las primeras 6 horas de la noche subjetiva. En el mismo experimento se probó si el forskolín

(50 μM), es capaz de contrarrestar el efecto de la luz sobre la síntesis de melatonina.

5. Efecto de los inhibidores de la síntesis de proteínas. En dos experimentos consecutivos se comprobó si la adición de actinomicina D (inhibidor de la transcripción) o de cicloheximida (inhibidor de la traducción) son capaces de alterar tanto el carácter rítmico de la actividad NAT, como de la MEL producida por las copas en cultivo.

b) Control catecolaminérgico de la síntesis de melatonina.

Se estudió la posible implicación de las catecolaminas en el control de la producción de MEL *in vitro*, que se ha demostrado que tienen un papel importante como reguladores de síntesis de MEL en los vertebrados. Se utilizó agonistas y antagonistas específicos de los siguientes receptores: β -, α_1 , α_2 -adrenérgicos, y D_1 -, D_2 -dopaminérgicos.

El diseño experimental utilizado fue el siguiente, los ojos se extrajeron durante la última hora del período diurno del fotociclo, preincubándose las copas ópticas hasta el comienzo de la fase oscura (30 min.). En este momento las copas ópticas fueron distribuidas de la siguiente forma:

- Grupo control (n=5)
- Agonista (n=5)
- Antagonista (n=5)
- Agonista + Antagonista (n=5).

El cultivo se llevó a cabo durante un período total de 6 horas (primera mitad de la noche subjetiva), cultivándose cada grupo experimental tanto en condiciones de luz como de oscuridad. El medio se renovaba totalmente cada 3 horas.

Los fármacos que se especifican a continuación fueron elegidos por su alta especificidad para los distintos receptores de catecolaminas, utilizándose una concentración final de 10 μM para estos fármacos en el medio de cultivo en todos los experimentos. Dicha concentración se consiguió añadiendo, al medio de cultivo, una alícuota de una solución concentrada de cada compuesto preparada el mismo día del experimento.

<u>RECEPTOR</u>	<u>AGONISTA</u>	<u>ANTAGONISTA</u>
β -Adrenér.	Isoproterenol (H ₂ O)	Propranolol (H ₂ O)
α_1 -Adrenér.	Fenilefrina (H ₂ O)	Prazosín (H ₂ O)
α_2 -Adrenér.	Clonidina (H ₂ O)	Yohimbina (H ₂ O)
D ₁ -Dopaminér.	SKF 38393 (ac.acético)	SCH 23390 (H ₂ O)
D ₂ -Dopaminér.	Quinpirol (ac.acético)	Sulpirida (ac.acético)

Cuando fue necesario disolver los fármacos en ac. acético glacial, la concentración final de este ácido en el medio fue 0,2 mM, añadiéndose una cantidad igual al medio de cultivo del grupo control. Dicha cantidad de ácido no alteró el pH del medio.

c) Sistemas de segundos mensajeros implicados en la producción de melatonina.

En esta parte del trabajo, se estudió la implicación de los mensajeros intracelulares más importantes en la regulación de la síntesis de MEL en las copas ópticas de *R. perezi*.

Los animales fueron preadaptados siguiendo el mismo protocolo utilizado para el estudio del control catecolaminérgico. El comienzo del cultivo dentro del fotociclo y la duración total del mismo, así como el número de copas ópticas por grupo experimental (n=5), fueron igualmente conservados.

Nuestro trabajo se centró en los siguientes sistemas:

- Sistema del AMP cíclico.

Cultivamos copas ópticas de *R. perezi* en condiciones de luz y oscuridad durante las primeras 6 horas de la fase oscura del fotociclo. A estas copas se les añadió un análogo del AMPc.

En una segunda parte, se cultivaron copas ópticas en luz (con el fin de mantener la síntesis de MEL en niveles basales), añadiendo al medio de cultivo el activador de la adenilato ciclasa (forskolin 50 μ M) y un inhibidor de las fosfodiesterasas IBMX (75 μ M y 1 mM).

- Sistema del GMP cíclico.

Una vez conocido el papel del AMPc, nos pareció interesante analizar la posible regulación de la producción ocular de MEL por parte de otro nucleótido cíclico (GMPc) capaz de funcionar como mensajero intracelular. Se cultivaron copas ópticas tanto en luz

como en oscuridad a las que se añadió el análogo lipófilo dibutiril-GMPc.

- Sistema del Calcio.

Nos propusimos estudiar el calcio como mensajero intracelular implicado en la síntesis de MEL. Se cultivaron copas ópticas en luz y oscuridad en presencia de EGTA, quelante específico de calcio con el fin de reducir el calcio disponible para las células en cultivo.

Consideramos interesante no sólo impedir la entrada del calcio a las células mediante EGTA, sino promover de forma artificial la entrada del mismo. Para lo cual se cultivaron copas ópticas en presencia de potasio a una concentración suficiente como para despolarizar las células, y permitir así la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Las soluciones de los fármacos utilizados en estos experimentos se obtuvieron a partir de una solución concentrada de cada uno de ellos preparada el mismo día del experimento, añadiéndose una alícuota al medio de cultivo hasta conseguir la concentración final deseada. En la siguiente tabla se indica el método utilizado para disolver los fármacos, así como la concentración final del disolvente en los medios de cultivo.

<u>FÁRMACO</u>	<u>DISOLVENTE (% Medio final)</u>	
Actinomicina D	DMSO	(0,1 %)
Cicloheximida	H ₂ O	
Forscolín	DMSO	(0,1 %)
IBMX	DMSO	(0,1 %)
dibutiril-AMPC	H ₂ O	
dibutiril-GMPc	H ₂ O	
EGTA	H ₂ O	
KCl	H ₂ O	(1:6)
Manitol	H ₂ O	(1:6)

En los medios de los grupos control se añadió una cantidad igual de cada disolvente para igualar la concentración final del mismo en todos los grupos de cada experimento.

Debido a la adición de una solución acuosa de EGTA al medio, en el experimento correspondiente, se hizo necesario reajustar el pH del mismo a 7,4 con NaOH 0,1 N.

En el experimento donde se probó el efecto del KCl, una solución acuosa de dicha sal fue añadida al medio de cultivo en una proporción 1:6 con el fin de conservar la osmolaridad del medio. En su correspondiente grupo control, el KCl se substituyó por manitol. Con este procedimiento la concentración total de solutos se incrementó sólo en 9,23 %.

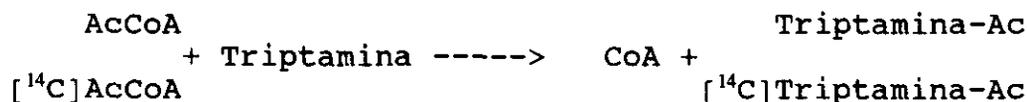
2.3. Técnicas Instrumentales.

2.3.1 RADIOENZIMOENSAYO DE LA ACTIVIDAD NAT.

a) Principio del ensayo.

Dentro de las células fotorreceptoras, la NAT realiza la transferencia de grupos acetilo desde el acetil-coenzima A (AcCoA) a la serotonina.

En el ensayo se incluye AcCoA marcado con ^{14}C en el grupo acetilo que es transferido a la amina aceptora por la acción de la enzima. Después de la incubación se separa el producto marcado formado por la acción de la enzima de la mezcla de reacción y se valora la radiactividad del extracto. La actividad enzimática es directamente proporcional a la cantidad de producto marcado formado.



b) Reactivos.

- **Tampón fosfato potásico 250 mM pH = 6,5.**

- KH_2PO_4 27,14 g/l.
- K_2HPO_4 8,725 g/l.
- Ajustar el pH con KOH 10 % (p/v).

- **EGTA (20 mM) en tampón fosfato.**

- EGTA 0,1522 g/20 ml de tampón fosfato 250 mM pH=6,5.
- Ajustar el pH a 6,5 con KOH 10% (p/v).

- **Solución de Bray.**

- Tolueno (grado centelleo) 667 ml.
- Triton X-100 (calidad centelleo) 333 ml.
- PPO 10 g.
- Dimetil POPOP 0,25 g.

La solución debe ser protegida de la luz directa.

- **Conservación de los reactivos.**

- La solución madre de AcCoA (10,5 mM) en tampón fosfato 0,25 M pH 6,5 se mantiene congelada a -25°C . Es estable al menos durante 6 meses.
- La solución de $[^{14}\text{C}]\text{AcCoA}$ (0,328 mM) se consigue por dilución del compuesto marcado en tampón fosfato 0,25 mM pH 6,5 (1 $\mu\text{Ci}/60 \mu\text{l}$). Las alícuotas de 100 μl se conservan congeladas a -25°C .

c) Procedimiento para la determinación de la NAT.

- Preparación de los homogeneizados.

Método A.

- Cada copa óptica se sonica en 300 μl de tampón fosfato potásico pH 6,5 EGTA 20 mM, tres veces durante 5 segundos, al 70% de la potencia de salida a 25 W.
- Centrifugación del homogeneizado durante 10 min. a 2000 g (4°C).
- El sobrenadante es utilizado para el ensayo.

Método B.

- La retina neural es extraída de la copa óptica inmersa en tampón fosfato sódico salino (0,1 M, NaCl 0,14 M, EGTA 10 mM, pH 7,2).
- Congelación en 300 μl de tampón fosfato potásico 0,25 M, pH 6,5 (EGTA 20 mM), conservándose a -25°C hasta la realización del ensayo.
- La retina neural se sonica, utilizándose después el homogeneizado directamente en el ensayo.

- Procedimiento del ensayo.

Previo al ensayo se preparan la solución de trabajo que consta de triptamina 100 mM suplementado con $[^{14}\text{C}]\text{AcCoA}$ en tampón fosfato potásico 0,25 M pH 6,5 (2.000 cpm/ μl)

- A cada tubo del ensayo se añaden:
 - 100 μl del homogeneizado de retina
 - 80 μl de AcCoA (125 μM)
 - 20 μl de la solución de trabajo (40.000 cpm/tubo).
- Los tubos blancos se realizan substituyendo el homogeneizado del tejido por 100 μl de tampón de homogeneización.
- Incubación durante 20 min. a 25°C .
- Parar la reacción con 1 ml de cloroformo frío.

- Agitar durante 1 min. La eficacia de extracción de la N-acetiltriptamina con cloroformo es del 98% (Parfitt et al., 1975).
- Centrifugación a 6000 g durante 1 min.
- Eliminar por aspiración el sobrenadante.
- Añadir 200 μ l de tampón fosfato y agitar durante 1 min.
- Centrifugar a 1500 g durante 10 min. Aspirar sobrenadante.
- Este proceso de lavado de la fase clorofórmica con tampón fosfato se repite dos veces.
- Recoger 0,5 ml fase de cloroformo en un vial y evaporación a temperatura ambiente.
- Reconstitución del residuo seco en 100 μ l de etanol. Añadir 2 ml de solución de Bray.
- Contaje de la radiactividad.

La eficacia del contaje se calculó mediante las colas del canal de contaje, utilizando estándares externos de [14 C] para obtener la curva de calibración. La eficacia fue siempre superior al 95 %.

- Variaciones del ensayo para ojos de larvas de anuros.

Para la realización del ensayo de la actividad NAT de ojos procedente de larvas de anuros, debido a la menor cantidad de tejido, se incrementó la sensibilidad del ensayo reduciendo el volumen total de reacción de 200 a 100 μ l. Cada tubo del ensayo contiene:

- 50 μ l homogeneizado de ojos de larvas.
- 30 μ l de AcCoA (166,66 μ M).
- 20 μ l de solución de trabajo [14 C]AcCoA-Triptamina 50 mM, (40.000 cpm/tubo).

Las concentraciones finales de AcCoA (50 μ M) y triptamina (10 mM) se conservan respecto a las concentraciones utilizadas para el ensayo en la retina de adultos.

- Utilización de serotonina como sustrato.

Cuando el ensayo de la actividad NAT se realiza utilizando serotonina como sustrato, la extracción se realiza con alcohol isoamilo en lugar de cloroformo. La eficacia de extracción de la N-acetilserotonina con este disolvente es del 90% (Deguchi y Axelrod, 1972), el resto de las condiciones del ensayo se mantienen iguales.

Cuando los resultados se comparan con los obtenidos con triptamina utilizando el mismo homogeneizado, la actividad enzimática se corrige respecto al porcentaje de recuperación (apartado 5.e de resultados).

- Valoración de la actividad A-NAT.

Para la determinación de la actividad A-NAT se utilizó p-fenetidina como amina aceptora de grupos acetilo, el resto de las condiciones del ensayo se mantuvieron constantes. Como tampón del ensayo se utilizó tampón fosfato potásico 250 mM pH=7.

La preparación de la solución de p-fenetidina, se realizó mezclando en una proporción 1:1 p-fenetidina con DMSO. A continuación se añade tampón fosfato hasta alcanzar la concentración deseada de la amina. Las concentraciones finales de los substratos en el ensayo fueron:

- AcCoA 50 μ M.
- p-fenetidina 5 mM.

La p-fenetidina acetilada puede ser extraída de la mezcla de reacción mediante cloroformo (eficacia de extracción de la N-acetilfenetidina 95%, Voisin et al, 1984), cuantificándose la actividad enzimática de forma análoga a la AA-NAT.

d) Cálculo de resultados.

La actividad enzimática se calcula a partir de las cpm valoradas en el extracto clorofórmico de la mezcla de reacción. Para lo cual ha de tenerse en cuenta la cantidad total de AcCoA añadida (incluyendo AcCoA y [14 C]AcCoA) en el tubo de ensayo.

$$\text{NAT}(\text{nmol}/\text{tubo}) = \frac{[\text{cpm}(\text{muestra}) - \text{cpm}(\text{blanco})]}{\text{cpm}(\text{totales})} \times \text{AcCoA}(\text{nmol}) \times 2$$

El resultado obtenido debe ser multiplicado por 2 debido a que sólo se valora la mitad del extracto total (500 μ l).

Para expresar los resultados en nmol de producto formado por hora y por órgano se debe hacer la siguiente corrección:

$$\text{NAT}(\text{nmol}/\text{h}/\text{ojo}) = \frac{\text{NAT}(\text{nmol})}{\text{tiempo reacción}(\text{h}) \times \text{fracción órgano}}$$

Cuando la preparación de los homogeneizados se realizó siguiendo el método B, los resultados de la actividad NAT se expresaron referidos a mg proteína de retina neural.

2.3.2 RADIOINMUNOENSAYO DE MELATONINA.

a) Principio del ensayo.

El radioinmunoensayo (RIA) se basa en la inhibición competitiva entre un antígeno marcado radiactivamente y un antígeno sin marcar por un anticuerpo específico. Se establece un equilibrio químico entre las formas unidas y libre del antígeno, gobernado por la constante de afinidad del anticuerpo por el antígeno. En el caso de que la concentración de antígeno marcado y del anticuerpo sean constantes, existe una relación entre la concentración de antígeno frío y la proporción del marcador desplazada del complejo antígeno-anticuerpo, una vez alcanzado el equilibrio tras la incubación. Esta característica permite estimar concentraciones desconocidas del antígeno (u hormona) en una muestra por comparación de la cantidad del marcador unido al anticuerpo con una curva estándar hecha con concentraciones conocidas de hormona verdadera.

Para poder llevar a cabo una cuantificación correcta, es necesario poder separar de forma fiable las fracciones libre y unida del marcador, para lo cual existen varios métodos:

- Separación por adsorción. Mediante una mezcla de partículas de carbón activado y dextrano, se consigue que el marcador libre se una a dichas partículas y que los complejos antígeno-anticuerpo permanezcan solubles, la radiactividad remanente se cuantifica en el sobrenadante. Este método se utiliza con marcadores emisores de radiación β (^3H , ^{14}C).

- Separación por precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo. Dicha precipitación se suele conseguir con el uso de un 2° anticuerpo contra las inmunoglobulinas de la especie animal productora del primer anticuerpo. La radiactividad se mide en el precipitado (fracción unida). Este método se utiliza generalmente cuando el marcador emite radiación γ (^{125}I , ^{131}I). Este segundo método fue el utilizado en el RIA de MEL. Como 2° anticuerpo se utilizó suero de asno inmunizado contra inmunoglobulinas de conejo.

b) Reactivos.

- Tampón del RIA.

· Tricina

17,9 g/l.

- NaCl 9,0 g/l.
- Gelatina 2,0 g/l.
- Azida sódica 0,5 g/l.

Se ajusta a pH = 8 con NaOH. Conservación a 4°C. Duración máxima 4-5 días.

- Anticuerpos.

El anticuerpo antimelatonina (Stockgrand RR/19549-16876) se disuelve previamente en 2 ml de H₂O destilada. Tanto el anticuerpo antimelatonina, como el suero de conejo y el segundo anticuerpo se mantuvieron congelados a -25°C, divididos en alícuotas para ser utilizadas en series de 50 ó 100 tubos de RIA.

- Curva estándar de melatonina.

Para la realización de la curva estándar de MEL se parte de una solución madre (1 mg/ml). Dicha solución se prepara disolviendo la MEL en etanol absoluto, añadiendo a continuación H₂O destilada hasta una concentración final de etanol del 20 %. Se conserva a 4°C. La solución es estable al menos 1 año.

A partir de dicha solución madre de MEL (1 mg/ml) se realizan las siguientes diluciones:

- Solución A (10 ng/ml): mediante dos diluciones sucesivas en H₂O de la solución madre de MEL (dilución final 1:100000).
- Dilución en tampón del RIA de la solución A, para conseguir dos diluciones (1:25 = 400 pg/ml y 1:500 = 20 pg/ml).
- Partiendo de las diluciones de 400 pg/ml y 20 pg/ml, se obtienen las siguientes concentraciones de MEL en un volumen final de 0,5 ml:.

1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 pg de MEL.

c) Método de extracción de melatonina.

El contenido de melatonina ocular se ha valorado en el complejo retina-epitelio pigmentado, debido a que este último contiene la mayor parte de la melatonina ocular (Zawilska e Iuvone, 1989; Skene et al., 1991; Barret y Underwood, 1991).

- Con ayuda de una lupa binocular se separa el complejo retina neural-epitelio pigmentado de la esclerótica.
- Sonicación en 300 µl de tampón del RIA (sin gelatina).
- Se retira una alícuota de homogeneizado (20 µl) para la valoración de proteínas.

- Adición de 1,5 ml de diclorometano. Agitación 10 veces, 20 segundos.
- Centrifugación (3500 g, 15°C) durante 15 min. Aspiración de la fase acuosa y de la interfase proteica.
- Adición de 0.3 ml de tampón bicarbonato 0,1 M (Ph 10). Agitación 3 veces, 20 segundos.
- Centrifugación (1500 g, 15°C) 5 min. y aspiración de la fase acuosa.
- Congelar los restos de fase acuosa con acetona enfriada con hielo seco.
- Después de la decantación, la fase de diclorometano se evapora bajo atmósfera de N₂.
- Reconstitución añadiendo 10 µl de etanol absoluto. Agitar hasta la disolución completa del precipitado. Adición de 1,1 ml de tampón del RIA.

d) Procedimiento del RIA.

- Pipetear 0,5 ml de cada uno de los puntos la curva estándar y las muestras.
 - Añadir 100 µl del anticuerpo antimelatonina diluido 1:200 en el tampón del RIA.
 - Añadir 100 µl de MEL marcada (10.000 cpm/tubo).
 - Incubación 15-18 horas a 4°C.
 - La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó añadiendo:
 - 100 µl del 2° anticuerpo diluido (1:20) en tampón de RIA
 - 100 µl suero de conejo diluido (1:200) en tampón del RIA
 - 500 µl polietilenglicol 6% (p/v).
 - Agitación, e incubación 4 horas a 4°C.
 - Centrifugar 40 minutos a (3500 g, 4°C).
 - Decantación rápida del sobrenadante y escurrir totalmente el sobrenadante sobre papel de filtro.
 - Medir la radiactividad en el precipitado (contador τ).
- Eficacia del canal de ¹²⁵I 70%.

e) Cálculo de resultados.

Para la realización del RIA deben incluirse los siguientes tubos controles:

- Cuentas totales (T). Indica la cantidad total de marcador añadido a todos los tubos.
- Unión máxima (Bo). Dichos tubos no tienen hormona fría, representando la unión máxima del marcador al anticuerpo (estándar 0).
- Unión inespecífica (NSB). En este tubo no existe anticuerpo y define la unión no específica del marcador al tubo de ensayo.

A partir de estos tubos y de los obtenidos de la curva estándar se realizarán los siguientes cálculos:

$$\text{Capacidad de unión (\%)} = (Bo - NSB) / T \times 100$$

$$\text{Unión inespecífica (\%)} = NSB / T \times 100$$

Unión para estándares y muestras (Y):

$$Y (\%) = [\text{muestra}(\text{cpm}) - NSB] / [Bo(\text{cpm}) - NSB] \times 100$$

La representación gráfica de la curva estándar puede realizarse de las siguientes formas:

- Y frente a [H] (lineal-lineal). Da lugar a una curva de perfil hiperbólico, tiene la ventaja que los datos representados no sufren ninguna transformación, evitándose así los errores asociados a ella.
- Y frente a log[H] (lineal-logarítmica). La curva resultante tiene un perfil sigmoideo, se aprecia con claridad el intervalo de la curva con mayor precisión, que corresponde a la mayor pendiente.
- Logit(Y) frente a log[H] (logit-logarítmica). La transformación logística de Y da lugar a líneas rectas.

$$\text{Logit}(Y) = \log(Y / (100 - Y))$$

Simplifica el análisis matemático, pero tiene el inconveniente de que la doble transformación conlleva errores importantes en la estimación de los resultados.

El cálculo de las concentraciones de las muestras se puede realizar utilizando varios métodos:

- **Método de regresión lineal.** Los datos de la curva estándar son transformados aplicando la transformación logística a la unión específica y la logarítmica a las concentraciones, se consigue pues la linealización de la curva estándar, permitiendo el uso del método de los mínimos cuadrados para obtener la regresión lineal. Este método sólo produce resultados aceptables cuando las

muestras entran en la parte central de la curva (Y situado entre 10 % y 90 % del B_0).

- **Función hiperbólica.** A partir de la ecuación general de una curva hiperbólica y utilizando métodos de regresión no lineal se ajusta la curva de este tipo a los puntos estándares.

- **Métodos de interpolación.** Estos métodos no están basados en modelos matemáticos concretos. Se conectan los puntos estándares consecutivos mediante segmentos de funciones matemáticas, que pueden ser líneas rectas o curvas de 2° ó 3° grado.

El método utilizado en la presente Memoria se basa en un método de interpolación utilizando segmentos de curvas de 3° grado, estos segmentos son unidos para obtener una curva continua con un mínimo de oscilaciones, para conseguirlo el proceso es repetido varias veces por cálculo iterativo asistido por ordenador.

f) Criterios de validez del RIA. (Midgley et al., 1969).

El método de RIA de MEL utilizado en esta Memoria está basado en el protocolo utilizado para la valoración de MEL en plasma mediante RIA directo (Fraser et al., 1983), al cual se le han añadido algunas modificaciones: se usa un marcador yodado y un anticuerpo de conejo obtenido frente a la MEL conjugada en posición 2 con albúmina sérica humana. Este método ha sido adaptada por nosotros para su utilización en *R. perezii* (ver resultados apartado 2.).

Los criterios de validez que debe cumplir un RIA son los siguientes:

- **Especificidad.** Es la capacidad del anticuerpo de discernir selectivamente entre varios compuestos químicamente relacionados con la hormona a valorar y que podrían existir en las muestras biológicas. Se calcula como los coeficientes de reacción cruzada, que representan la relación en tanto por ciento entre las concentraciones de hormona y el compuesto similar, necesarios para obtener un desplazamiento del 50 % de una cantidad conocida de marcador.

En nuestro caso, el anticuerpo antimelatonina utilizado ha sido previamente caracterizado (Fraser et al., 1983) obteniéndose las siguientes reacciones cruzadas con varios compuestos indólicos:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
Melatonina	100
6-Hidroximelatonina	5,33
6-Sulfatoximelatonina	0,229
N-acetil-5-hidroxitriptamina	0,084
Ac. 5-Hidroxi-indolacético	0,080
5-Metoxitriptamina	<0,003
N-acetiltriptófano	<0,003
5-Metoxitriptofol	<0,003
Triptófano	<0,0003

- **Paralelismo.** Entre la curva estándar y una serie de diluciones de una muestra. Este método de validación es utilizado como un índice de la similitud de la inmunoreactividad entre el compuesto estándar y el valorado en la muestra. La existencia del paralelismo muestra que el factor de dilución utilizado no afecta a la estimación de la concentración final de hormona.

- **Recuperación.** Se define como la diferencia en tanto por ciento entre el valor estimado mediante RIA y la cantidad real de hormona añadida. En el caso de que se realice utilizando varias concentraciones de hormona, debe establecerse una correlación lineal entre la cantidad real y la estimada.

- **Sensibilidad.** Se define como la menor concentración de hormona que puede ser discriminada de la unión máxima (B_0) con una $p < 0,05$. La sensibilidad se calcula como el punto que dista del B_0 en 2 veces su desviación estándar.

- **Precisión y reproductibilidad.** Se mide por medio de los coeficientes de variación (desviación típica/media %) intra- e interensayo, determinados a varias concentraciones de la curva estándar. Dichos parámetros muestran la reproductibilidad del método bajo las condiciones del ensayo utilizadas. Dichos coeficientes deben ser siempre inferiores a la variabilidad encontrada en las muestras biológicas.

2.3.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se utilizó el método descrito por Lowry et al., 1951.

a) Reactivos.

- Tartrato Na-K (2 %): 2 g en 100 ml de H₂O.

- CuSO_4 (1 %): 1 g en 100 ml de H_2O .
- Solución B: NaOH 1 g + Na_2CO_3 5 g en 250 ml de H_2O .
- Solución C: 1 ml CuSO_4 (1 %) + 1 ml tartrato (2 %) en 100 ml de solución B.

b) Procedimiento.

- Añadir 2,5 ml de la solución C a 0,5 ml de muestra.
- Agitar e incubar 15 minutos a 30°C .
- Añadir 0,25 ml de reactivo Folin: H_2O (1:1).
- Agitar e incubar 30 minutos a 30°C .
- Lectura de la absorbancia a 505 nm.
- Patrón de seroalbúmina bovina (BSA) en el intervalo 5-400 μg .

2.3.4 MÉTODO DE CULTIVO ESTÁTICO.

a) Preparación del medio de cultivo.

· DME ("Dulbecco modified Eagle Medium")	6,6 g/l.
· Ácido ascórbico (0,1 mM)	17,6 mg/l.
· HEPES (7,5 mM)	1,785 g/l.
· Albúmina sérica bovina	0,75 g/l.
· NaHCO_3 (35 mM)	2,94 g/l.
· Gentamicina	50 mg/l.

Después de la disolución completa de los componentes en agua bidestilada, el medio se satura con carbógeno (95% O_2 : 5% CO_2). Ajustar el pH a 7,4 con NaOH 0,1 M.

En tiempos de cultivo de 6 horas de duración o inferiores no se añadió gentamicina al medio.

La presión osmótica calculada del medio es 224,87 mOsmoles.

b) Procedimiento general del cultivo.

Tras la disección de las copas ópticas, siguiendo el método explicado en la sección 2.1.1, éstas fueron sometidas a un período de preincubación de 30 minutos en 6 ml medio de cultivo antes del comienzo del cultivo. Dicho período es necesario tanto para conseguir la acomodación del tejido ocular al medio, como para lavar la MEL contenida en la copa óptica en ese momento.

Tras esta preincubación, las copas fueron colocadas individualmente en placas de cultivo de 24 pocillos con un

volumen de medio de 1,5 ml/pocillo. Una vez situadas las copas en los pocillos, las placas se colocaron en cámaras herméticamente cerradas, las cuales se saturaron con carbógeno. Dependiendo de las condiciones de cultivo, dichas cámaras fueron transparentes (cultivo en luz), o totalmente negras (cultivo en oscuridad).

La incubación se realizó a una temperatura de $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$, introduciendo las cámaras herméticas en un baño termostatzado. El cultivo en condiciones de luz se realiza exponiendo las cámaras transparentes a la luz proporcionada por tubos fluorescentes (intensidad total 45 W).

Los cambios de medio se realizaron rutinariamente cada 3 horas, las alícuotas resultantes de 1,5 ml del medio se congelaron a -25°C hasta el momento del ensayo de MEL.

Al final del período de incubación, las retinas neurales fueron extraídas de las copas ópticas con ayuda de una lupa binocular, para la valoración de la actividad NAT en las mismas.

2.4. Métodos de calculo y estadística.

2.4.1 MÉTODOS DE REGRESIÓN.

a) Comparación de la pendiente de dos rectas.

En algunas ocasiones resulta necesario probar si las líneas de regresión obtenidas a partir de varios conjuntos de datos análogos son iguales, para lo cual se comparan las pendientes de ambas rectas, con el fin de averiguar si ambas proceden de la misma población.

Para llevar a cabo dicho análisis se utiliza un ANOVA en el cual se compara, mediante un estadístico F, el cuadrado medio debido a la diferencia entre las distintas pendientes (variación entre regresiones), con el promedio ponderado de las desviaciones respecto de la regresión (variación dentro de las regresiones). Si dicho estadístico es mayor que el valor crítico $F_{\alpha,1,n-2}$, entonces se concluye que las pendientes son estadísticamente diferentes y que los datos proceden de poblaciones distintas (Sokal y Rohlf, 1979).

Este test estadístico ha sido utilizado para comparar las pendientes de las representaciones de Arrhenius de las cinéticas enzimáticas y en la validación del RIA de MEL (paralelismo entre

muestras biológicas y curvas estándares del RIA, previa transformación logística-logarítmica para conseguir la linealización de las curvas).

b) Regresión potencial.

Para comparar el crecimiento de los distintos órganos de un animal normalmente se utiliza el modelo de crecimiento alométrico, basado en que el cociente entre incrementos de dos estructuras de diferente tamaño debe permanecer constante (Sokal y Rohlf, 1979). El modelo matemático que cumple esta premisa es una función potencial.

$$\text{Curva de crecimiento alométrico } Y = a X^b$$

La transformación logarítmica de las dos variables modifica la relación potencial en una relación lineal, permitiendo así aplicar el análisis de regresión lineal, que es el análisis estadístico más utilizado para este tipo de estudios.

$$\text{Log}(Y) = \text{Log}(a) + b \text{Log}(X)$$

La regresión potencial se utilizó para evaluar la dependencia de la actividad NAT respecto al tamaño del animal.

c) Regresión no lineal con dos parámetros.

Frecuentemente, el análisis de los datos experimentales requiere la comparación de estos con algún modelo matemático concreto. La aplicación de la regresión lineal se encuentra limitada pues, a los casos en que se supone una relación lineal entre las variables dependiente e independiente. Cuando esto no se cumple se puede optar por la aplicación de una serie de transformaciones matemáticas de los datos, con el fin de conseguir la linealización de las variables. En el caso concreto del estudio de las constantes cinéticas, el perfil hiperbólico de la relación entre concentración de substrato y velocidad de reacción puede linealizarse mediante la transformación doble recíproca (método de Lineweaver-Burk).

$$V = V_{\max} \times \frac{S}{S + K_M} \Rightarrow \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{S}$$

$$\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$$

$$Y = a + b X$$

Cualquier transformación de los datos originales lleva asociada una serie de sesgos que afectan a la estimación de las constantes cinéticas. Esto se elimina si los datos experimentales son ajustados directamente a una curva hiperbólica. Para lo cual es necesario el uso de la regresión no lineal.

Para cualquier función no lineal $f(x, c)$ definida por varios parámetros (c) que han de ser estimados, se puede realizar una aproximación lineal del siguiente tipo:

$$f(x, c) \approx f(x, c_0) + (c - c_0) \times \frac{\partial f(x, c_0)}{\partial c}$$

Esto corresponde al desarrollo de Taylor ignorando los términos de orden mayor de 1. En este caso, c_0 sería la estimación provisional del parámetro c . El valor no es exacto debido a que se desprecian los términos de orden elevado de la serie de Taylor. El proceso de cálculo se repite una serie de veces (cálculo iterativo), con el fin de reducir el cuadrado medio debido al error (parámetro que mide la bondad del ajuste de la curva teórica a los datos experimentales), obteniéndose así una aproximación mayor de la estimación de c a su verdadero valor. El error estándar de la estimación del parámetro se calcula a partir de la desviación media de los puntos experimentales respecto a la curva de regresión.

d) Regresión no lineal con tres parámetros.

El método de aproximación descrito por Duggleby en 1981, tiene la ventaja de una gran flexibilidad en su aplicación a modelos matemáticos, debido a que los cálculos se realizan a partir de las diferencias entre los resultados experimentales y los estimados a partir del modelo matemático.

Para una función $y = f(x, c_1, c_2, c_3)$ con tres parámetros se obtiene la siguiente aproximación lineal:

$$z = (y - \hat{y}) = \delta_1 p_1 + \delta_2 p_2 + \delta_3 p_3$$

- \hat{y} , valor calculado de y a partir del modelo matemático.
- z , diferencia entre el valor experimental y el teórico.

- δ_i , corrección del parámetro c_i .
- p_i , derivada parcial de f respecto al parámetro c_i .

Los sumatorios a utilizar son:

$$\begin{aligned} s_1 &= \Sigma(p_1)^2 & s_2 &= \Sigma(p_2)^2 & s_3 &= \Sigma(p_3)^2 \\ s_{12} &= \Sigma p_1 \cdot p_2 & s_{13} &= \Sigma p_1 \cdot p_3 & s_{23} &= \Sigma p_2 \cdot p_3 \\ s_{y1} &= \Sigma z \cdot p_1 & s_{y2} &= \Sigma z \cdot p_2 & s_{y3} &= \Sigma z \cdot p_3 \\ s_{yy} &= \Sigma z^2 \end{aligned}$$

Mediante cálculo de los determinantes se obtiene:

$$\Delta = \begin{vmatrix} s_1 & s_{12} & s_{13} \\ s_{12} & s_2 & s_{23} \\ s_{13} & s_{23} & s_3 \end{vmatrix} \quad \delta_1 = \begin{vmatrix} s_{y1} & s_{12} & s_{13} \\ s_{y2} & s_2 & s_{23} \\ s_{y3} & s_{23} & s_3 \end{vmatrix} / \Delta$$

$$\delta_2 = \begin{vmatrix} s_1 & s_{y1} & s_{13} \\ s_{12} & s_{y2} & s_{23} \\ s_{13} & s_{y3} & s_3 \end{vmatrix} / \Delta \quad \delta_3 = \begin{vmatrix} s_1 & s_{12} & s_{y1} \\ s_{12} & s_2 & s_{y2} \\ s_{13} & s_{23} & s_{y3} \end{vmatrix} / \Delta$$

$E_r = s_{yy}/(n-3)$ (Cuadrado medio debido al error, se pierde un grado de libertad por cada parámetro del modelo estimado).

Las nuevas estimaciones de las constantes se obtienen sumando los correspondientes δ_i a los valores de c_i :

$$c_i = c_i^0 + \delta_i$$

La repetición del cálculo mediante un proceso iterativo da lugar a una estimación fiable de los parámetros después de 10 ó 12 iteraciones. Durante este proceso los valores de δ_i tienden a 0 (la sucesión converge), en este momento los errores de la estimación de los δ_i coinciden con los errores de los parámetros c_i correspondientes.

$$EE(\delta_1) = \sqrt{E_r} \times \sqrt{\left(\frac{s_2 s_{23}}{s_{23} s_3} \right) / \Delta} \quad EE(\delta_2) = \sqrt{E_r} \times \sqrt{\left(\frac{s_1 s_{13}}{s_{13} s_3} \right) / \Delta}$$

$$EE(\delta_3) = \sqrt{E_r} \times \sqrt{\left(\frac{s_1 s_{12}}{s_{12} s_2} \right) / \Delta}$$

2.4.2 ESTIMACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS.

a) Ecuación de Michaelis-Menten.

La aplicación de este método de regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten fue descrita por Wilkinson en 1961. Consiste en la siguiente aproximación lineal.

$$v \approx b_1 \times f(s, V_{\max}^0, K_M^0) + b_2 \times \frac{\partial f(s, V_{\max}^0, K_M^0)}{\partial K_M}$$

$$b_1 = \frac{V_{\max}}{V_{\max}^0} \quad b_2 = b_1 \times (K_M - K_M^0)$$

$f(s, V_{\max}^0, K_M^0)$ Ecuación de Michaelis-Menten

Las estimaciones iniciales de los parámetros V_{\max}^0 y K_M^0 se obtienen mediante el método de Lineweaver-Burk. Utilizando estas estimaciones provisionales se procede a la aproximación partiendo de los siguientes sumatorios:

$$s_1 = \Sigma (b_1)^2 \quad s_2 = \Sigma (b_2)^2 \quad s_{12} = \Sigma b_1 \cdot b_2$$

$$s_{v1} = \Sigma v \cdot b_1 \quad s_{v2} = \Sigma v \cdot b_2 \quad s_{vv} = \Sigma v^2$$

Mediante cálculo de los determinantes se obtiene:

$$\Delta = \begin{vmatrix} s_1 & s_{12} \\ s_{12} & s_2 \end{vmatrix} \quad D_1 = \begin{vmatrix} s_{v1} & s_{12} \\ s_{v2} & s_2 \end{vmatrix} / \Delta \quad D_2 = \begin{vmatrix} s_1 & s_{v1} \\ s_{12} & s_{v2} \end{vmatrix} / \Delta$$

$$Er = (s_{vv} - D_1 \cdot s_{v1} - D_2 \cdot s_{v2}) / (n-2) \quad (\text{cuadrado medio debido al error}).$$

Las estimaciones nuevas de las constantes y sus errores son:

$$V_{\max} = V_{\max}^0 \times D_1 \quad K_M = K_M^0 + D_2 / D_1$$

$$EE(V_{\max}) = V_{\max} \times \sqrt{Er} \times \sqrt{(s_2 / \Delta)} \quad EE(K_M) = (\sqrt{Er} \times \sqrt{(s_1 / \Delta)}) / D_1$$

El cálculo puede repetirse en un bucle iterativo, obteniéndose las estimaciones ajustadas en 5 ó 6 iteraciones consecutivas.

b) Cinética con inhibición por exceso de sustrato.

Se aplicó el método de cálculo de regresión no lineal con tres parámetros para la estimación de los parámetros típicos de la cinética enzimática con inhibición por exceso de sustrato. En este caso los parámetros a estimar fueron K_M , K_i y V_{\max} .

2.4.3 RITMOS DIARIOS DE MELATONINA Y ACTIVIDAD NAT.

a) Análisis estadístico.

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{S}{K_i}}$$

K_M = Constante de Michaelis
 K_i = Constante de inhibición
 V_{\max} = Velocidad máxima

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos durante ciclos diarios, se utilizó un ANOVA de una vía con el fin de probar la existencia de un ritmo diario, es decir, que las diferencias entre los valores obtenidos en distintos puntos del ciclo sean significativas.

Si el ANOVA anterior es significativo, se pasa a averiguar en que puntos nocturnos el parámetro estudiado (NAT o MEL) se encuentra elevado sobre los niveles basales (diurnos). En primer lugar, debe comprobarse que no existen diferencias significativas entre los puntos diurnos, si esto es así, se comparará el valor medio diurno con los distintos puntos nocturnos del ciclo utilizando el test de Student-Newman-Keulst para comparaciones múltiples. En el caso de que sí existan diferencias significativas entre los distintos puntos diurnos, para las comparaciones múltiples con los puntos nocturnos, se toma como referencia el último punto de la fase luminosa del ciclo.

Debido al método utilizado en la estimación de los valores de MEL sobre una función curvilínea (curva estándar del RIA), aparece una marcada correlación entre la desviación y la media de los datos, con lo cual no se cumple la condición de homogeneidad de las varianzas, requisito para la aplicación del ANOVA. Para conseguir esta homocedasticidad se realizó la transformación logarítmica de los valores de MEL, tras esta transformación se aplicó el test de Bartlett para probar si la homogeneidad de varianzas se ha conseguido.

Cuando los niveles de MEL fueron inferiores al límite de sensibilidad del ensayo, se tomó este último como valor para el análisis estadístico de los datos.

b) Modelización de los ritmos diarios.

El ritmo diario de la actividad NAT, tanto para individuos adultos de *R. perezi* como para larvas de anuros, fue ajustado a una función cíclica de tipo sinusoidal. Se utilizó el método de Duggleby (1981) para ajustar los datos experimentales al modelo:

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

Los parámetros estimados fueron:

- A_0 , Nivel medio o "mesor". Indica la media de los datos ajustada al ritmo sinusoidal.
- A_1 , Amplitud sinusoidal. Indica la oscilación de la función sinusoidal a partir del valor de A_0 .
- φ , fase. Indica el desplazamiento de la curva sinusoidal respecto al origen, su valor coincide con el momento del máximo nocturno.

El tiempo (t) que se representa en horas debe ser transformado a radianes para introducirlo en el modelo. El período de la curva sinusoidal, en nuestro caso, toma el valor de 24 horas (24 horas = 2π radianes).

Para los ritmos de MEL ocular se utilizó una curva gaussiana cíclica debido al perfil en forma de campana que presenta la distribución de los valores experimentales.

$$y=A+H \times \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{\sin(t \times \pi/24-\varphi)}{\sigma+\delta \times \sin(t \times \pi/12-\varphi)}\right)^2\right)$$

Los parámetros a estimar son:

- A, Nivel basal. Representa el nivel constante de la MEL a través de todo el ciclo diario.
- H, Altura gaussiana. Representa la altura máxima del pico nocturno sobre el nivel basal.
- σ , Anchura gaussiana. Este parámetro se encuentra relacionado con la duración del pico nocturno.
- δ , coeficiente de asimetría.
- φ , fase. Muestra el desplazamiento de la curva respecto al origen de tiempos. El valor corresponde con el momento del máximo nocturno.

El modelo propuesto por Vivien-Roëls y colaboradores (1979) es válido cuando el máximo de MEL se encuentra centrado en la fase oscura. Si el máximo nocturno no tiene lugar a medianoche dicho modelo no puede describir de forma fiable el ritmo. Por ello, es necesario incluir un nuevo parámetro (δ) que modifica el perfil del pico, este parámetro indica la asimetría del pico nocturno, pudiendo tomar valores desde $-\sigma$ a $+\sigma$. Cuando $\delta = 0$ la curva es simétrica respecto al máximo. Si $\delta > 0$ el máximo se

encuentra retrasado respecto a la medianoche, en cambio cuando $\delta < 0$ el máximo nocturno tiene lugar en la primera parte de la fase oscura.

El método de cálculo de Duggleby (1981) fue utilizado para la estimación de los parámetros del modelo gaussiano cíclico, pero debido a que este método sólo puede estimar 3 parámetros simultáneamente, mientras que el modelo de la curva gaussiana tiene 5 (A , H , σ , δ y φ), el cálculo fue repetido en varias veces sucesivas hasta obtener la estimación de todos los parámetros. El orden de cálculo fue:

- 1°. Estimación de A , H , φ
- 2°. Estimación de A , H , σ
- 3°. Estimación de H , σ , φ

La relación entre los parámetros que determinan la anchura del pico (σ y δ) y el tiempo durante el cual los niveles nocturnos de MEL se mantienen elevados, se calcula a partir de las dos soluciones (+ y -) de la siguiente ecuación implícita.

$$\begin{aligned} \left(\begin{array}{c} + \\ - \end{array} \right) t &= 24/\pi \times \arcsen \left[c \left(\sigma + \delta \times \sen \left(\left(\begin{array}{c} + \\ - \end{array} \right) t \times \pi / 12 \right) \right) \right] \\ c &= 1,17741 \rightarrow t_{50} = [(-) t, (+) t] \end{aligned}$$

Las soluciones de dicha ecuación definen los límites del intervalo de tiempo durante el cual los niveles de MEL se encuentran por encima de un determinado límite definido por el parámetro c . En nuestro caso, cuando $c = 1,17741$ el intervalo definido (t_{50}) muestra el período de tiempo durante el cual la MEL es superior a la mitad de la altura máxima del pico gaussiano.

Para ambos modelos (curvas sinusoidal y gaussiana) se consideró como origen del tiempo la medianoche (hora 0). En las condiciones experimentales utilizadas por nosotros se consideró que la duración del ciclo completo fué de 24 horas.

Para determinar la consistencia del ritmo, tanto para el modelo sinusoidal como el gaussiano, se utilizó la razón señal/ruido como estadístico. Cuando este parámetro es menor que 0,3 se considera que la existencia del ritmo es significativa. (Halberg y Reinberg, 1967). El coeficiente señal/ruido se calculó de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \text{Curva sinusoidal:} & \quad EE(A_1)/A_1 \\ \text{Curva gaussiana:} & \quad EE(H)/H \end{aligned}$$

2.4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA CULTIVOS DE COPAS ÓPTICAS.

a) ANOVA de múltiple vía . (Sokal y Rohlf, 1979)

El ANOVA de múltiple vía, debido a sus múltiples ventajas, es un método de análisis estadístico muy utilizado en modelos que estudian los efectos de varios factores (efectos principales) dentro del mismo diseño experimental. Además de analizar el efecto de cada factor sobre el parámetro en estudio, es capaz de proporcionar información sobre la interacción de los efectos principales entre sí. Dicha interacción es propia de multitud de procesos biológicos y en general se puede clasificar en dos clases.

- **Sinergia.** Cuando el efecto observado al actuar dos factores conjuntamente es mucho mayor que la suma de los efectos de cada factor por separado.

- **Interferencia.** Cuando el efecto de los dos factores actuando conjuntamente es mucho menor que la suma del efecto de cada factor por separado.

Este método estadístico se basa en descomponer el valor experimental en una suma de una serie de componentes.

$$Y = \mu + \alpha_1 + \dots + \alpha_i + \Sigma[\text{interac.}] + \epsilon$$

· μ , media de los valores experimentales.

· α_i , efectos principales de cada factor.

· $\Sigma[\text{interac.}]$, sumatorio de todas las interacciones entre factores.

· ϵ , componente aleatorio.

- Modelo aditivo de los efectos principales.

La hipótesis fundamental que permite la aplicación de este método es la aditividad de los efectos principales, la cual se cumple cuando las interacciones entre factores ($\Sigma[\text{interac.}]$) no son significativas.

- Modelo multiplicativo de los efectos principales.

Si los efectos principales son multiplicativos en lugar de aditivos, la descomposición de los valores experimentales tiene la forma.

$$Y = \mu \times \alpha_1 \times \dots \times \alpha_i \times \prod [\text{interac.}] \times \epsilon$$

Es posible simplificar el análisis estadístico de este modelo aplicando la transformación logarítmica, que reduce el

modelo multiplicativo a uno aditivo, aplicándose el ANOVA de vía múltiple.

$$\log(Y) = \log(\mu) + \log(\alpha_1) + \dots + \log(\alpha_i) + \Sigma \log(\text{interac.}) + \log(\epsilon).$$

En este caso, cuando no hay interacción significativa entre los efectos principales, significa que son puramente multiplicativos, y que la interacción de los mismos es de tipo sinérgico en el sentido estadístico de la palabra.

b) Actividad NAT.

Para el análisis estadístico de los resultados de la actividad NAT se utilizó un análisis ANOVA de vía múltiple, utilizando la hipótesis de aditividad de los efectos principales en estudio. Los factores a estudiar fueron las condiciones de iluminación de las copas ópticas (luz y oscuridad), y los distintos tratamientos farmacológicos aplicados al cultivo.

Tras el ANOVA múltiple, se utilizó el test de Student-Newman-Keulst para comparaciones múltiples, con el fin de conocer la significación estadística de las diferencias entre los grupos.

c) Melatonina.

De forma similar a la estadística descrita para la actividad NAT, los datos fueron analizados mediante un ANOVA de vía múltiple. Pero a diferencia del caso anterior, para la MEL se aplicó un modelo multiplicativo en lugar del aditivo, lo que conlleva una transformación logarítmica previa de los datos. El test de Bartlett fue aplicado para probar la homogeneidad de las varianzas.

Debido al hecho de que se obtienen varias muestras de medio consecutivas de cada copa óptica, se utilizaron dos aproximaciones distintas dependiendo del número de muestras de medio por pocillo, con el fin de estudiar el efecto del tiempo de cultivo sobre la síntesis de MEL.

- Para el caso de tener solo 2 muestras de medio por pocillo (dos períodos de cultivo consecutivos de 3 horas), se aplicó el test t de Student para datos emparejados.

- Para el caso de más de 2 muestras de medio por pocillo, se aplicó el análisis de multivarianza para datos repetidos. Las

comparaciones múltiples entre puntos se restringieron a la comparación entre puntos consecutivos.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD NAT DE LA RETINA DE *R. perezii*.

1.1. Actividad AA-NAT.

1.1.1 OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE LA NAT.

a) Estabilidad de la actividad NAT en muestras biológicas.

La enzima NAT es un enzima caracterizada por su gran inestabilidad, lo cual dificulta su estudio. En primer lugar, nos planteamos buscar la forma para conservar la enzima activa en las muestras biológicas.

- Protección de la actividad enzimática en los homogeneizados de retina.

Del estudio del efecto estabilizador de EGTA y AcCoA sobre la enzima NAT en homogeneizados se obtuvieron los siguientes resultados (Fig. 1a), el homogeneizado en tampón fosfato exclusivamente (grupo control) muestra niveles no detectables de actividad NAT para todos los tiempos de preincubación, indicando una inestabilidad elevada de la enzima (Fig. 1a). La adición de EGTA (20 mM) muestra un importante efecto protector, conservándose el 70 % de la actividad inicial de la NAT tras 30 minutos de preincubación. Por último, la preincubación con AcCoA no parece mostrar ningún efecto protector sobre la actividad NAT.

- Efecto del EGTA sobre la estabilidad de la NAT a tiempos largos.

Después de 200 min. de preincubación del homogeneizado en presencia de EGTA no se observó ningún descenso en la actividad enzimática (Fig. 1b). Por tanto, la adición de EGTA al tampón de homogeneización resulta imprescindible para el mantenimiento de la actividad NAT en homogeneizados crudos de retina de *R. perezii* durante el radioenzimoincubación.

- Curva dosis-respuesta del EGTA sobre la actividad NAT.

Los resultados (Fig. 1c) mostraron un fuerte incremento de la actividad NAT con la concentración de EGTA en el intervalo 0-4 mM, por encima de dicha concentración la actividad NAT se mantiene estable no presentando incrementos adicionales.

- Conservación de la retina en congelación. Efecto sobre la actividad NAT.

Del efecto de la congelación sobre la actividad NAT se obtuvieron los siguientes resultados.

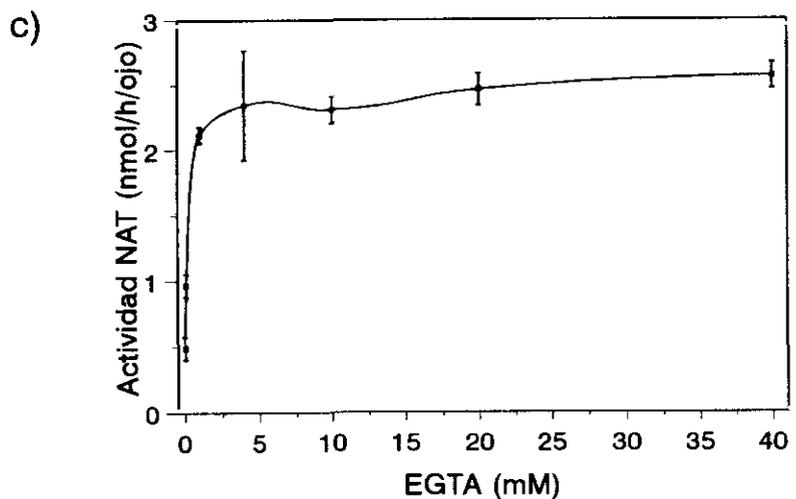
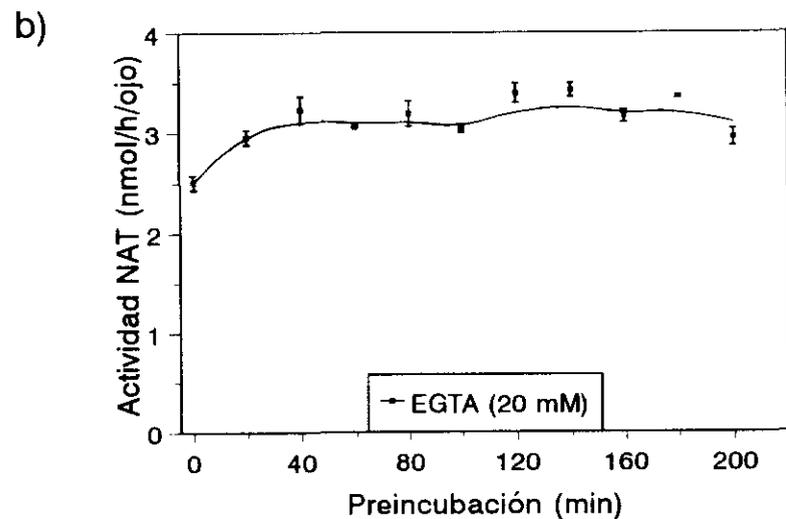
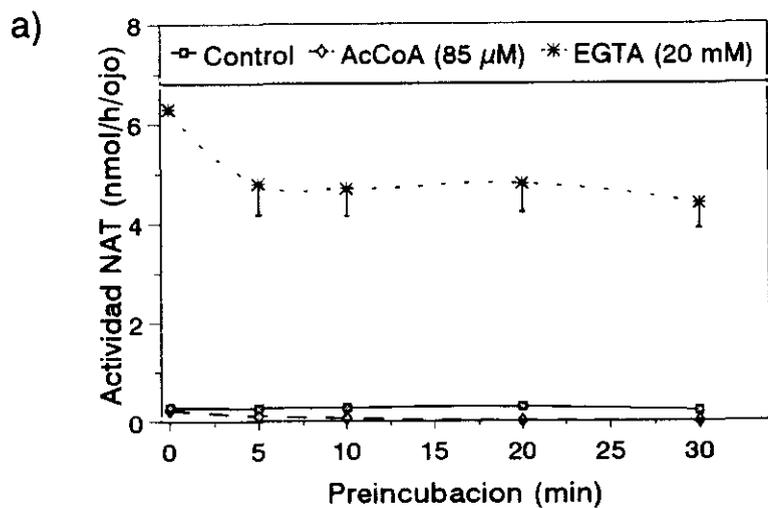


Figura 1. a) Actividad NAT en la retina de *R. perezii* sometida a distintos tiempos de preincubación a 25°C. Los homogeneizados se prepararon en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5 (control), o suplementado con AcCoA, o EGTA. b) Estabilidad de la NAT durante largos periodos de preincubación a 25°C en tampón fosfato suplementado con EGTA. c) Efecto de la concentración de EGTA sobre la actividad NAT ocular. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=3).

<u>Tiempo (días)</u>	<u>actividad NAT (nmol/h/ojo + e.)</u>
1	2,17 ± 0,10 (3)
20	2,10 ± 0,13 (3)

Queda demostrado que al menos durante 20 días la congelación a -25°C no afecta la actividad NAT. No obstante, los ensayos de NAT se realizaron rutinariamente, no más tarde de una semana después de la obtención del tejido ocular.

b) Características del tampón del ensayo.

- Concentración.

Como puede observarse en la Fig. 2a. La actividad NAT se incrementa con la concentración del tampón, alcanzando el máximo a 250 mM, a partir de esta concentración la actividad enzimática sufre un ligero descenso no significativo.

- pH.

La actividad NAT muestra una marcada respuesta al pH. Para valores de pH de 6,1 ó inferiores, o mayores de 6,9 la actividad enzimática se encuentra muy reducida, siendo el intervalo de 6,3-6,5 óptimo para la determinación de la actividad NAT (Fig. 2b).

c) Linealidad de la reacción respecto a la cantidad de tejido.

Como se observa en la Fig. 3a, la velocidad de reacción se mantiene proporcional a la cantidad de homogeneizado. El coeficiente de correlación obtenido fue $r=0,995$ ($p<0,001$). Dicho resultado indica que no se producen efectos negativos por la utilización de grandes cantidades de tejido.

d) Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de la reacción.

Los resultados (Fig. 3b) demuestran que la linealidad de la reacción se conserva durante al menos 30 minutos a las dos temperaturas ensayadas. Esta linealidad se mantiene a las dos concentraciones de AcCoA probadas. Los coeficientes de correlación y su correspondiente significación estadística se recogen a continuación.

<u>Temperatura (°C)</u>	<u>AcCoA (50 μM)</u>	<u>AcCoA (250 μM)</u>
25	$r=0,995$ ($p<0,001$)	$r=0,996$ ($p<0,001$)
35	$r=0,992$ ($p<0,001$)	$r=0,995$ ($p<0,001$)

Se puede concluir pues, que la NAT muestra una termoestabilidad suficiente para el desarrollo del ensayo durante 20 ó 30 minutos, tanto a 35 como a 25°C. También se observa

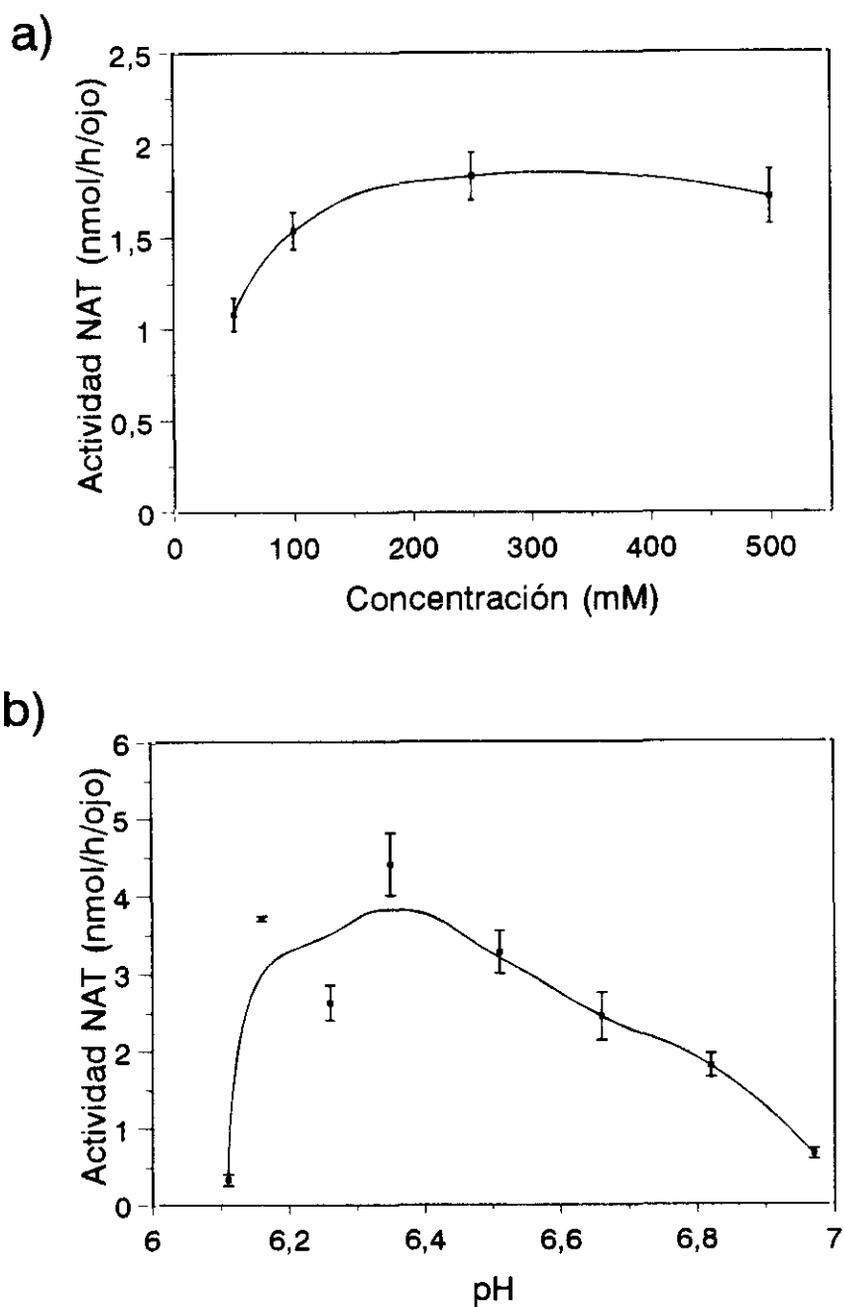


Figura 2. Dependencia de la actividad NAT de la retina de *R. perezii* respecto a distintas condiciones del tampón del ensayo. **a)** Efecto de la concentración del tampón a pH = 6,5. **b)** Efecto del pH del tampón fosfato (0,25 M). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$.

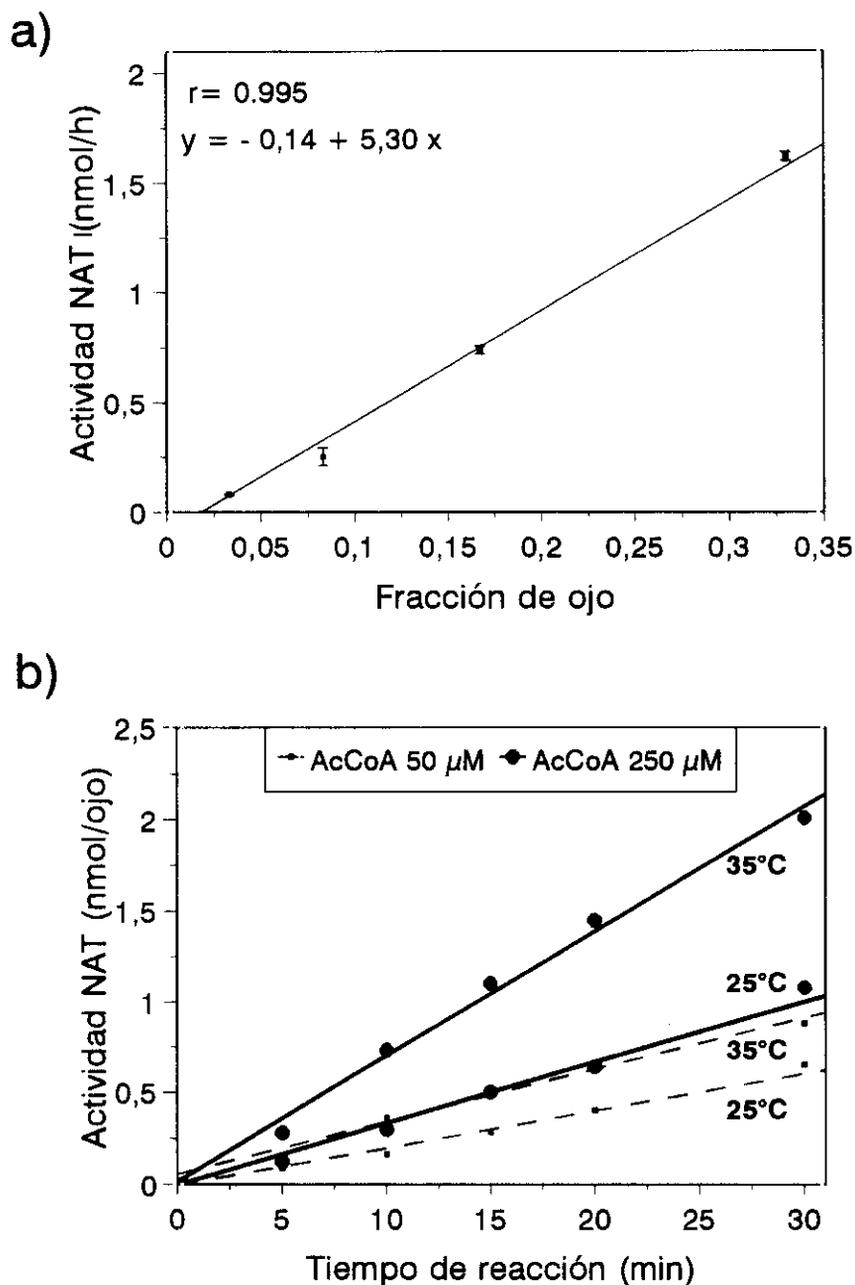


Figura 3. a) Relación entre la cantidad de homogeneizado y la actividad NAT de la retina de *R. perezii*. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=2). b) Efecto de la temperatura del ensayo sobre el desarrollo de la reacción a dos concentraciones de AcCoA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, $e < 5\%$ de la \bar{x} .

un efecto estimulador de la temperatura sobre la actividad enzimática, un incremento de 10°C supone, aproximadamente, una duplicación de la actividad NAT. La concentración de la AcCoA utilizada no influye sobre la linealidad de la reacción, pero sí sobre la actividad obteniéndose un incremento significativo de la misma a concentraciones altas de AcCoA, esto demuestra que a 50 μ M de AcCoA la enzima no se encuentra saturada para este sustrato.

e) **Tubos blanco del ensayo.**

Con el fin de estudiar la especificidad de la reacción, y elegir la forma más adecuada para obtener los tubos blanco en el ensayo enzimático, se realizaron los siguientes tubos blanco que se describen a continuación (Tabla I):

La ebullición destruye totalmente la actividad enzimática del homogeneizado de retina de *R. perezii*. El sobrecalentamiento del homogeneizado producido por la sonicación durante 1 min. solamente inactiva el 95 % de la enzima. Este resultado demuestra la existencia de una enzima termosensible en el homogeneizado que se desnaturaliza a altas temperaturas. Esta circunstancia demuestra que la radiactividad extraída del tubo de reacción se debe a la acción de dicha enzima.

Las cuentas observadas en los tubos blanco solamente constituyen el 0,25 % de las cpm totales, pero en realidad las cpm correspondientes al [14 C] añadido al ensayo, y que son extraídas por el disolvente orgánico, son mucho menores (0,05 %) ya que la mayoría de las cpm de los blancos son radiación de fondo.

Puede observarse que tanto los tubos blanco extraídos con cloroformo y realizados omitiendo el tejido o la triptamina, muestran unas cpm ligeramente superiores al fondo de conteo. Mientras que los tubos blanco extraídos con alcohol isoamilo, muestran un ligero incremento sobre los tubos blanco anteriores. El mayor carácter polar del alcohol isoamilo respecto al cloroformo incrementa el número de cuentas, probablemente debido a trazas de [14 C]AcCoA disueltas en él.

Al no existir diferencias significativas entre los tubos blanco realizados omitiendo la amina aceptora o los hechos sin homogeneizado, se demuestra que la acetilación de las aminas endógenas presentes en el tejido es despreciable.

A partir de estos resultados, en el ensayo de la NAT utilizando triptamina como sustrato los tubos blanco se realizaron substituyendo el homogeneizado por tampón, mientras que en el ensayo utilizando serotonina se utilizó el tubo blanco con homogeneizado, pero omitiendo la serotonina.

Tabla I. Comparación de los métodos utilizados para preparar los tubos blanco del ensayo de la actividad NAT en la retina de *Rana perezi*, incluyendo los distintos métodos de extracción empleados.

Método de preparación de los tubos blanco	cpm \pm e.	n
Cuentas totales	40.320	
Fondo (sin [14 C]AcCoA)	79,22 \pm 1,79	(10)
Ensayo estándar (1/3 retina)	635,20 \pm 31,32	(5)
Homogeneizado 100°C, 5 min.	114,30 \pm 7,18	(5)
Homogeneizado sonicado 1 min.	137,65 \pm 7,65	(4)
Extrac. cloroformo (sin retina)	109,43 \pm 3,20	(10)
Extrac. cloroformo (sin triptamina)	119,10 \pm 7,45	(5)
Extrac. alc.isoamilo (sin retina)	120,30 \pm 4,48	(5)
Extrac. alc.isoamilo (sin serotonina)	129,16 \pm 6,93	(5)

Los resultados se representan como la $\bar{x} \pm e$. El número de datos se muestra entre paréntesis.

1.1.2 LOCALIZACIÓN OCULAR DE LA NAT.

a) Localización de la actividad NAT dentro de la retina.

La actividad NAT reside fundamentalmente en la retina neural, el 92 % del total ($3,31 \pm 0,20$ (4) nmol/h/ojo, frente a $0,28 \pm 0,1$ (4) del complejo esclerótica-epitelio pigmentado). Por tanto, la valoración de la actividad NAT puede llevarse a cabo en la retina neural aislada sin que suponga una pérdida de actividad enzimática debido a la disección.

b) Localización subcelular de la NAT.

Se encontró que la actividad NAT está asociada mayoritariamente al sobrenadante del homogeneizado sometido a centrifugación ($2,85 \pm 0,18$ nmol/h/ojo), restando en el precipitado (gránulos de pigmento y núcleos) sólo el 3,3 % ($0,10 \pm 0,02$ nmol/h/ojo) de la actividad total.

1.1.3 CINÉTICA DE LA NAT. ESTIMACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS.

En la Fig. 4a, se muestra la caracterización respecto a la AcCoA (conc. final de triptamina 10 mM), y en la Fig. 4b, respecto a la triptamina (conc. final de AcCoA 50 μ M).

Para ambos substratos, la cinética se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten. El carácter hiperbólico de la cinética se pone de manifiesto cuando los resultados son expresados como el inverso de la velocidad frente al inverso de la concentración de sustrato (representación de Lineweaver-Burk), dando lugar a una línea recta (Fig. 4).

- Influencia de la monoamina utilizada como sustrato sobre la cinética enzimática.

En las enzimas con reacciones bisustrato, las constantes cinéticas de la reacción respecto a un sustrato dependen de la concentración del cosustrato que se mantiene a concentración constante. Se estudió pues, el efecto de la concentración de AcCoA sobre la cinética de la NAT. Para lo cual se caracterizó la actividad NAT para la triptamina y serotonina utilizando dos concentraciones distintas de AcCoA (50 μ M y 250 μ M).

Las constantes cinéticas obtenidas se representan en la Tabla II. Se observa que tanto la concentración alta como la baja de AcCoA no modifican el valor de la K_M ni para la triptamina ni para la serotonina. En cambio se observa que la afinidad de la NAT es siempre mayor para la serotonina (menor K_M) que para la triptamina. Como consecuencia de esta mayor afinidad el cociente V_{max}/K_M (aclaramiento intrínseco) es siempre mayor para la serotonina que para la triptamina. Con respecto a la V_{max} , los valores estimados son similares

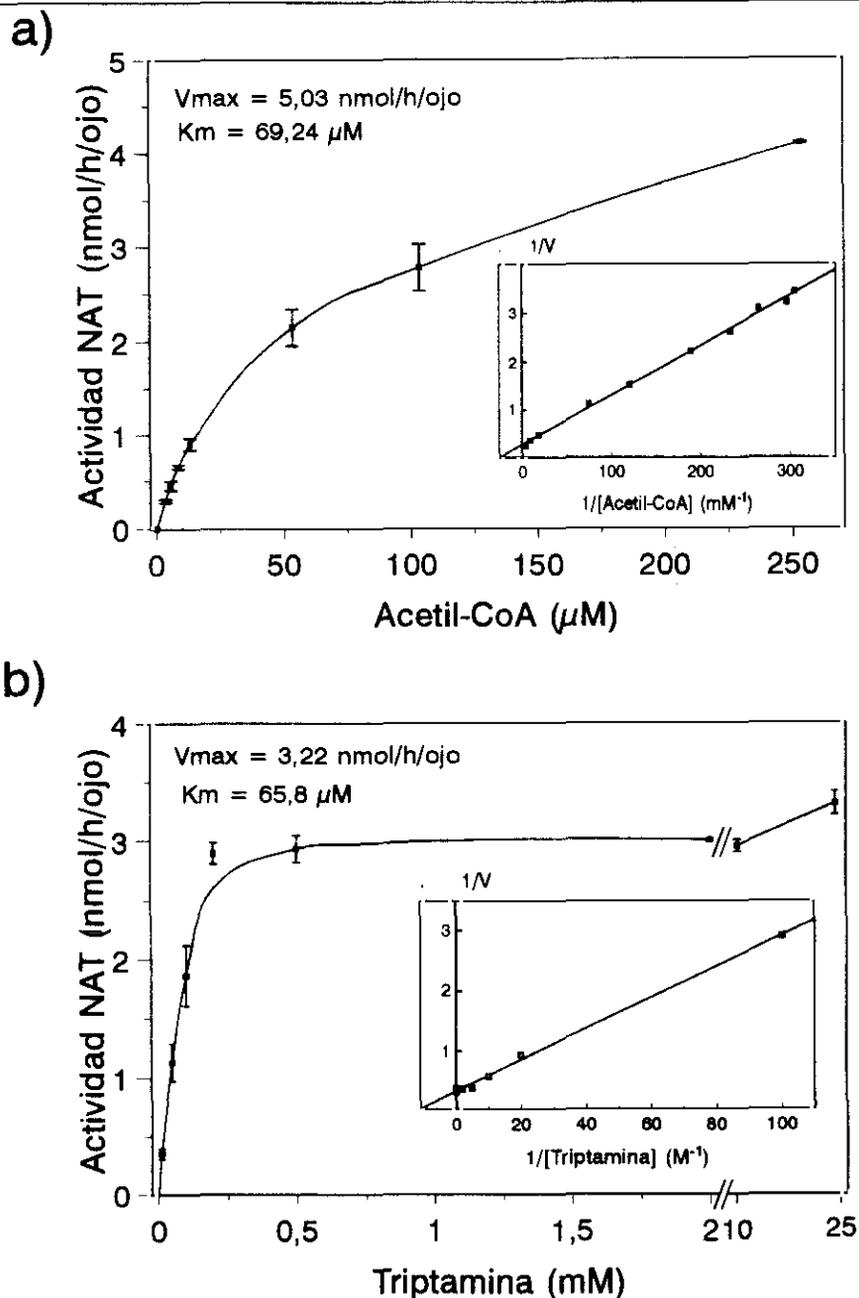


Figura 4. Caracterización cinética de la actividad NAT de la retina de *R. perezii*, a) respecto a la concentración de AcCoA (triptamina 10 mM), b) respecto a la triptamina (AcCoA 50 μ M). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=2). Se incluye la representación de Lineweaver-Burk en las figuras para mostrar la linealidad de la reacción.

Tabla II. Constantes cinéticas de la NAT para triptamina y serotonina en homogeneizados de retina de *Rana perezi* a diferentes concentraciones de AcCoA.

AcCoA	Triptamina			Serotonina		
	K_M (μM)	V_{max} (nmol/h/ojo)	V_{max}/K_M	K_M (μM)	V_{max} (nmol/h/ojo)	V_{max}/K_M
50 μM	60,40 \pm 11,60	3,62 \pm 0,36	0,0599	20,66 \pm 5,75	4,75 \pm 0,20	0,2299
250 μM	48,54 \pm 9,15	8,43 \pm 0,29	0,1737	19,35 \pm 5,13	8,79 \pm 0,67	0,4543

Las constantes cinéticas se han estimado mediante el método de regresión no lineal de Wilkinson (1961). Cada estimación representa la $\bar{x} \pm EE$. de la estimación para dos determinaciones independientes.

para ambas aminas, pero la concentración alta de AcCoA incrementa este parámetro independientemente de la amina usada como sustrato.

1.1.4 DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD NAT OCULAR CON EL TAMAÑO CORPORAL.

a) Correlación tamaño corporal-actividad NAT.

Previamente al análisis de los resultados de la actividad enzimática, se estudió la correlación entre el tamaño corporal (g) y el peso del ojo (g), encontrándose una regresión lineal estadísticamente significativa ($r=0,9941$ $p<0,001$) con los siguientes coeficientes $a=0,0321$ $b=0,0049$.

Puede observarse la relación entre el contenido proteico de la retina y la actividad NAT (Fig. 5a), existiendo una correlación significativa entre ambos parámetros ($r=0,914$; $p<0,001$). Parece ser pues que la actividad NAT aumenta de forma directamente proporcional al tamaño de la retina neural (expresado como su contenido proteínico) en individuos postmetamórficos de *R. perezii*.

Para estudiar la relación entre el peso del ojo y la actividad NAT, se aplicó una regresión potencial utilizando los logaritmos de ambos parámetros (Fig. 5b), el coeficiente de correlación es estadísticamente significativo ($r=0,962$; $p<0,001$), teniendo dicha regresión potencial un exponente de 0,472.

b) Correlación entre la actividad NAT de ambos ojos del mismo animal.

Una vez conocida la relación entre el tamaño del animal y la actividad NAT, nos planteamos estudiar si son niveles de NAT de ambos ojos del mismo animal son similares.

Una vez realizado el ensayo de la actividad NAT, cada ojo del mismo animal se repartió al azar entre los dos conjuntos de datos X e Y. Como cabría esperar, no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los dos conjuntos de datos (Grupo X: $2,23 \pm 0,10$; Grupo Y: $2,37 \pm 0,13$ nmol/h/ojo: $n = 10$). Del análisis de regresión se obtuvo una correlación significativa ($r=0,898$ $p<0,001$). Los valores de la pendiente (b) y del punto de corte con el eje Y (a) se expresaron como estimación \pm EE:

	<u>a + EE.</u>	<u>b + EE.</u>
Esperado	0	1
	(NS)	(NS)
Experimental	$- 0,227 \pm 0,455$	$1,165 \pm 0,202$

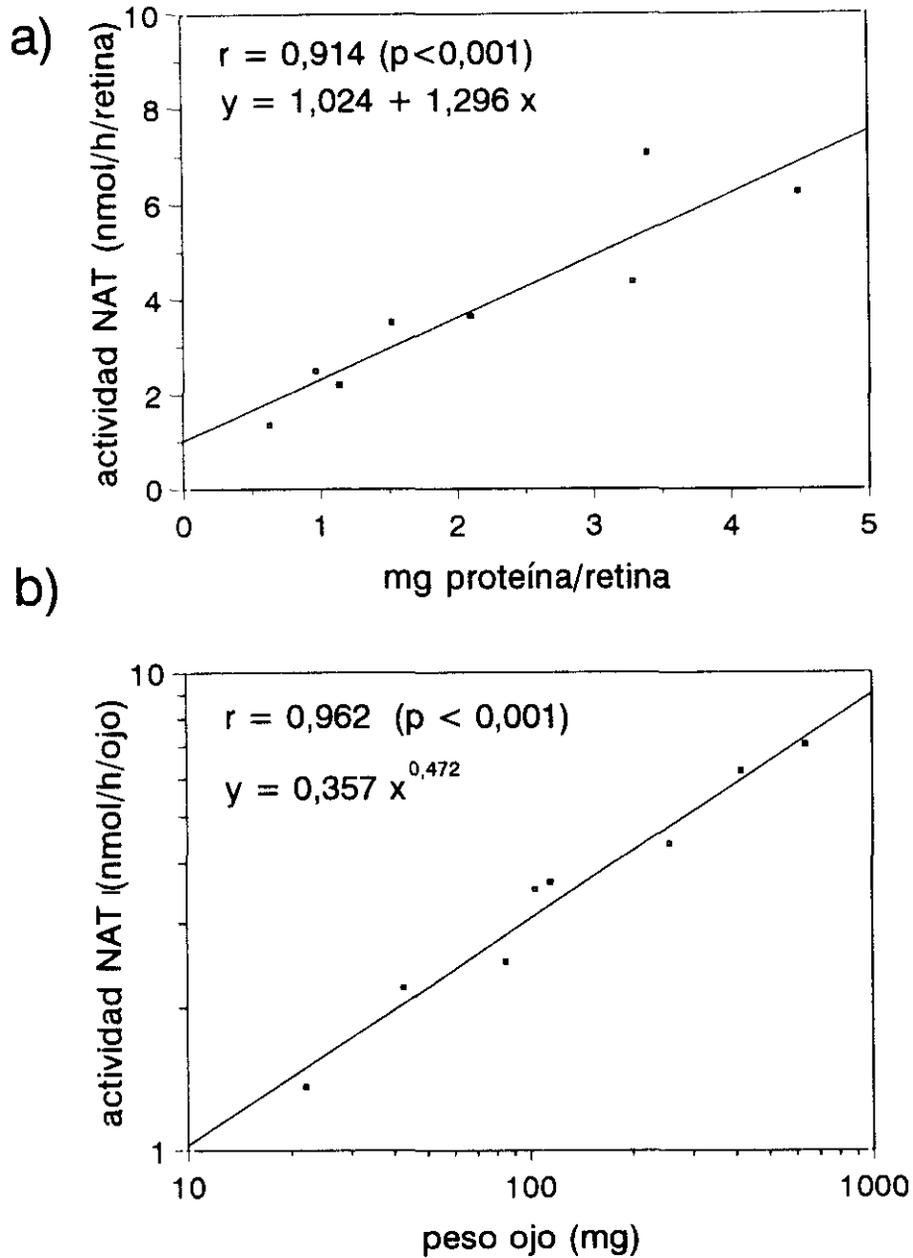


Figura 5. Correlación entre la actividad NAT y el tamaño ocular de individuos adultos de *R. perezii*. **a)** Regresión lineal entre la actividad NAT y el contenido proteínico de la retina neural aislada. **b)** Regresión potencial entre la actividad NAT y el peso del ojo.

Se puede concluir que, la actividad NAT es idéntica en ambos ojos del mismo animal en base a dos criterios: un coeficiente de correlación significativo, y la no diferencia significativa entre los coeficientes de la recta de regresión calculada y la esperada.

1.1.5 DIFERENCIA DÍA-NOCHE EN LA ACTIVIDAD NAT.

a) Efecto de la luz sobre la actividad NAT nocturna.

Los resultados se muestran en la Fig. 6a, puede observarse un incremento significativo durante la noche de actividad NAT en retina de *R. perezii* ($p < 0,01$). Se puede observar también que la exposición a la luz por un período de sólo 10 minutos durante la noche produce una reducción significativa de la actividad NAT ($p < 0,01$) alcanzándose valores similares a los diurnos.

b) Variación diaria de las constantes cinéticas.

Los resultados obtenidos de la caracterización cinética de retinas de *R. perezii* en dos momentos del ciclo diario se muestran en la Fig. 6b mediante la representación de Lineweaver-Burk. El valor de la K_M se conserva ($70,22 \pm 3,2 \mu\text{M}$ (mediodía) frente a $76,45 \pm 7,65 \mu\text{M}$ (medianoche)) como puede observarse en el punto de corte con el eje X de la representación gráfica, mientras que la V_{max} se incrementa significativamente durante la noche llegando casi a duplicarse, de $3,9 \pm 0,04$ a $6,47 \pm 0,15$ (nmol/h/mg prot).

Se concluye pues, que el incremento nocturno observado en la NAT ocular se debe a un incremento en la cantidad de enzima, no a cambios en su afinidad por la amina aceptora.

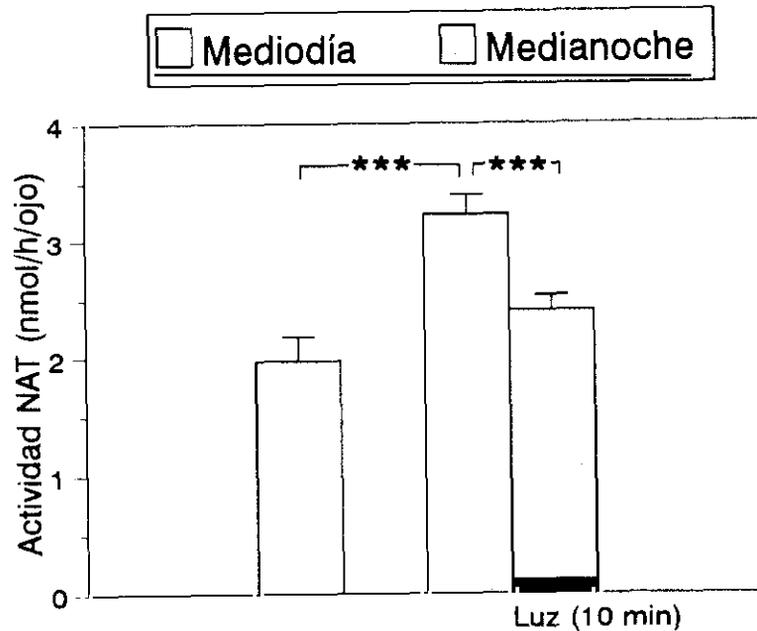
1.2. Actividad A-NAT.

1.2.1 EXISTENCIA DE LA ACTIVIDAD A-NAT EN LA RETINA.

En la Fig. 7a), se muestra el efecto del pH del tampón sobre la actividad NAT utilizando p-fenetidina como sustrato. Puede observarse que entre 6,5 y 7,2 se obtiene la actividad máxima, disminuyendo significativamente la actividad enzimática fuera de este intervalo.

En segundo lugar, se estudió el efecto de la concentración de la amina aceptora (p-fenetidina) sobre la actividad enzimática valorada a pH 7 (óptimo de la enzima) (Fig. 7b). Para concentraciones mayores de 0,5 mM la enzima se encuentra saturada. La cinética mostró un perfil hiperbólico (linealidad en la representación Lineweaver-Burk) calculándose

a)



b)

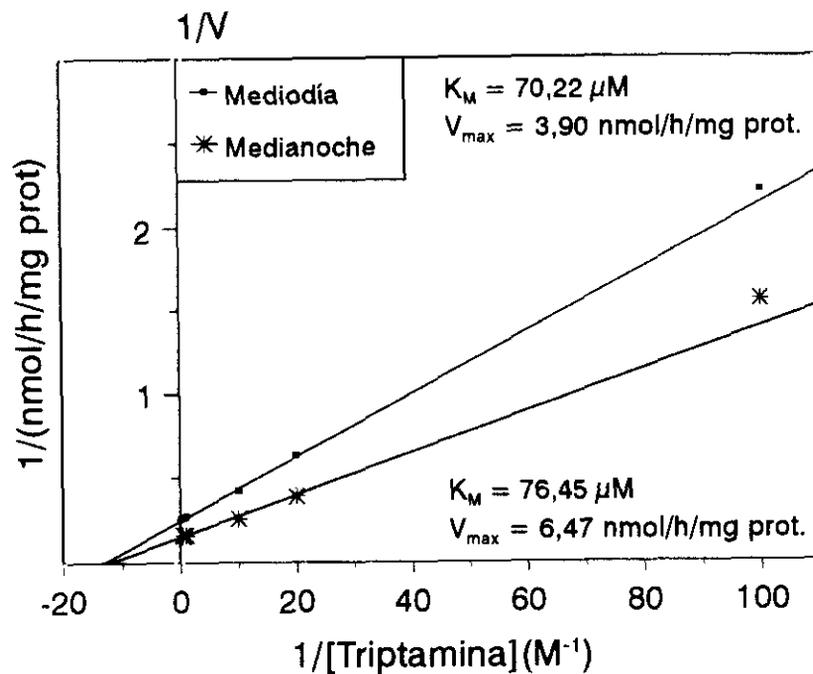


Figura 6. a) Diferencias día-noche en la actividad NAT de la retina de *R. perezii* y efecto de la luz sobre los niveles nocturnos de NAT. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). *** p<0,01. **b)** Representación Lineweaver-Burk mostrando la evolución diaria de la cinética de la NAT de la retina de *R. perezii*.

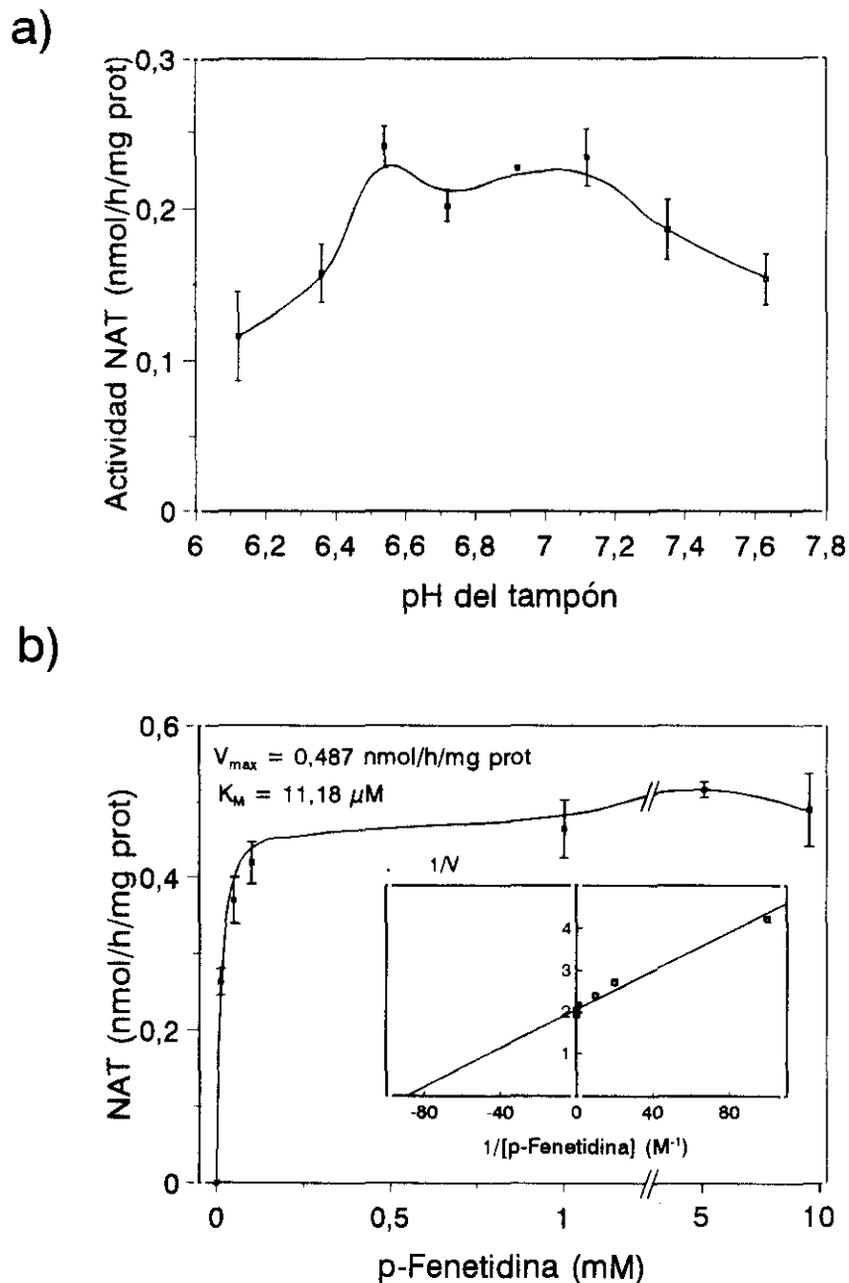


Figura 7. Actividad arilamina-NAT de la retina de *R. perezi* durante el día. **a)** Efecto del pH del tampón sobre el ensayo. **b)** Caracterización cinética respecto a la concentración de p-fenetidina (AcCoA 50 μM). Se incluye la representación de Lineweaver-Burk para mostrar la linealidad de la reacción. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. ($n=3$).

las siguientes estimaciones de las constantes cinéticas: $K_M = 11,18 \pm 3,17 \mu\text{M}$ y $V_{\max} = 0,49 \pm 0,013 \text{ nmol/h/mg prot.}$

1.2.2 INTERFERENCIA DE LA A-NAT EN EL ENSAYO.

Una vez conocida la existencia de una actividad A-NAT en la retina, se estudió la posible interferencia de esta enzima en el ensayo de la AA-NAT, para lo cual se aplicaron varios criterios distintos para su estudio:

a) Efecto de la concentración de los substratos del ensayo (triptamina y AcCoA) sobre ambas actividades NAT.

En primer lugar, se utilizaron dos concentraciones distintas de AcCoA: $50 \mu\text{M}$ (alrededor de la K_M) y $500 \mu\text{M}$ (considerada saturante), los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 8a. Con la concentración alta de AcCoA se observa un incremento de la actividad tanto diurna como nocturna, pero cuando se compara la razón entre las actividades medidas a las dos concentraciones de AcCoA ($\text{NAT}(500 \mu\text{M})/\text{NAT}(50 \mu\text{M})$) en los dos momentos del ciclo diario se observa que no existen diferencias.

En segundo lugar se utilizaron dos concentraciones de triptamina diferentes (1 mM y 10 mM). En este caso (Fig. 8b) la concentración de triptamina afecta del mismo modo a la actividad NAT de ojos procedentes de animales durante el día y durante la noche. No encontrándose diferencias en la relación $\text{NAT}(1 \text{ mM})/\text{NAT}(10 \text{ mM})$.

b) Valoración simultánea de ambas actividades enzimáticas, y su correlación.

En la Fig. 8c) se muestran los resultados obtenidos para ambas actividades enzimáticas valoradas a partir de la misma retina. Se puede observar que, mientras que la actividad AA-NAT valorada con triptamina muestra una clara oscilación día-noche, mostrando valores mayores durante la noche ($p < 0,01$), la actividad A-NAT determinada con fenetidina no muestra estos cambios.

Cuando se calcula la correlación entre ambas actividades enzimáticas valoradas a partir de la misma muestra no se observa una significación estadística ($r = -0,414$; $p > 0,1$).

c) Test de la aditividad enzimática.

Se utilizó esta prueba para demostrar la especificidad de cada una de las dos formas NAT con respecto a sus substratos correspondientes, para lo cual se utilizaron

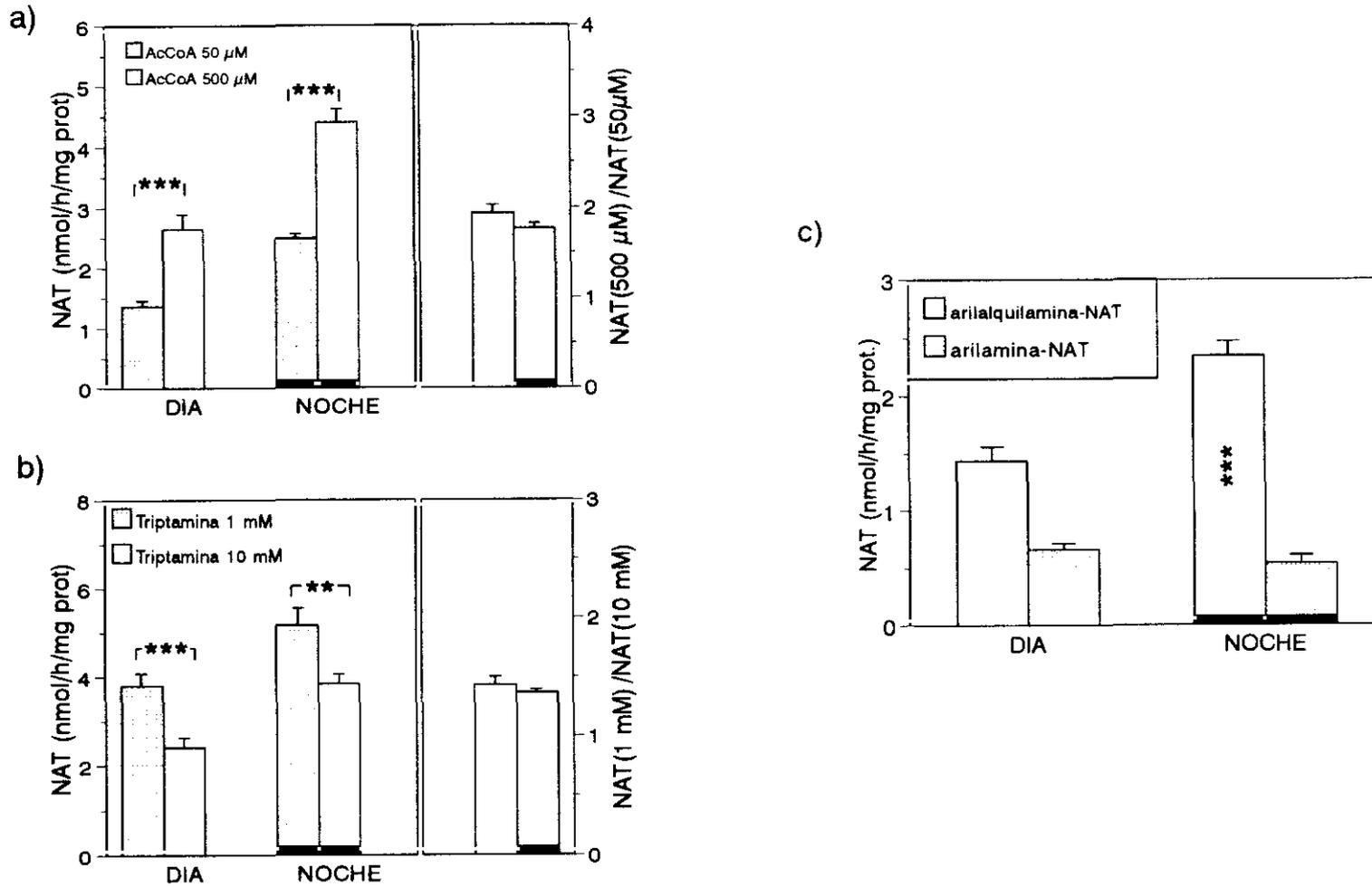


Figura 8. Efecto de la concentración de sustratos sobre la actividad NAT de la retina de *R. perezii* determinada durante el ciclo día-noche. **a)** AcCoA: 50 μ M y 500 μ M. **b)** Triptamina: 1 mM y 10 mM. **c)** Determinación simultánea de las dos actividades NAT utilizando dos sustratos específicos: triptamina (1 mM) y p-fenetidina (5 mM). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. ** $p < 0,025$ *** $p < 0,01$.

concentraciones saturantes de triptamina y fenetidina (5 mM), las cuales se añadieron por separado y conjuntamente a alícuotas de un único homogeneizado de retina de *R. perezi*, obteniéndose los siguientes resultados expresados en nmol/h/mg prot:

<u>Triptamina (5 mM)</u>	<u>Fenetidina (5 mM)</u>	<u>Triptamina+fenetidina</u>
6,11 ± 0,02 (3)	0,97 ± 0,03 (3)	6,97 ± 0,24 (3)

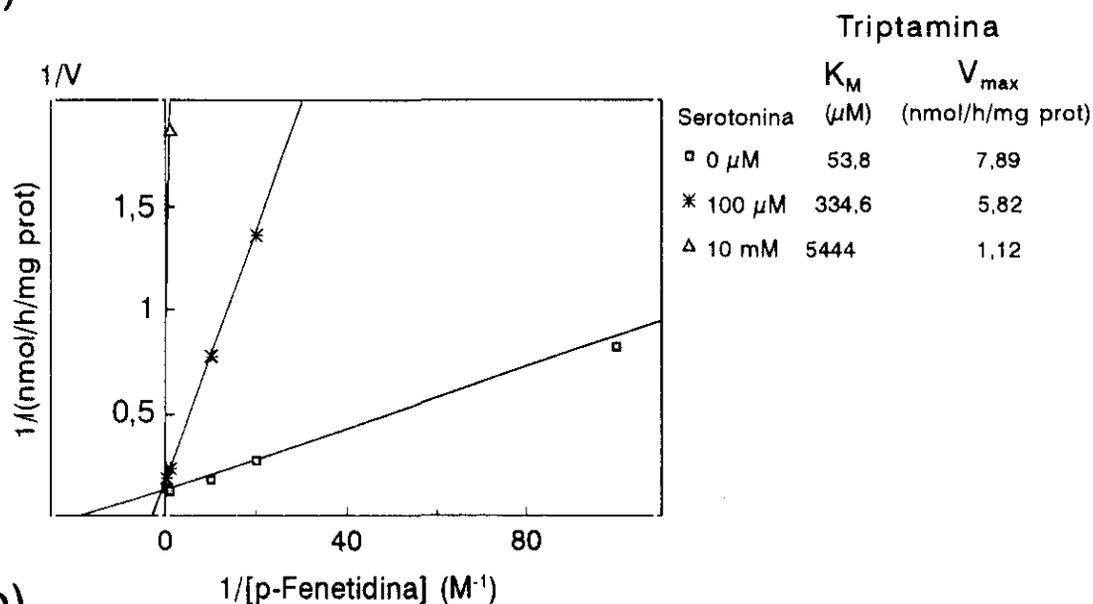
Se concluye que tanto la triptamina como la fenetidina son acetiladas por dos enzimas distintas ya que la suma de las dos actividades enzimáticas obtenidas por separado coincide con la valorada utilizando las dos aminas conjuntamente.

d) Diferencias cinéticas entre las dos NAT utilizando serotonina como inhibidor enzimático.

En la Fig. 9a) se muestra el efecto de la serotonina sobre la actividad AA-NAT nocturna (representación LIneweaver-Burk) valorada utilizando triptamina como substrato. La inhibición competitiva queda demostrada por el fuerte incremento de la K_M aparente con la concentración de serotonina, aunque el descenso de la V_{max} (sobretudo con serotonina 10 mM) muestra que la inhibición no es del tipo competitivo puro, sino más bien es una inhibición de tipo mixto. La estimación de la K_i utilizando la representación de Dixon muestra un valor de 16,4 μ M. La utilización conjunta de los valores de la K_M y V_{max} aparentes (Fig. 9a) permite la estimación de las dos constantes de afinidad asociadas con la inhibición de tipo mixto, la constante de valor menor (que corresponde a la competencia del inhibidor con el substrato) dió un valor de 13,6 μ M (similar al valor calculado a partir de la representación de Dixon y al valor de la K_M para esta amina, Tabla II), mientras que el valor mayor de la K_i (que corresponde a la inhibición no competitiva) fue de 1,6 mM.

En la Fig. 9b, se muestran los resultados obtenidos respecto a la cuantificación de la actividad A-NAT de retinas diurnas (pH del tampón = 7). Análogamente al caso anterior, aparece una inhibición de tipo mixto por parte de la serotonina sobre la actividad A-NAT, pero dicha inhibición es cuantitativamente muy distinta, mientras que la K_M aparente incrementa en sólo un 45 % a la concentración máxima de serotonina, para la AA-NAT hay un incremento de más de 100 veces en esta constante. En cuanto al efecto sobre la V_{max} observamos un resultado similar, la serotonina 10 mM reduce hasta el 1/7 del valor de la V_{max} determinada en ausencia de esta amina para la AA-NAT, mientras que para la A-NAT este descenso sólo es de aproximadamente el 50 %. La K_i estimada para esta enzima fue 7,25 mM para la constante de la inhibición no competitiva, y 177 μ M para la constante de

a)



b)

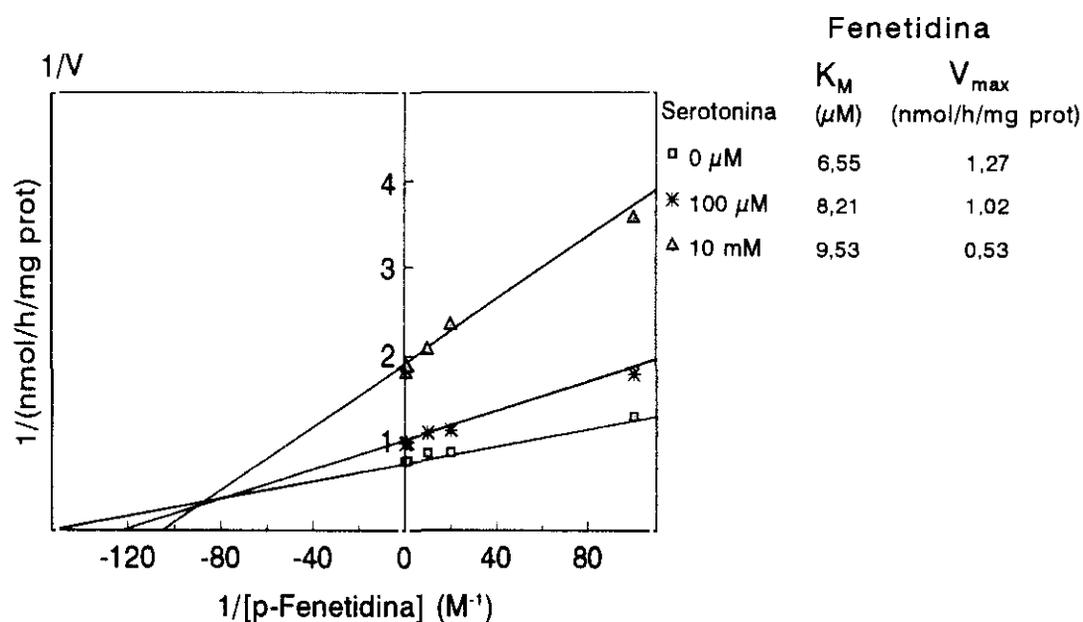


Figura 9. Inhibición de la serotonina sobre las dos actividades NAT de la retina neural de *R. perezi* utilizando como cosubstrato AcCoA 50 μM (representación Lineweaver-Burk). **a)** AA-NAT valorada con triptamina. **b)** A-NAT valorada con p-fenetidina.

inhibición competitiva.

2. VALIDACIÓN DEL RIA DE MELATONINA.

En primer lugar, se realizó la titulación del anticuerpo antimelatonina con el fin de hallar la dilución óptima del mismo que proporcione una unión específica de aproximadamente el 50 %. Esta concentración proporciona la sensibilidad máxima en el ensayo. Para ello, se valoró la unión de una cantidad constante de marcador (13.000 cpm) con respecto a diluciones sucesivas del anticuerpo. Los resultados se muestran en la Fig. 10, escogiéndose la dilución final 1/300.000 como la óptima del anticuerpo para el desarrollo del RIA (unión del 50 %).

2.1. Valoración de melatonina en los medios de cultivo.

A continuación, se procedió a la validación del RIA de MEL para ser utilizado en la determinación de los niveles de MEL en el medio de cultivo de copas ópticas.

a) Paralelismo.

En primer lugar, se realizó el paralelismo entre una curva estándar de MEL y diluciones sucesivas de medio procedente del cultivo de copas ópticas estimuladas con forskolín y IBMX. Como se observa en la Fig. 11a) hay un marcado paralelismo, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,1$) entre las pendientes de las rectas obtenidas tras la transformación logit-log de los datos (estándar $b = -0,912 \pm 0,026$, diluciones del medio $b = -0,878 \pm 0,037$).

b) Recuperación analítica.

A continuación se compararon cantidades conocidas de MEL añadidas a medio de cultivo fresco y su estimación mediante RIA, valorándose así la recuperación analítica. Como se observa en la Fig. 11b, hay una correlación significativa entre la cantidad de MEL añadida y su estimación mediante RIA. ($r = 0,998$ $p < 0,001$). La pendiente de la recta de regresión es 1,06, lo cual indica una relación de 1 a 1 entre la MEL añadida y la MEL medida en el ensayo.

Se puede concluir pues, que el método de valoración empleado por nosotros cumple las condiciones necesarias para ser utilizado en la cuantificación de MEL presente en el

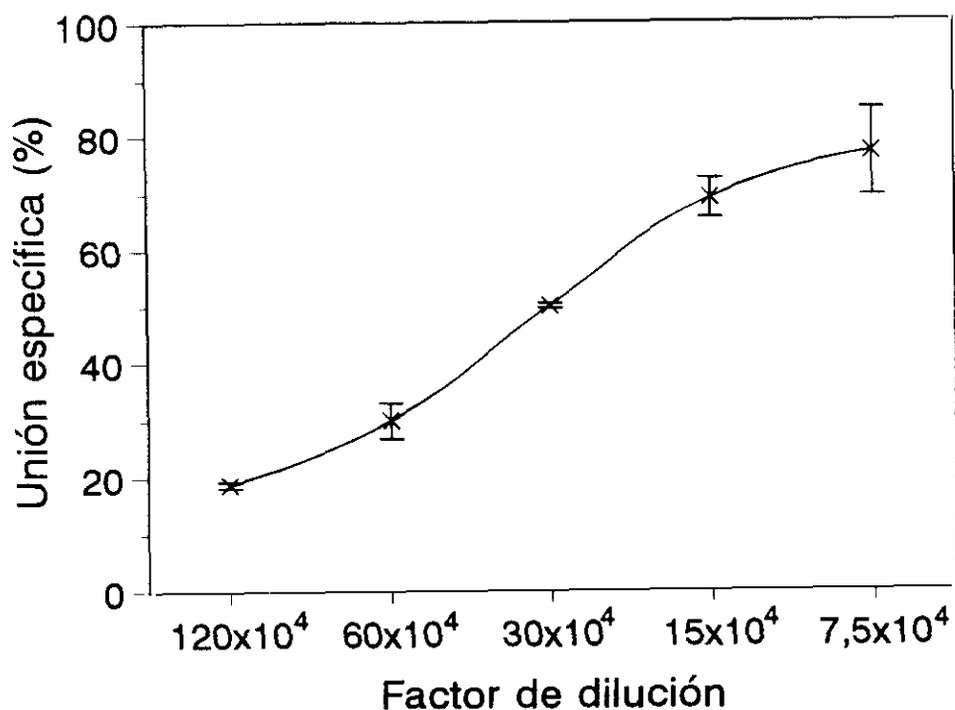


Figura 10. Titulación del anticuerpo antimelatonina. Se representa el porcentaje de la unión específica de una cantidad constante de marcador (13.000 cpm) frente a la dilución final del anticuerpo específico antimelatonina. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=2).

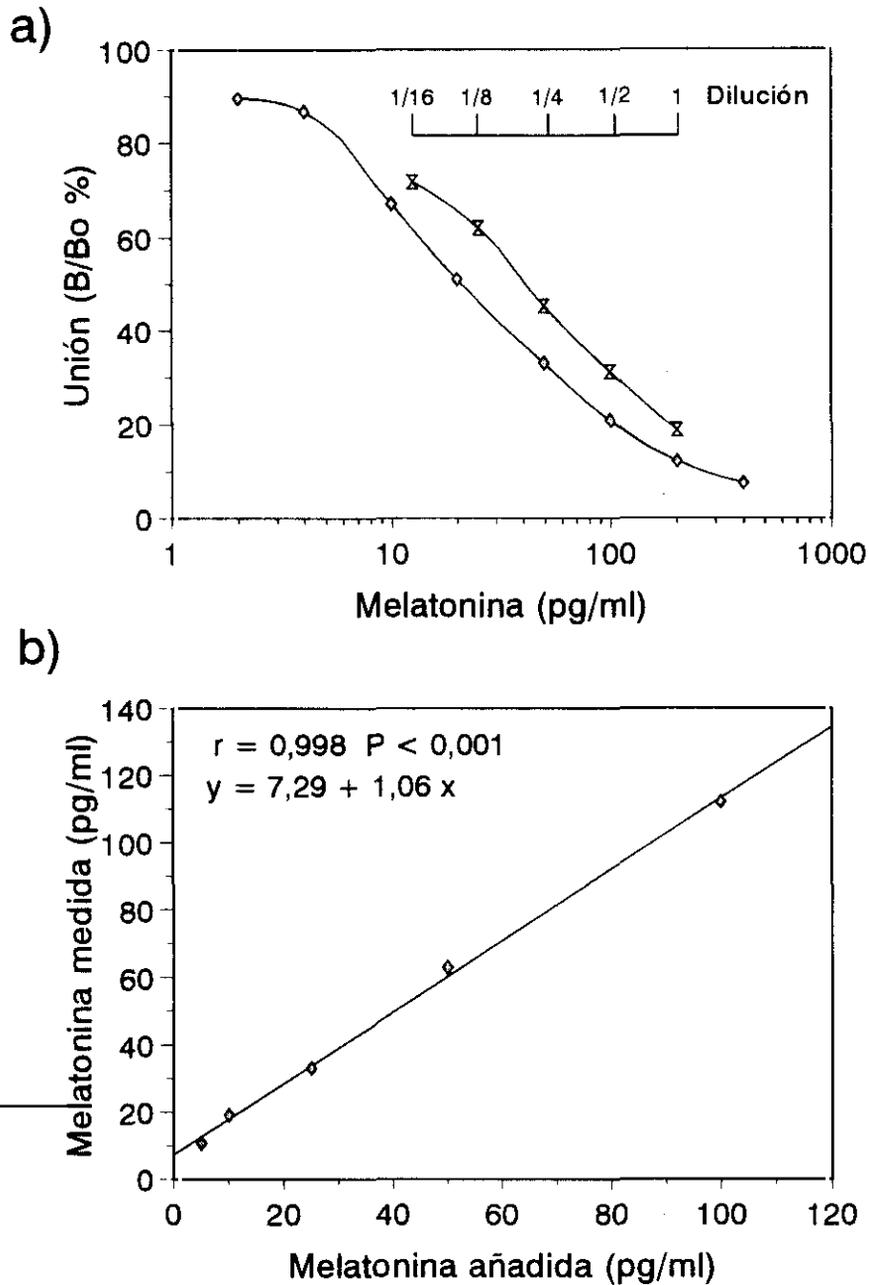


Figura 11. a) Paralelismo entre la curva estándar de melatonina y diluciones sucesivas, realizadas en el tampón del RIA, de medio de cultivo de copas ópticas de *R. perezi*. **b)** Eficacia analítica del RIA de melatonina. Regresión lineal entre la cantidad de melatonina añadida al medio de cultivo fresco y la estimación de la misma mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e. < 5 % de la \bar{x} .

medio de cultivo de copas ópticas de *R. perezi*, mediante RIA directo.

2.2. Valoración de melatonina en la retina de *R. perezi*.

a) Efecto de la extracción con diclorometano sobre el RIA.

Para la valoración de la MEL en la retina de *R. perezi*, es necesaria una extracción previa del tejido con diclorometano. En primer lugar, se probó el posible efecto del proceso de extracción sobre el desarrollo del RIA, para lo cual, se comparó una curva estándar con una curva extraída con diclorometano siguiendo el protocolo general descrito en el apartado de materiales y métodos. No se encontró diferencias significativas entre ambas curvas cuando se compararon las pendientes tras la transformación logit-log ($b = -0,76 \pm 0,04$; $b = -0,67 \pm 0,05$; $p > 0,1$; Fig. 12). El paralelismo indica que el diclorometano no modifica las características del RIA, no alterando la capacidad de unión del anticuerpo.

b) Eficacia de la extracción.

La eficacia de extracción mediante diclorometano de la MEL disuelta en el tampón del RIA fue del 95 al 105 % para todas las concentraciones de las curvas (Fig. 12).

A fin de determinar si dicha eficacia de extracción se mantiene en las muestras biológicas, se extrajeron retinas de individuos de *R. perezi* sacrificados durante el día a las cuales se añadió 100 pg de MEL estándar, comparándose con la otra retina del mismo animal a la que no se añadió MEL.

	<u>pg/retina</u>	<u>n</u>
<u>- Melatonina</u>	4,11 \pm 1,22	5
<u>+ 100 pg Melatonin</u>	104,16 \pm 2,97	5

La eficacia de extracción del diclorometano para la MEL en la retina fue del 100,05 \pm 3,8 % (n=5).

c) Lavado del extracto con NaHCO₃.

Aunque la reacción cruzada del anticuerpo antimelatonina con otros indoles es muy baja, siendo únicamente superior al 1% con la 6-hidroximelatonina (5,3 %), es necesario confirmar que no existen interferencias por parte de los hidroxindoles presentes en las muestras biológicas que pudieran dar una reacción cruzada con el anticuerpo antimelatonina. Para lo cual el extracto de retinas con diclorometano fue lavado con tampón bicarbonato 0,1 M, pH 10 con el fin de eliminar los hidroxindoles, que pasarán a la fase acuosa. Los

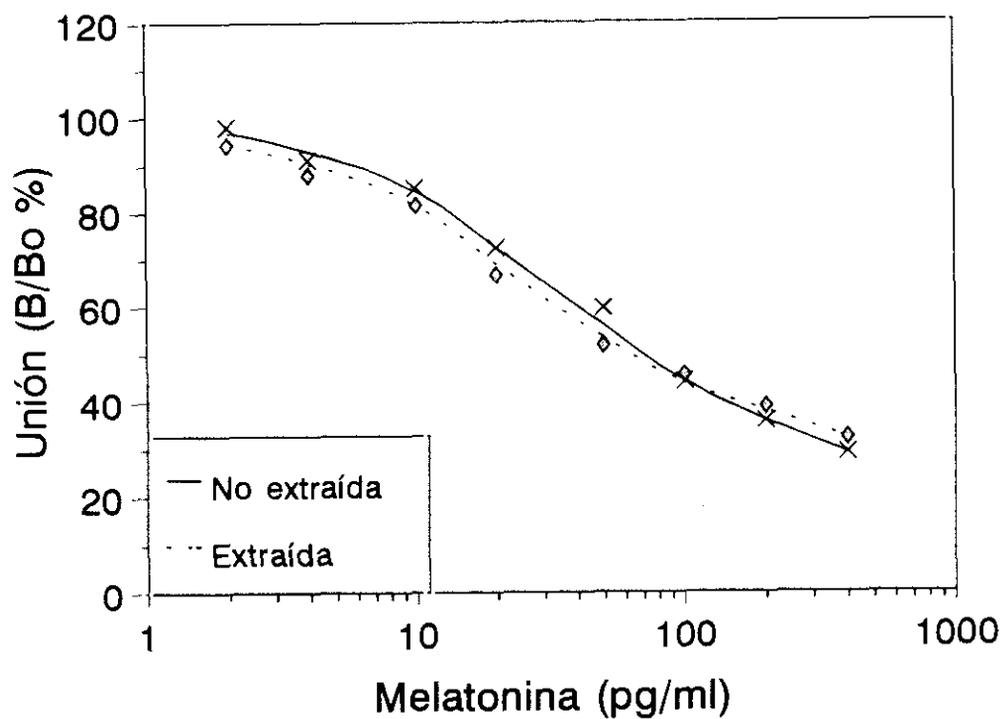


Figura 12. Paralelismo entre las curvas estándares para el RIA de melatonina, realizadas de forma directa con melatonina, o tras su extracción con diclorometano. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e. < 5 % de la \bar{x} .

resultados fueron comparados con extractos de la retina procedentes del mismo animal que no sufrieron este lavado.

	<u>pg/retina</u>	<u>n</u>
- <u>NaHCO₃</u>	31,28 ± 3,06	4
+ <u>NaHCO₃</u>	37,76 ± 4,51	4

Aunque no existen diferencias significativas entre los dos grupos, el ligero aumento en los niveles de MEL valorados en el grupo que fue lavado con tampón bicarbonato, sugiere la conveniencia de realizar dicho paso en el método de extracción de MEL.

2.3. Sensibilidad y reproductibilidad del RIA.

Por último, se muestran a continuación una serie de pruebas realizadas para determinar la sensibilidad y reproductibilidad del método de valoración de MEL.

a) Límite de sensibilidad.

La unión específica máxima (Bo %) para todos los ensayos realizados en esta memoria se mantuvo en el intervalo 31,7-50,8 (%). Mientras que la unión inespecífica no fue nunca superior al 5 % ($3,17 \pm 0,17$; n=15). El límite de sensibilidad del RIA fue de 1,07 pg/ml.

b) Variación intra- e interensayo.

Para el cálculo de la variación intraensayo se utilizaron los coeficientes de variación de la unión específica (%) obtenidos para el Bo y para tres concentraciones distintas de MEL correspondientes al tramo alto, medio y bajo de la curva estándar (4, 50, 200 pg/ml respectivamente, n=10). Para la variación interensayo se utilizaron también los coeficientes de variación de los mismos puntos estándares procedentes de 10 curvas estándares obtenidas en diferentes días.

Los coeficientes de variación CV (%) calculados a partir de la curva estándar se compararon con los valores de los CV determinados a partir de muestras cuyo contenido medio de MEL (\bar{x} pg/ml) fuera similar a las concentraciones estándares seleccionadas.

CV (%)	<u>Curva estándar</u>		<u>Medio</u>		<u>Retinas</u>	
	<u>Intra-</u>	<u>Inter-</u>	<u>CV</u>	<u>[\bar{x}]</u>	<u>CV</u>	<u>[\bar{x}]</u>
Bo 0 pg/ml	1,5	4,8	--	--	--	--
4 pg/ml	2,5	4,9	7,5	[4,8]	12,4	[5,3]
50 pg/ml	4,2	10,0	10,8	[47,3]	17,9	[53,8]
200 pg/ml	8,5	18,3	26,5	[132,0]	24,1	[107,0]

Aunque el valor de la desviación típica correspondiente a las distintas concentraciones de MEL se mantiene constante independientemente de la zona de la curva, se puede observar que el CV incrementa con la concentración de MEL. Esto es debido a la forma de la curva estándar, a concentraciones altas de MEL la unión específica es menor, y por lo tanto el CV resultante tiende a aumentar.

Si se comparan los CV intra- e interensayo se observa que estos últimos suelen ser unas dos veces mayores que los primeros.

Los CV correspondientes a las muestras resultaron ser mayores que los obtenidos a partir de la curva estándar, obviamente esto es debido a la mayor variabilidad de las muestras biológicas frente a la variación típica del RIA. Por tanto, podemos concluir que el RIA de MEL posee una reproductibilidad aceptable para la valoración de muestras biológicas.

Los valores de CV más altos obtenidos en los valores de MEL de retinas respecto a los medios de cultivo, se deben a que el proceso de extracción conlleva una serie de pasos adicionales, y por tanto una mayor dispersión de los resultados en comparación con el RIA directo utilizado para los medios de cultivo.

3. DESARROLLO ONTOGÉNICO DEL RITMO DIARIO DE ACTIVIDAD NAT.

Los estados de desarrollo utilizados, así como el número de ojos para cada ensayo se presentan en la Tabla III.

3.1. *Rana perezii*.

En las Fig. 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos para larvas de *R. perezii*. La aparición del ritmo diario significativo tiene lugar en el estado 25 (G), (ruido/señal < 0,3, Tablas IV y V) mostrando la actividad NAT nocturna niveles significativamente elevados a

Tabla III. Estados de desarrollo de las diferentes especies de anfibios anuros utilizadas para el estudio de la evolución ontogénica del ritmo de la actividad NAT ocular.

<u>Especie</u>	<u>Fecundación</u>	<u>Estado</u>		<u>Peso ind. (mg)</u> ($\bar{x} \pm e.$)	<u>Ensayo NAT</u> (ojos/tubo)
<u>Rana</u> <u>perezi</u>		(G)	(TK)		
	In vitro	21-22	--	3,7 \pm 0,24	10 cab.
	Espontánea	25	--	12,2 \pm 0,35	20
	Espontánea	26-27	I-II	70,6 \pm 1,4	6,66
	Espontánea	40	XV-XVI	438,4 \pm 8,6	2
Espontánea	46	XXV	327,0 \pm 19,0	1,33	
<u>Xenopus</u> <u>laevis</u>		(NF)	(TK)		
	Inducida	37-38	--	2,1 \pm 0,14	10 cab.
	Inducida	43-44	--	3,6 \pm 0,17	20
	Inducida	46-47	I-II	20,5 \pm 0,1	10
	Inducida	52-53	VIII	131,7 \pm 4,0	6,66
Inducida	65-66	XXIV-XXV	282,2 \pm 11,3	1,33	
<u>DiscoGLOSSUS</u> <u>pictus</u>		(G)	(TK)		
	Inducida	38-39	XIII-XIV	102,7 \pm 3,6	2
Inducida	46	XXV	55,5 \pm 1,7	2	
<u>Bufo</u> <u>calamita</u>		(G)	(TK)		
	Espontánea	40	XV-XVI	154,9 \pm 2,6	2
Espontánea	46	XXV	58,7 \pm 1,4	2	

Los estados de *R. perezi*, *D. pictus* y *B. calamita* están referidos a la tabla de Gosner, 1960 (G). Los estados de *X. laevis* están referidos a la tabla de Nieuwkoop y Faber, 1967 (NF). Se ha incluido la correspondencia con la tabla de Taylor y Kollros, 1946 (TK) para permitir la comparación entre especies.

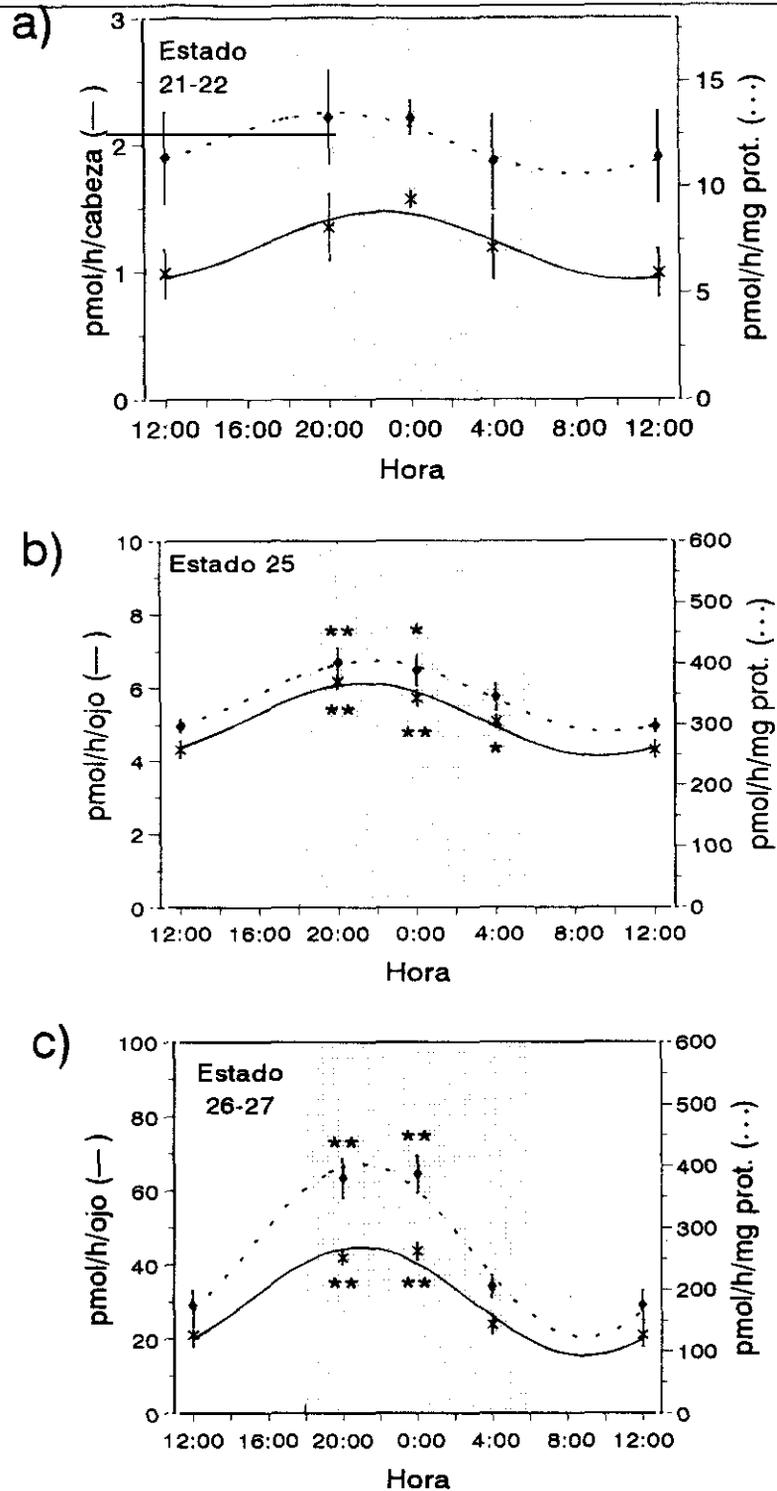


Figura 13. Ritmos día/noche de la actividad NAT en el ojo de larvas de *R. perezii*, en los siguientes estados de desarrollo: **a) 21-22**, **b) 25** y **c) 26-27** (Gosner). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. ($n=4$). Las curvas representan el ajuste de los datos a una función sinusoidal. El área sombreada indica la fase oscura del ciclo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los valores diurnos.

las 20:00, 0:00 ($p < 0,01$) y 4:00 horas ($p < 0,05$) respecto a los niveles diurnos (Fig. 13b).

El ritmo se hace más pronunciado en los estados 26-27 (G) (Fig. 13c) y 40 (G) (Fig. 14d), En ambos casos, los valores de la NAT durante la fase oscura (20:00 y 0:00) son significativamente mayores, respecto a los diurnos ($p < 0,01$). A las 4:00 h los niveles de actividad NAT comienzan a disminuir, alcanzando la significación estadística ($p < 0,05$) sólo en el estado 40 (G). Los niveles máximos durante la fase oscura son de 2 a 3 veces superiores respecto a los niveles diurnos.

Inmediatamente después de la metamorfosis (estado 46 (G), Fig. 14e) el ritmo sigue siendo significativo ($p < 0,01$ de los puntos nocturnos respecto al mediodía).

En las Tablas IV y V se muestran los parámetros cronobiológicos que definen la curvas sinusoidales ajustadas a los puntos experimentales. Durante el desarrollo no se observan grandes cambios en la actividad NAT específica manteniéndose constantes a lo largo del desarrollo a partir del estado 25 (G) (400-500 pmol/h/mg prot. en el máximo nocturno). En cambio, la actividad NAT total por órgano aumenta (Tabla IV), probablemente debido al crecimiento general del animal. Tras la metamorfosis la actividad NAT específica (referida al contenido proteínico) se reduce de forma notable, tanto en el nivel medio (A_0) como en la amplitud (A_1) (Tabla V).

En cuanto al momento del máximo nocturno (acrofase) cabe destacar que, después de la metamorfosis, se produce un considerable retraso de alrededor de una hora (Tablas IV y V).

3.2. *Xenopus laevis*.

Con respecto a las larvas de *X. laevis*, los resultados se muestran en las figuras 15 y 16. La aparición del ritmo diario de NAT tiene lugar en el estado 43-44 (NF) (Tablas IV y V), encontrándose diferencias significativas en todos los puntos nocturnos ($p < 0,01$) respecto a los valores del mediodía. El ritmo de actividad NAT se muestra también significativo en los estados 46-47 (NF) Fig. 15c); y 52-53 (NF) Fig. 16d).

En el mismo sentido de lo ya señalado para *R. perezi*, tras la metamorfosis se observa un ligero desplazamiento de alrededor de una hora del máximo nocturno hacia la segunda mitad de la fase oscura (Tablas IV y V). Otro importante resultado a destacar es que aunque se observa un incremento en la actividad NAT total a lo largo del desarrollo, en realidad, la concentración de la enzima muestra un descenso sostenido durante el desarrollo, siendo más notable en los animales postmetamórficos (líneas discontinuas en las Fig. 15 y

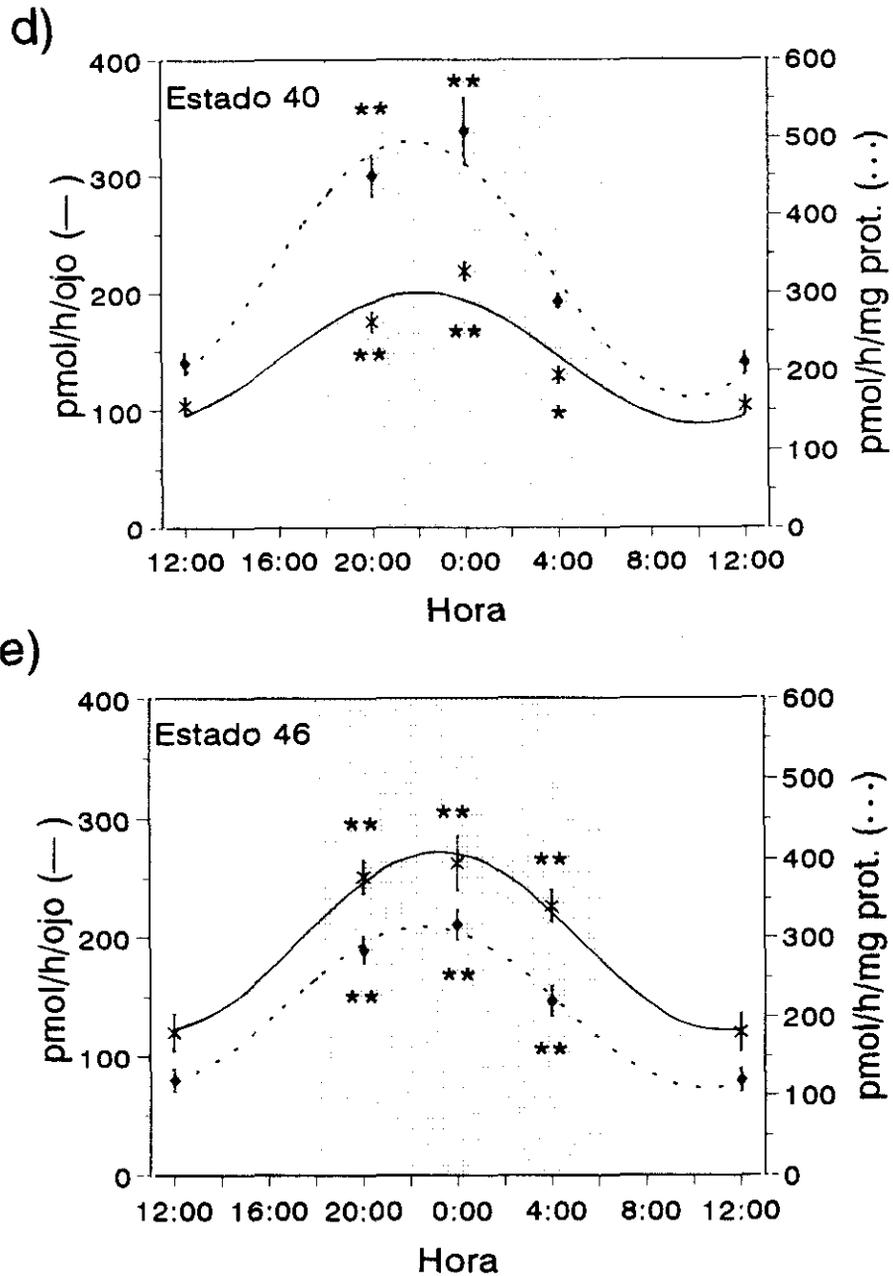


Figura 14. Ritmos día/noche de la actividad NAT en el ojo de larvas de *R. perezii*, en los siguientes estados de desarrollo: **d)** 40 y **e)** 46 (Gosner). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=4). Las curvas representan el ajuste de los datos a una función sinusoidal. El área sombreada indica la fase oscura del ciclo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los valores diurnos.

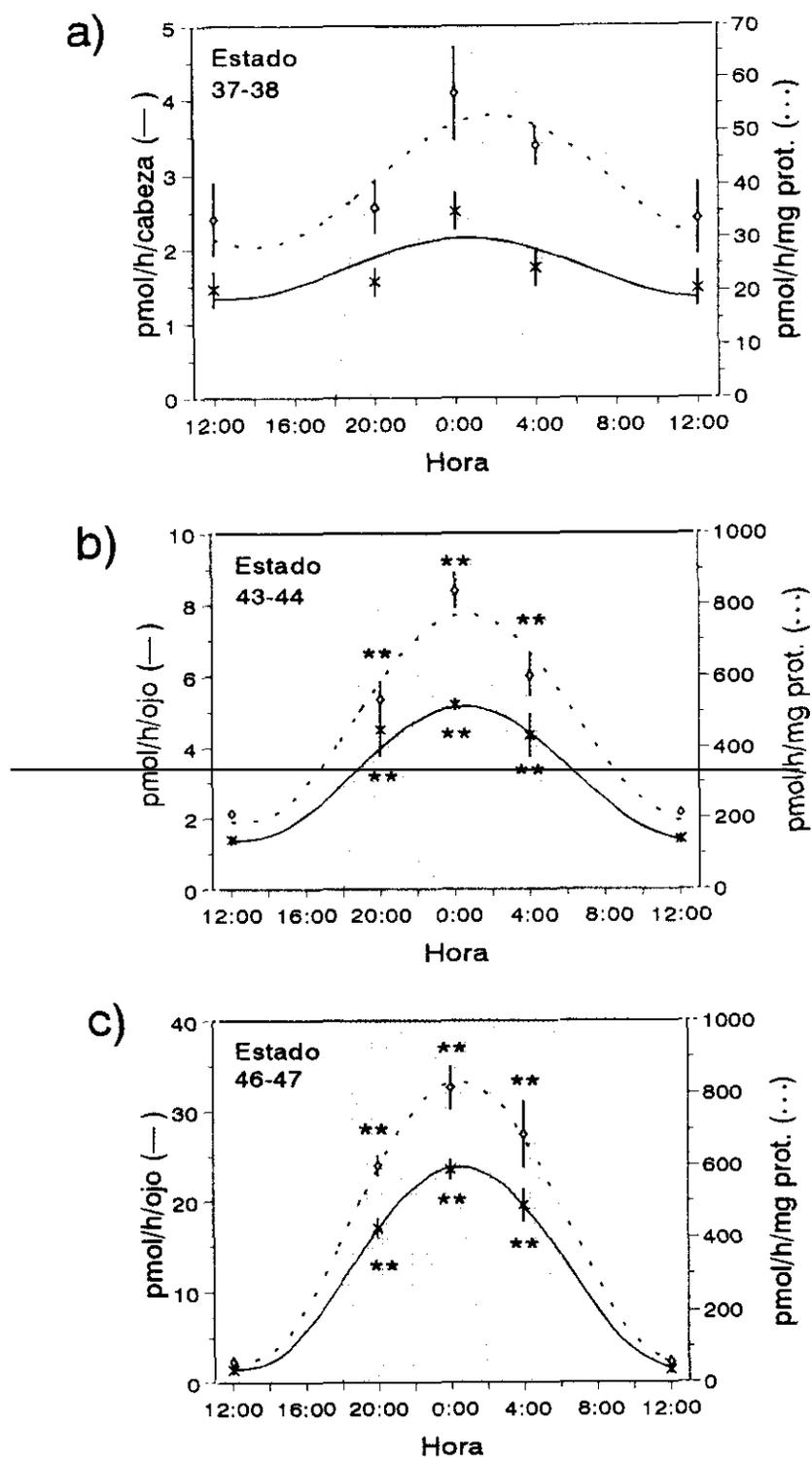


Figura 15. Ritmos día/noche de la actividad NAT en el ojo de larvas de *X. laevis*, en los siguientes estados de desarrollo: **a)** 37-38, **b)** 43-44 y **c)** 46-47 (Nieuwkoop-Faber). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. ($n=4$). Las curvas representan el ajuste de los datos a una función sinusoidal. El área sombreada indica la fase oscura del ciclo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los valores diurnos.

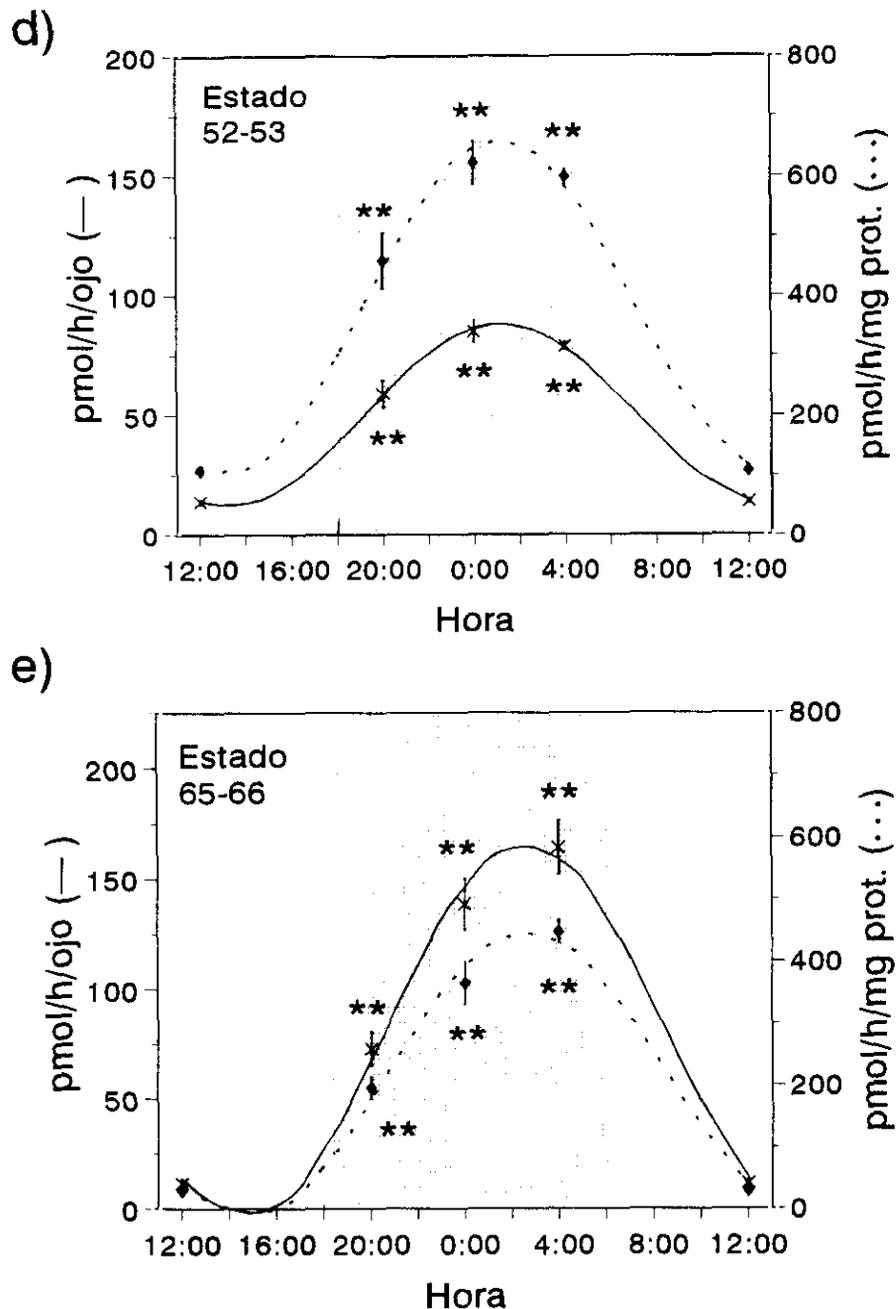


Figura 16. Ritmos día/noche de la actividad NAT en el ojo de larvas de *X. laevis*, en los siguientes estados de desarrollo: **d)** 52-53 y **e)** 65-66 (Nieuwkoop-Faber). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. ($n=4$). Las curvas representan el ajuste de los datos a una función sinusoidal. El área sombreada indica la fase oscura del ciclo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los valores diurnos.

16; Tabla V).

Al comparar las curvas sinusoidales de *R. perezi* y *X. laevis* se puede observar que existen grandes diferencias entre estas dos especies, mientras que en *R. perezi* la oscilación día/noche es de 3 veces como máximo, en *X. laevis* ésta es mucho mayor (> 6 veces) en todos los estados estudiados (Tabla V). Estas especies difieren también en la acrofase, mientras que en *R. perezi* tiene lugar en la primera parte de la fase oscura, en *X. laevis* está retrasada apareciendo siempre después de la medianoche (Tablas IV y V).

De los resultados anteriormente expuestos, parece inferirse un marcado efecto del proceso de metamorfosis sobre el perfil rítmico de actividad NAT ocular. A tenor de este hecho, se evaluó el efecto de la metamorfosis en otras especies de anuros con el fin de estudiar la extensión de este fenómeno. Se escogieron *Discoglossus pictus* y *Bufo calamita* como especies representativas de otros grupos de anuros.

3.3. *Discoglossus pictus*.

Los resultados obtenidos para *D. pictus* se muestran en la Fig. 17, en el estado premetamórfico (Estado 38-39 (G) ya se encuentra un perfil rítmico significativo en la actividad NAT apareciendo diferencias significativas entre todos los valores nocturnos con respecto a los niveles de medio día ($p < 0,05$ para 20:00, $p < 0,01$ para 0:00 y 4:00). Tras la metamorfosis el perfil no sufre cambios importantes, conservándose los niveles de NAT (600 nmol/h/mg prot. durante la noche y 250 nmol/h/mg prot. durante el día).

3.4. *Bufo calamita*.

En la Fig. 18 se muestran los resultados obtenidos para *B. calamita* para estados, pre- y postmetamórficos, existe un ritmo diario de la actividad NAT encontrándose valores significativamente elevados en los dos primeros puntos de la noche. Para esta especie no se aprecian efectos marcados sobre el perfil del ritmo debido a la metamorfosis (Tablas IV y V).

Para *B. calamita* cabe destacar las siguientes diferencias respecto a las especies anteriores, los niveles medios de la actividad específica son los más altos (Tabla V), mientras que el perfil muestra que la acrofase tiene lugar muy pronto dentro de la fase oscura (20-21 horas).

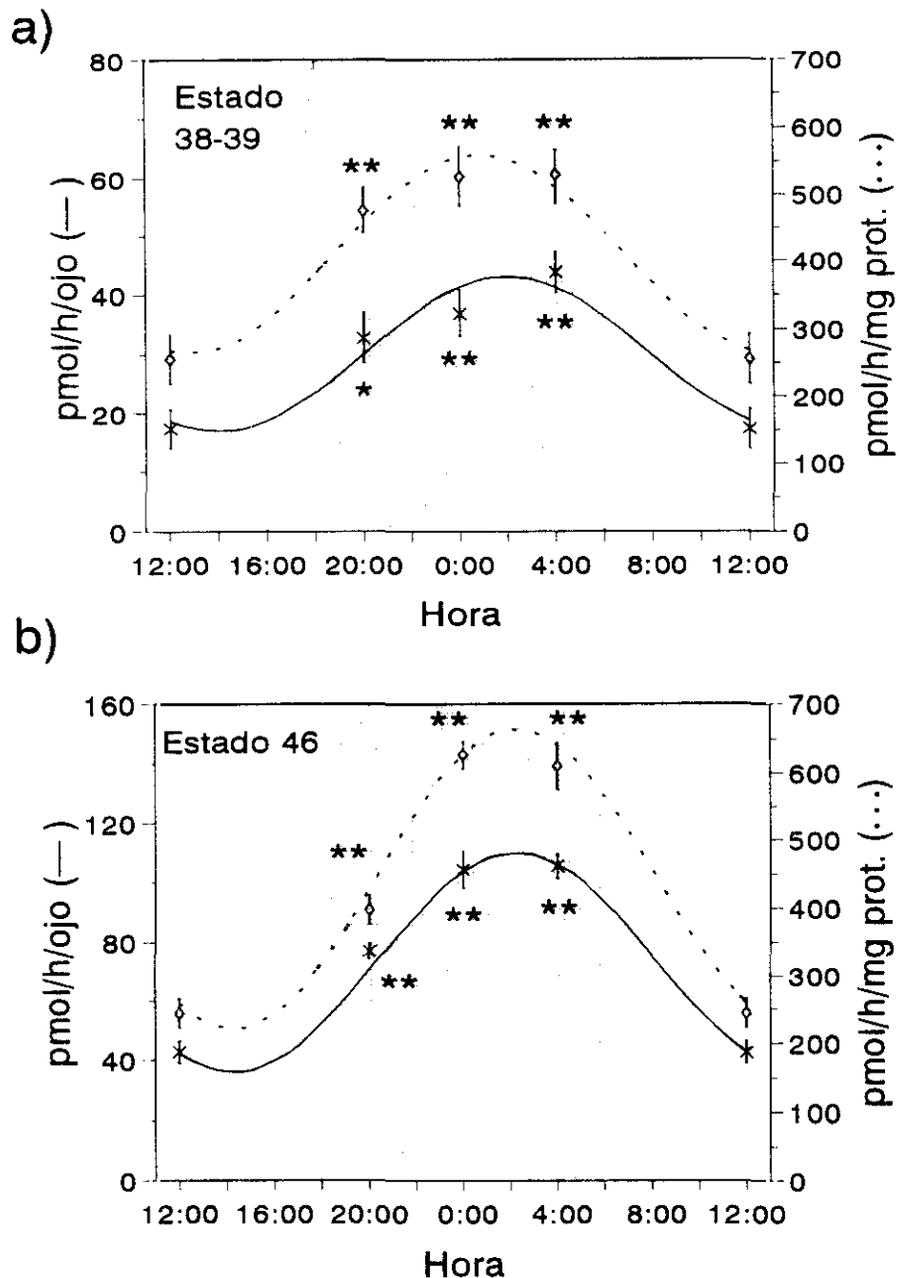


Figura 17. Ritmos día/noche de la actividad NAT en el ojo de larvas de *D. pictus*, en los siguientes estados de desarrollo: **a)** 38-39 y **b)** 46 (Gosner). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=4). Las curvas representan el ajuste de los datos a una función sinusoidal. El área sombreada indica la fase oscura del ciclo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los valores diurnos.

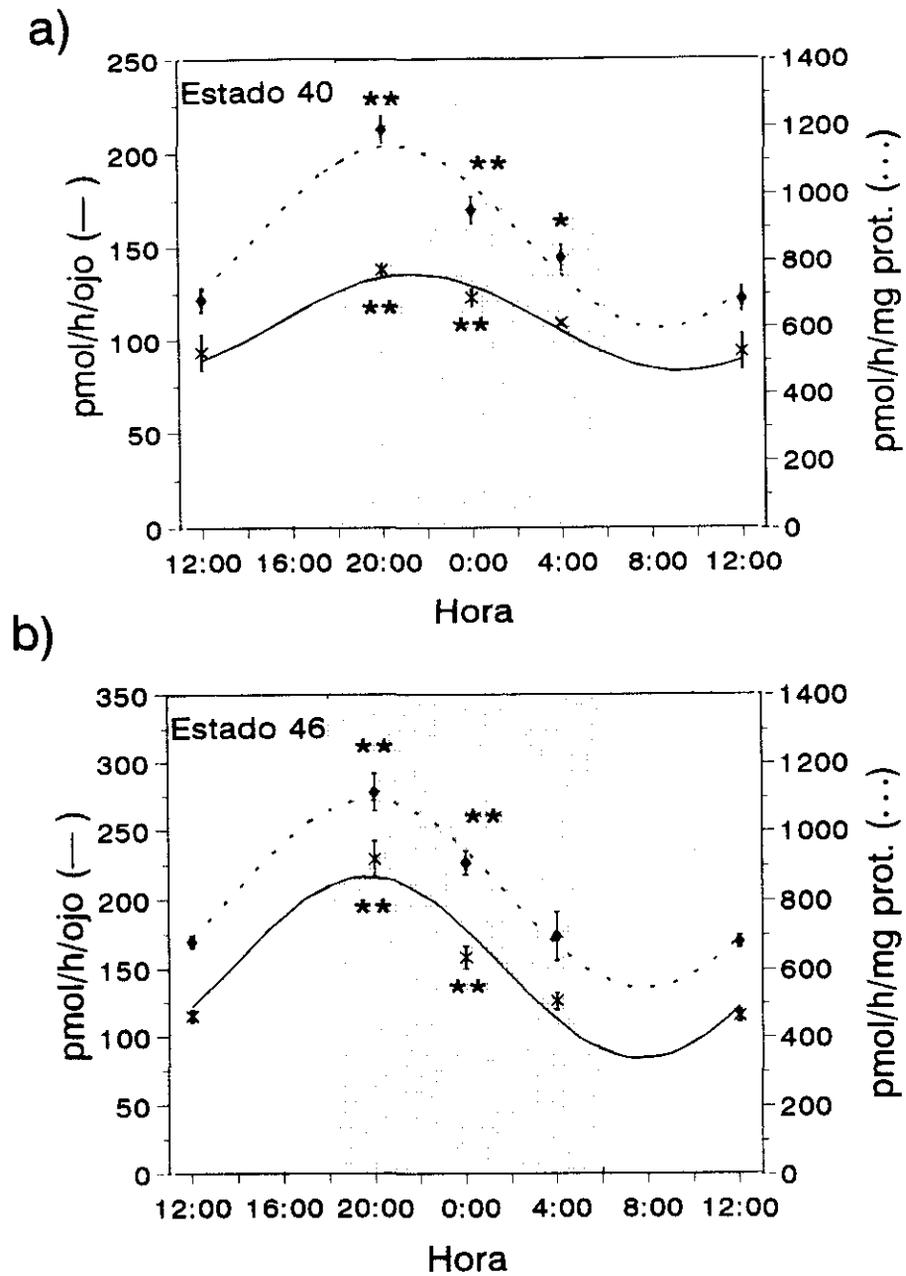


Figura 18. Ritmos día/noche de la actividad NAT en el ojo de larvas de *B. calamita*, en los siguientes estados de desarrollo: a) 40 y b) 46 (Gosner). Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. ($n=4$). Las curvas representan el ajuste de los datos a una función sinusoidal. El área sombreada indica la fase oscura del ciclo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los valores diurnos.

Tabla IV. Parámetros de la función sinusoidal que describen la evolución ontogénica del ritmo diario de la actividad NAT total en la retina de distintas especies de anfibios anuros. Unidades de la actividad NAT pmol/h/ojo.

Especie (Tabla) y estado	Nivel medio (pmol/h/ojo) $A_0 \pm EE$	Amplitud (pmol/h/ojo) $A_1 \pm EE$	Ruido/señal $EE(A_1)/A_1$	Acrofase (h) $\varphi \pm EE$	Max/Min
<u><i>Rana perezi</i></u> (G)					
21-22(/cab.)	1,20 \pm 0,12	0,269 \pm 0,15	0,569	22,59 \pm 0,42	1,58
25	5,12 \pm 0,11	0,997 \pm 0,15	0,151*	21,28 \pm 0,10	1,48
26-27	30,11 \pm 1,41	14,57 \pm 2,00	0,137*	20,95 \pm 0,17	2,88
40	144,7 \pm 6,04	55,74 \pm 8,06	0,145*	22,11 \pm 0,17	2,25
46	197,1 \pm 8,47	75,44 \pm 10,8	0,143*	23,26 \pm 0,18	2,24
<u><i>Xenopus laevis</i></u> (NF)					
37-38(/cab.)	1,737 \pm 0,14	0,405 \pm 0,17	0,422	0,51 \pm 0,40	1,61
43-44	3,251 \pm 0,17	1,901 \pm 0,21	0,112*	0,50 \pm 0,22	3,82
46-47	12,60 \pm 0,58	11,23 \pm 0,74	0,066*	0,51 \pm 0,14	17,89
52-53	50,18 \pm 1,87	37,69 \pm 2,43	0,064*	1,17 \pm 0,13	7,04
65-66	82,04 \pm 2,18	79,80 \pm 2,87	0,036*	1,92 \pm 0,09	>31
<u><i>Discoglossus pictus</i></u> (G)					
38-39	29,97 \pm 2,02	12,94 \pm 2,72	0,215*	1,96 \pm 0,26	2,52
46	72,99 \pm 2,70	36,74 \pm 3,67	0,099*	2,25 \pm 0,14	3,03
<u><i>Bufo calamita</i></u> (G)					
40	109,2 \pm 2,82	26,03 \pm 3,80	0,146*	21,36 \pm 0,11	1,63
46	150,2 \pm 5,78	65,91 \pm 8,68	0,132*	19,69 \pm 0,14	2,56

* El ritmo es considerado consistente cuando la relación ruido/señal < 0.3 .
EE = error estándar de la estimación del parámetro.

Tabla V. Parámetros de la función sinusoidal que describen la evolución ontogénica del ritmo diario de la actividad NAT específica en la retina de diferentes especies de anfibios anuros. Unidades de la actividad NAT pmol/h/mg prot.

Espece (Tabla) y estado	Nivel medio (pmol/h/mg prot) $A_0 \pm EE$	Amplitud $A_1 \pm EE$	Ruido/señal $EE(A_1)/A_1$	Acrofase (h) $\varphi \pm EE$	Max/Min
<u><i>Rana perezi</i></u> (G)					
21-22(/cab.)	12,05 \pm 1,03	1,454 \pm 1,43	0,981	20,20 \pm 0,39	1,27
25	346,1 \pm 10,4	57,60 \pm 14,0	0,243*	21,69 \pm 0,15	1,40
26-27	262,6 \pm 14,2	139,9 \pm 20,1	0,144*	20,92 \pm 0,19	3,28
40	331,0 \pm 15,6	164,2 \pm 21,3	0,129*	21,69 \pm 0,18	2,97
46	211,3 \pm 8,77	102,6 \pm 11,5	0,112*	22,55 \pm 0,16	2,89
<u><i>Xenopus laevis</i></u> (NF)					
37-38(/cab.)	40,61 \pm 4,00	12,29 \pm 5,16	0,420	1,91 \pm 0,38	1,87
43-44	479,4 \pm 26,3	293,9 \pm 33,0	0,112*	0,62 \pm 0,21	4,17
46-47	440,3 \pm 36,0	390,2 \pm 30,2	0,077*	0,48 \pm 0,18	16,58
52-53	380,6 \pm 15,4	276,7 \pm 19,9	0,072*	1,13 \pm 0,14	6,33
65-66	218,5 \pm 10,5	225,8 \pm 14,6	0,065*	2,33 \pm 0,14	>59
<u><i>Discoglossus pictus</i></u> (G)					
38-39	412,3 \pm 20,9	146,8 \pm 27,1	0,184*	0,81 \pm 0,20	2,11
46	442,5 \pm 12,7	220,8 \pm 17,4	0,079*	2,24 \pm 0,11	2,99
<u><i>Bufo calamita</i></u> (G)					
40	868,2 \pm 24,4	272,1 \pm 35,5	0,131*	20,40 \pm 0,11	1,91
46	816,8 \pm 24,7	271,2 \pm 36,8	0,136*	19,83 \pm 0,12	1,99

* El ritmo es considerado consistente cuando la relación ruido/señal < 0.3.
EE = error estándar de la estimación del parámetro.

En cuanto a la amplitud de la oscilación día/noche tanto *D. pictus* como *B. calamita* tienen valores similares, o ligeramente inferiores a los anteriormente mencionados para *R. perezi* (Tablas IV y V).

En la Fig. 19 se muestran las relaciones entre varios parámetros del modelo sinusoidal (datos de la Tabla V), comparando las distintas especies, en relación a los estados de desarrollo que presentaron un ritmo significativo. En la Fig. 19a) se representa la relación de la acrofase con la magnitud de la oscilación día-noche. Atendiendo al momento de la acrofase, las especies se pueden agrupar en dos bloques: uno, en el que se incluyen *R. perezi* y *B. calamita*, tiene la acrofase antes de la medianoche, mientras que el segundo (*X. laevis* y *D. pictus*) tiene el máximo nocturno en la segunda mitad de la fase oscura. En cuanto a la oscilación, se observa que *X. laevis* es cualitativamente diferente al resto de las especies, mostrando una diferencia máximo-mínimo muy superior.

En la Fig. 19b) se muestra la relación entre el nivel medio y la amplitud sinusoidal del ritmo de actividad NAT. Puede observarse que, dentro de cada especie (*R. perezi* y *X. laevis*) existe una relación positiva entre estos dos parámetros, exceptuando los estados muy tempranos de desarrollo. Es decir, los distintos estados de cada especie parecen situarse aproximadamente sobre líneas rectas que parten del origen de coordenadas. Cuando se comparan las especies entre sí, se observa que *B. calamita*, aunque tiene el mayor nivel medio, su amplitud es inferior a la que cabría esperar, esto puede verse también en la relación Max/Min, que no supera el valor de 2 para esta especie (Tabla V).

Un importante hecho a destacar cuando se comparan las especies entre sí, es que los parámetros del modelo sinusoidal obtenidos para todos los estados de la misma especie se encuentran siempre próximos (líneas discontinuas Fig. 19).

4. RITMO ESTACIONAL DE NAT Y MELATONINA OCULAR EN *R. perezi*.

La evolución estacional de la producción rítmica diaria de MEL en la retina de individuos adultos de *R. perezi* fue valorada mediante la determinación de la actividad NAT y de los niveles de MEL en las cuatro estaciones del año, obteniéndose los siguientes resultados:

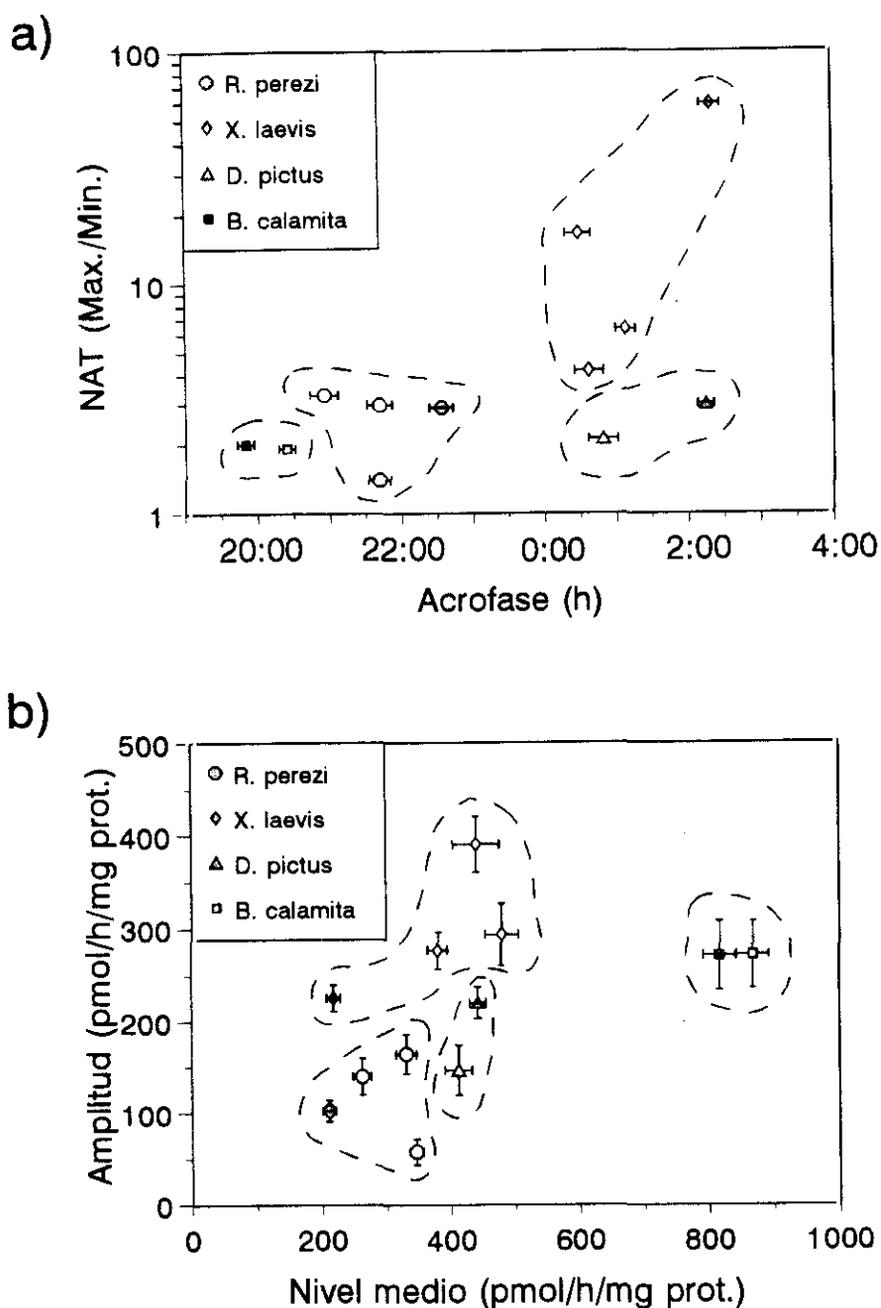


Figura 19. Comparación de los parámetros obtenidos del ajuste a una función sinusoidal de cada uno de los ritmos diarios de actividad NAT obtenidos durante la ontogenia de larvas de anfibios anuros. **a)** Relación entre la acrofase y la amplitud de la oscilación día/noche, **b)** Relación entre el nivel medio y la amplitud. Los parámetros se representan como la estimación \pm EE.

4.1. Primavera.

Aparece un ritmo día/noche significativo tanto para la actividad NAT (ANOVA $P < 0,01$) como para la MEL de la retina (ANOVA $p < 0,01$), encontrándose que ambos parámetros están significativamente elevados respecto a los niveles diurnos a las 20, 22, 24 y 2 horas de la fase oscura ($p < 0,01$).

A partir del modelo sinusoidal, se pone de manifiesto la significación del ritmo de la actividad NAT (Tabla VI: ruido/señal 0,157) mostrando además un incremento nocturno de 1,46 veces respecto a los niveles diurnos. La acrofase tiene lugar 1 hora antes de la medianoche (Tabla VI).

La MEL ocular presenta también un máximo nocturno significativo con una relación ruido/señal inferior a 0,3 (Tabla VII). Pero la acrofase tiene lugar antes de la medianoche. Esta situación da lugar a una marcada asimetría del pico nocturno (δ/σ 75,2 %; Tabla VIII).

4.2. Verano.

En esta época se mantiene el carácter rítmico de la síntesis de MEL (ANOVA, $p < 0,01$), encontrándose diferencias significativas ($p < 0,01$) para todos los puntos nocturnos (Fig. 21a).

Para la NAT también se aprecia este ritmo (ANOVA, $p < 0,01$), resultando la actividad enzimática de todos los puntos nocturnos, significativamente superior respecto a los valores de día ($p < 0,01$). El ritmo sinusoidal de la actividad NAT muestra la significación estadística del mismo, llegándose a duplicar la cantidad de enzima en el máximo nocturno respecto a los niveles durante el día (Tabla VI).

El perfil de MEL se muestra paralelo al anteriormente descrito para primavera, apareciendo el máximo en la primera mitad de la noche. En este caso también se muestra una acusada asimetría (88,2 %; Tabla VIII), además en esta época los niveles nocturnos de MEL son más elevados que en primavera (la altura gaussiana casi duplica a la correspondiente en primavera, Tabla VII). Hay que tener en cuenta que la diferencia en la duración de la fase oscura entre estas dos épocas es de sólo 30 minutos, lo cual explicaría la estrecha similitud entre los perfiles de MEL de ambas estaciones.

4.3. Otoño.

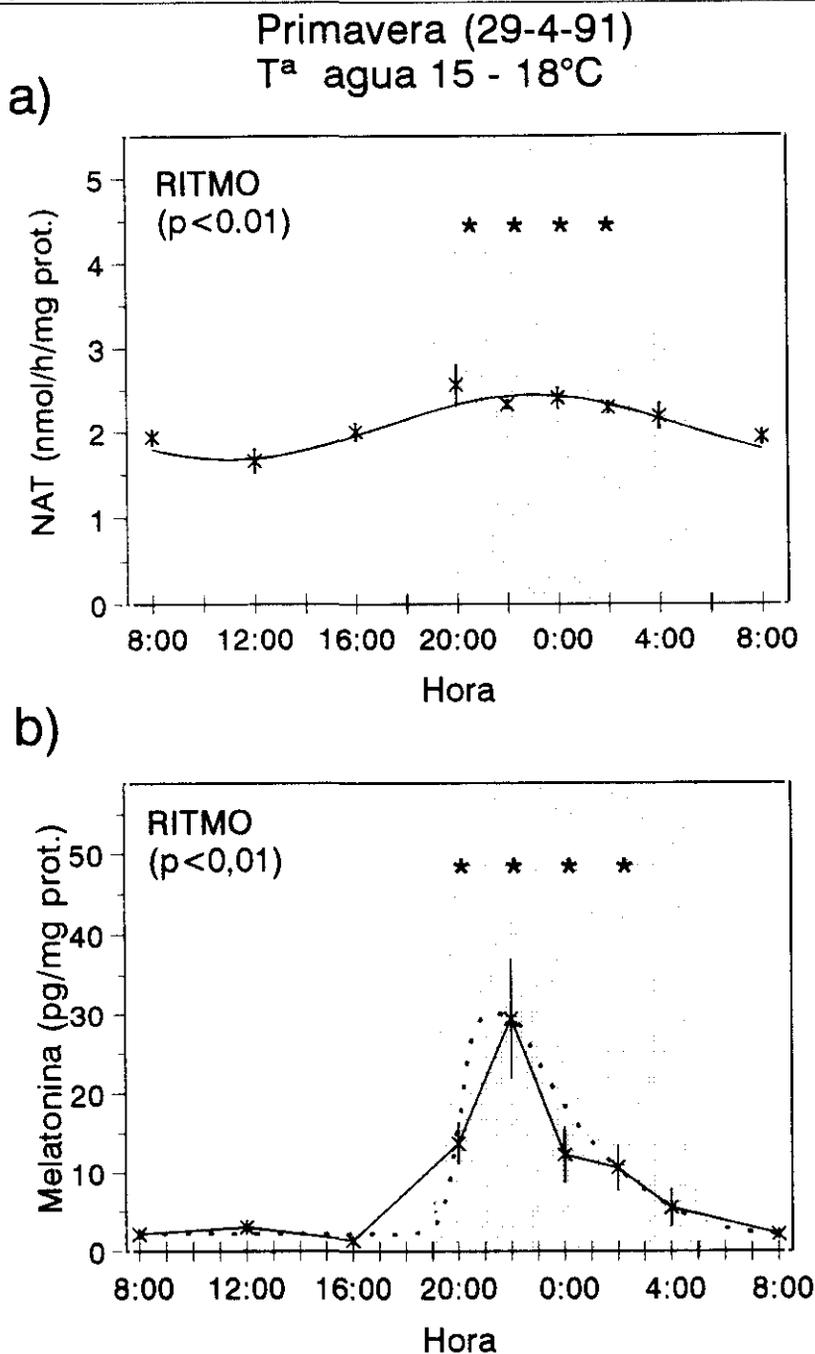


Figura 20. a) Ritmo diario de la actividad NAT ocular en animales adultos de *R. perezii* durante la primavera; la línea continua representa la función sinusoidal estimada a partir de los valores experimentales. **b)** Ritmo diario de melatonina en la retina de los mismos animales; la línea punteada representa la función gaussiana cíclica estimada a partir de los valores experimentales. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=8) El área sombreada indica la fase oscura del ciclo diario (duración 10:10 horas).

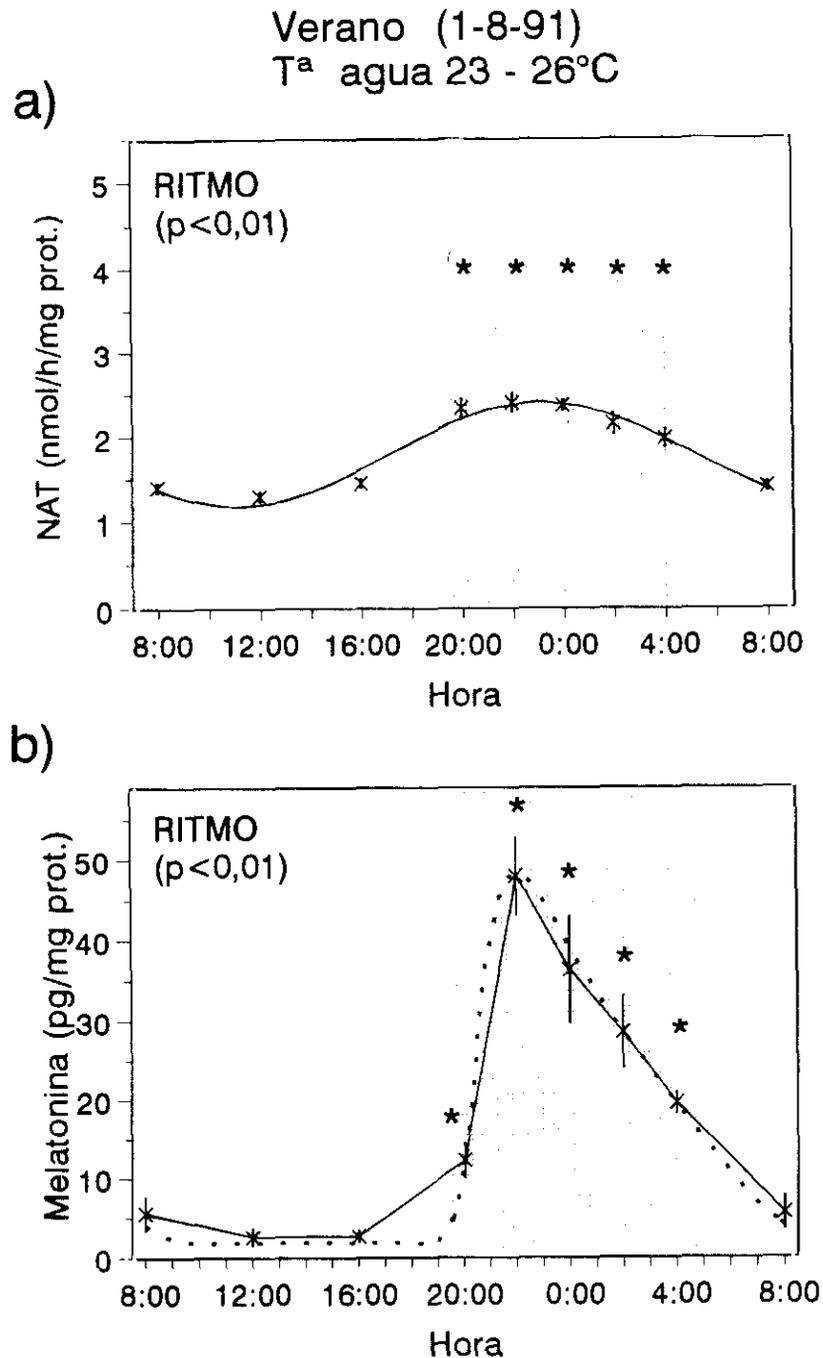


Figura 21. a) Ritmo diario de la actividad NAT ocular en animales adultos de *R. perezii* durante el verano; la línea continua representa la función sinusoidal estimada a partir de los valores experimentales. b) Ritmo diario de melatonina de la retina de los mismos animales, la línea punteada representa la función gaussiana cíclica estimada a partir de los valores experimentales. Los datos se representan como $\bar{x} \pm e$. (n=8). El área sombreada indica la fase oscura del ciclo diario (duración 9:40 horas). * $p < 0,01$ respecto a los valores diurnos.

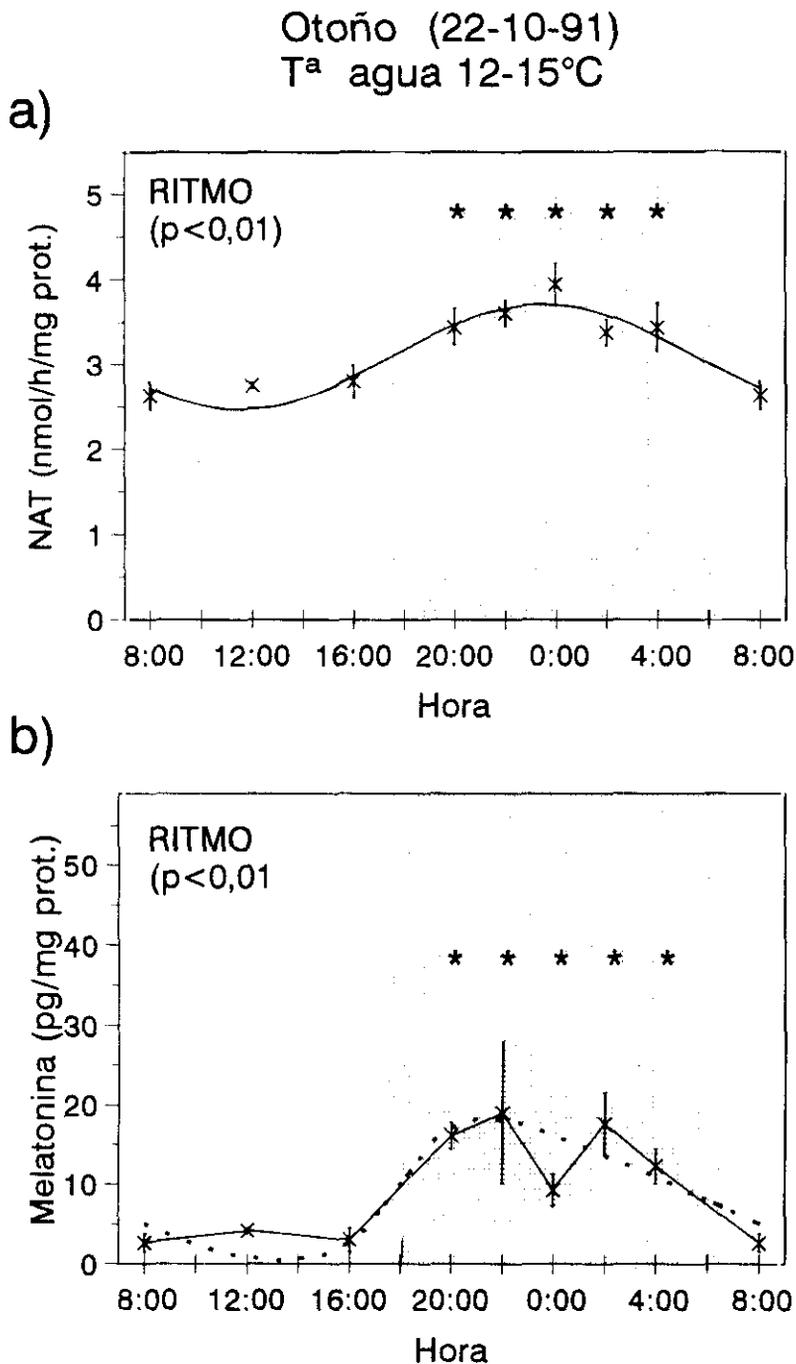


Figura 22. a) Ritmo diario de la actividad NAT ocular en animales adultos de *R. perezi* durante el otoño; la línea continua representa la función sinusoidal estimada a partir de los valores experimentales. **b)** Ritmo diario de melatonina en la retina de los mismos animales; La línea punteada representa la función gaussiana cíclica estimada a partir de los valores experimentales. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=8). El área sombreada indica la fase oscura del ciclo diario (duración 13:10 horas).

Los ritmos de actividad NAT y MEL en la retina se mantienen (ANOVA, $p < 0,01$ Fig. 22), y aunque los valores nocturnos de MEL son inferiores respecto a los de primavera y verano, todos los puntos nocturnos están significativamente elevados ($p < 0,01$) respecto a los niveles diurnos.

En esta época el ritmo sinusoidal de la actividad NAT muestra una oscilación día/noche menor con respecto a la época anterior, aunque los niveles medios (A_0 , Tabla VI) se encuentran elevados respecto a verano y primavera.

En cuanto al ritmo de MEL el perfil es muy diferente en esta época del año, la altura del máximo nocturno es claramente inferior con respecto a los valores de primavera y verano. Además, la duración del pico nocturno se duplica (valor de σ) y la asimetría es mucho menor respecto a las épocas anteriores (36,4 % frente > 75 %; Tabla VIII).

4.4. Invierno.

En esta época del año no se detectó ritmo en la actividad NAT ni en el perfil de MEL (ANOVA no significativo, Fig. 23). Tanto el modelo sinusoidal como el gaussiano demuestran esta ausencia de ritmo (ruido/señal $> 0,3$ en ambos casos, Tablas VI y VII). Sin embargo, el nivel medio de la actividad NAT en esta época es el más alto comparado con el resto de las estaciones, mientras que el nivel de MEL es el más reducido.

En la Fig. 24 se muestra la relación entre la temperatura del agua medida durante el día y la noche (máxima y mínima respectivamente), y los niveles de actividad NAT y MEL determinados en cada época del año. En cuanto a los niveles diurnos (Fig. 24a), se observa que la actividad NAT muestra un perfil inverso con la temperatura, siendo superior durante el invierno, cuando la temperatura es más baja. Sin embargo, para la MEL se observan niveles basales a lo largo del año, siendo los niveles diurnos independientes de la temperatura ambiental. El efecto de la luz suprimiendo la síntesis de MEL resulta ser muy superior al efecto de la temperatura.

En la Fig. 24b) se muestran los resultados obtenidos respecto a las temperaturas nocturnas, en este caso la actividad NAT presenta un patrón paralelo al descrito durante la fase diurna, aunque con niveles absolutos mayores, excepto en el invierno, época en la que no hay ritmo diario en la actividad de esta enzima. En cambio, la MEL nocturna muestra una fuerte dependencia de la temperatura ambiental, incrementándose los niveles con la temperatura en una forma lineal.

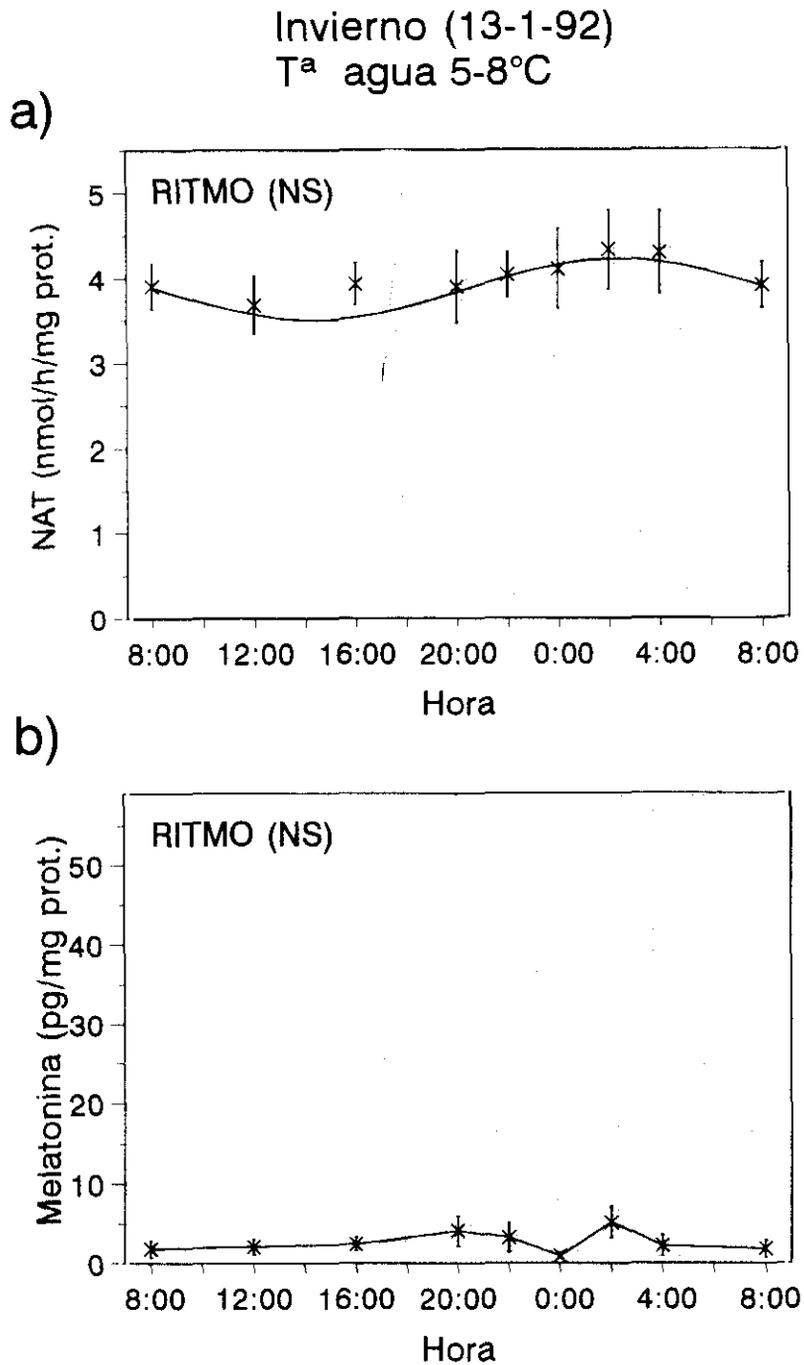


Figura 23. a) Ritmo diario de la actividad NAT ocular en animales adultos de *R. perezi* durante el invierno; la línea continua representa la función sinusoidal estimada a partir de los valores experimentales. b) Ritmo diario de melatonina en la retina de los mismos animales. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=8). El área sombreada indica la fase oscura del ciclo diario (duración 14:30 horas). NS Ritmo estadísticamente no significativo.

Tabla VI. Parámetros de la función sinusoidal que describe la evolución estacional del ritmo diario de la actividad NAT de la retina de *Rana perezi*.

Estación	<u>Nivel medio</u>	<u>Amplitud</u>	<u>Ruido/señal</u>	<u>Acrofase (h)</u>	<u>Max/Min</u>
	$A_0 \pm EE$	$A_1 \pm EE$	EE_{A_1}/A_1	$\varphi \pm EE$	
Primavera	$2,06 \pm 0,045$	$0,383 \pm 0,060$	$0,157^*$	$23,03 \pm 0,101$	1,46
Verano	$1,80 \pm 0,035$	$0,608 \pm 0,047$	$0,077^*$	$23,12 \pm 0,078$	2,02
Otoño	$3,09 \pm 0,079$	$0,617 \pm 0,107$	$0,177^*$	$23,49 \pm 0,108$	1,50
Invierno	$3,86 \pm 0,139$	$0,356 \pm 0,193$	$0,542$	$2,31 \pm 0,172$	1,20

Los unidades de los parámetros A_0 y A_1 son nmol/h/mg prot.

* El ritmo es considerado significativo cuando la relación ruido/señal $< 0,3$.

EE = error estándar de la estimación del parámetro.

Tabla VII. Parámetros de la función gaussiana cíclica que describen la evolución estacional del ritmo diario de los niveles de melatonina en la retina de *Rana perezii*.

Estación	Nivel constante $A_0 \pm EE$	Altura $H \pm EE$	Ruido/señal $EE(H)/H$	Acrofase (h) $\varphi \pm EE$	sigma $\sigma \pm ES$	Asimetría $\delta \pm EE$
Primavera	$2,19 \pm 1,38$	$28,84 \pm 3,46$	0,12*	$21,43 \pm 0,46$	$0,21 \pm 0,042$	$0,158 \pm 0,088$
Verano	$1,85 \pm 1,84$	$46,39 \pm 3,53$	0,07*	$22,01 \pm 0,63$	$0,27 \pm 0,098$	$0,237 \pm 0,098$
Otoño	$-0,62 \pm 3,13$	$17,97 \pm 3,86$	0,21*	$21,55 \pm 1,09$	$0,56 \pm 0,065$	$0,204 \pm 0,100$
Invierno	$-0,09 \pm 2,20$	$3,70 \pm 2,00$	0,54	$22,42 \pm 0,60$	$0,59 \pm 0,280$	$0,080 \pm 0,120$

Las unidades de A_0 y H son pg/mg prot.

* El ritmo es considerado consistente cuando la relación ruido/señal $< 0,3$.

EE = error estándar de la estimación del parámetro.

Tabla VIII. Relación entre los parámetros σ y δ del modelo gaussiano cíclico con la asimetría del máximo nocturno, y la duración en horas de los niveles elevados de melatonina dentro de la fase oscura del ciclo, correspondientes a la evolución estacional en retina de *R. perezii*.

Estación	Fase oscura (h)	σ	δ	δ/σ (%)	t_{50} (h)	$t_{50}/\text{Noche}(\%)$
Primavera	10,17	0,21	0,158	75,2	4,345	42,7
Verano	9,67	0,27	0,237	88,2	6,328	65,4
Otoño	13,17	0,56	0,204	36,4	11,686	88,7
Invierno	14,50	NS	NS	--	--	--

t_{50} Período durante el que los niveles de melatonina son superiores al 50 % del máximo nocturno.

NS = El ritmo no es significativo.

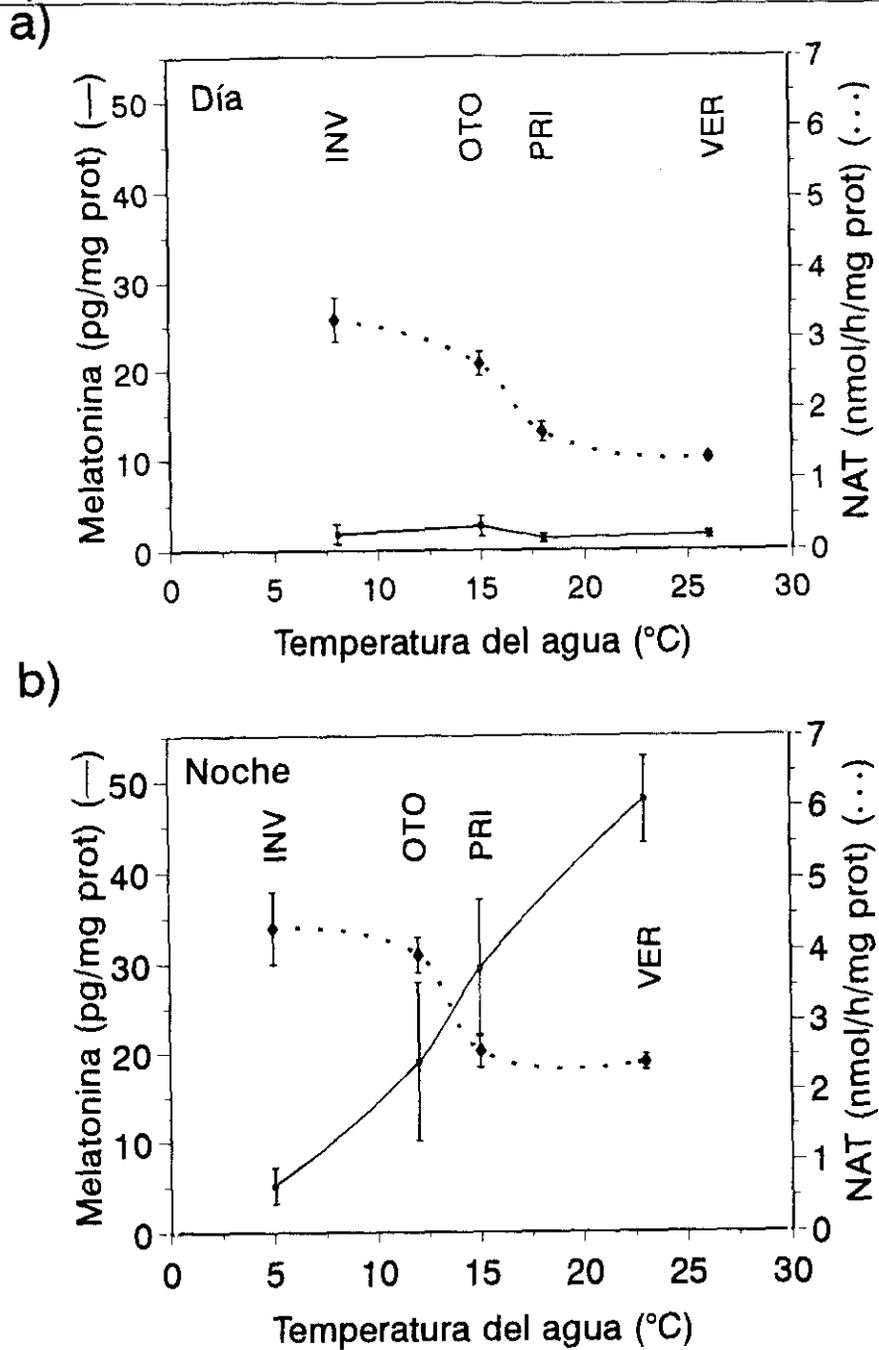


Figura 24. Evolución estacional de la actividad NAT (línea punteada) y niveles de melatonina (línea continua) determinados en la retina de adultos de *R. perezi* en relación con: **a)** Temperatura máxima del agua durante el día, **b)** Temperatura mínima del agua durante la noche. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e.$ (n=8).

Por último, en la Tabla VIII, se muestran los resultados obtenidos de la relación entre los parámetros que definen la anchura del pico del modelo gaussiano cíclico (σ y δ) y la duración en horas de los niveles elevados durante la noche. Se observa que, el período de tiempo durante el que la concentración de MEL se encuentra por encima de la mitad de la altura del máximo (t_{50}) es muy similar para las épocas de primavera y verano, suponiendo aproximadamente 50 % del tiempo total de oscuridad. En cambio, en otoño, con fotoperíodo corto, el valor de t_{50} duplica al de las estaciones anteriores, abarcando casi la totalidad de la duración de la noche (89 %). No se realizaron los cálculos correspondiente al invierno debido a la inexistencia de ritmo en los niveles de MEL para esta época.

5. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE LA NAT.

a) Interferencias de otras enzimas en el ensayo de la NAT.

- Adición de la pargilina.

Para permitir la inhibición completa de la MAO de la retina, se incluyó pargilina en el tampón, preincubándose los homogeneizados a 25°C durante 5 minutos, antes del comienzo del ensayo de la NAT.

En primer lugar se realizó la curva dosis respuesta de la pargilina (de 1 μ M a 5 mM) respecto a la actividad NAT, no encontrándose efectos significativos entre los homogeneizados incubados a las distintas concentraciones de pargilina utilizadas (Fig. 25a).

Debido a la necesidad de utilizar bajas concentraciones de sustrato para los estudios cinéticos, las anteriormente mencionadas interferencias pueden resultar amplificadas. Para averiguar este posible efecto se añadió pargilina (100 μ M) a varias concentraciones de triptamina utilizadas en el estudio cinético. Como puede observarse en la Fig. 25b) no hay diferencias entre los homogeneizados incubados con o sin pargilina a ninguna de las concentraciones de triptamina.

- Adición de eserina.

La acción de las arilacilamidas podrían interferir en el ensayo hidrolizando la amina recién acetilada por la enzima (dada su estrecha homología estructural entre la N-acetiltriptamina y la melatonina), y por lo que la actividad NAT sería subestimada. Para probar esta posibilidad se incluyó en el ensayo eserina (inhibidor no específico de esterasas),

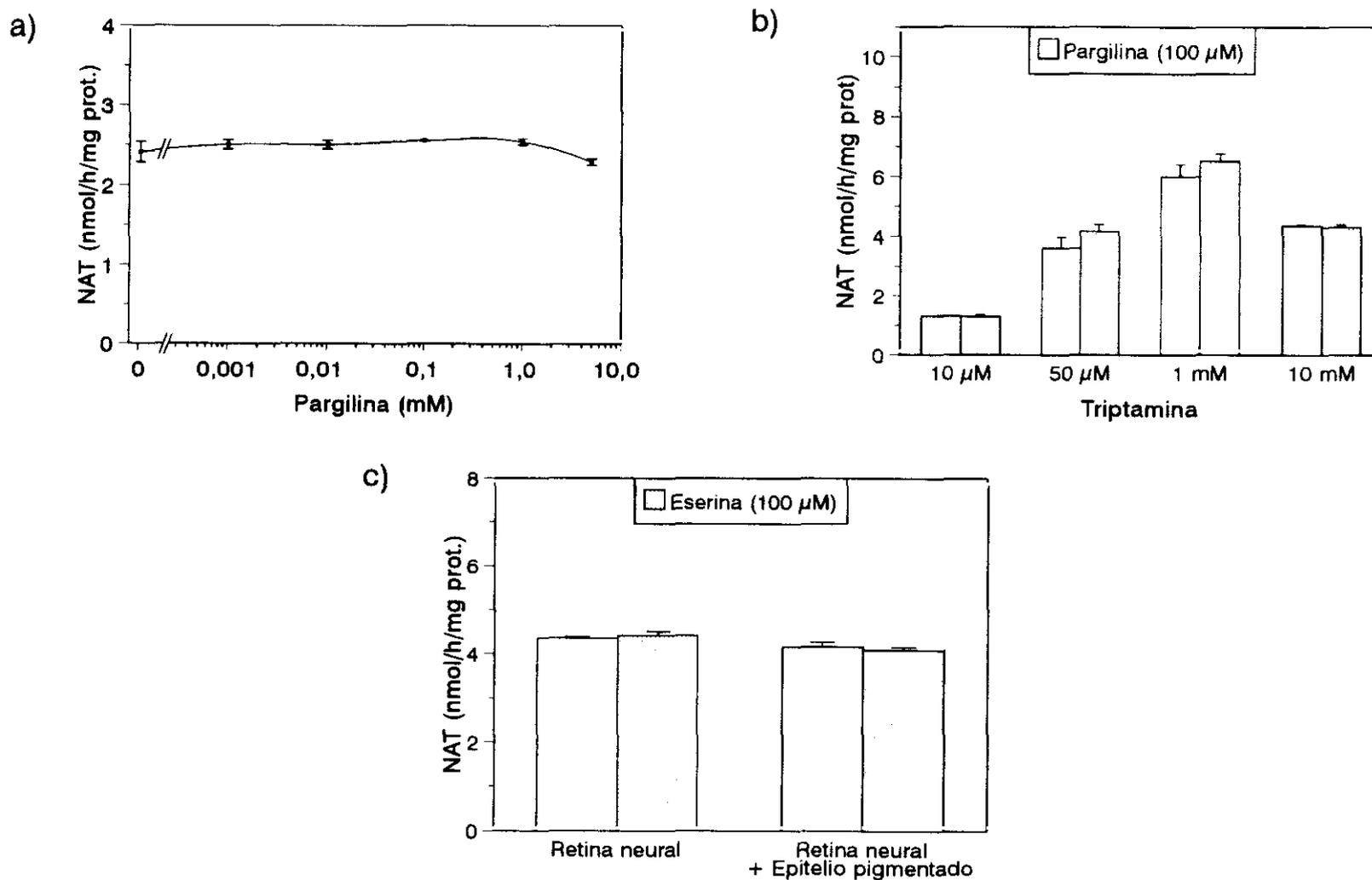


Figura 25. a) Efecto de la concentración de pargilina sobre la actividad NAT en retina de *R. perezii*. b) Efecto de la adición de pargilina (100 μ M) en el ensayo de la actividad NAT utilizando concentraciones crecientes de triptamina. c) Efecto de la adición de eserina sobre la actividad NAT. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=3).

capaz de inhibir también la arilacilamidasa encargada de la degradación de la MEL. Puesto que parece ser que la acilamidasa se localiza principalmente en el epitelio pigmentado en el ensayo también se incluyó este tejido, no apreciándose diferencias entre los ensayos realizados en ausencia o presencia de eserina 100 μM (Fig. 25c).

A partir de los resultados obtenidos utilizando pargilina y eserina, puede concluirse que bajo las condiciones experimentales utilizadas, no se observan efectos negativos de otras enzimas presentes en el homogeneizado de retina de *R. perezi*, sobre de determinación de la actividad NAT en este tejido, por lo cual, el método utilizado es totalmente válido para llevar a cabo estudios cinéticos de este enzima.

b) Efecto de la temperatura de incubación sobre la cinética utilizando AcCoA y triptamina como sustratos.

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la cinética de la NAT. Para lo cual se utilizó un rango de temperaturas que abarca el intervalo en el cual puede encontrarse *R. perezi* a lo largo del año.

En la Fig. 26a) se muestra la evolución de los valores de K_M para la AcCoA respecto a la temperatura del ensayo. La K_M incrementa desde un valor de 13 μM a 10°C hasta 212 μM a 35°C. En el mismo sentido se observa un incremento sostenido de la V_{max} con la temperatura (de 1,2 a 15 nmol/h/ojo) (Fig. 26b).

En cuanto a la caracterización respecto a la triptamina se observa también un marcado efecto de la temperatura sobre las constantes cinéticas, el aumento de la temperatura siempre va acompañado con un incremento de los valores de K_M y V_{max} (Fig. 27).

Al representar la relación existente entre K_M y V_{max} se observa que para ambos parámetros existe una correlación positiva y significativa (modulación térmica positiva) para ambos sustratos (AcCoa Fig. 28a, $r=0,958$ $p<0,01$; Triptamina Fig. 28c, $r=0,986$ $p<0,01$).

Utilizando la representación de Arrhenius con los valores de las constante V_{max} y K_M , se calcularon la energía de activación (E_a) y la entalpía de formación del complejo ES, respectivamente. Se puede observar que existe una correlación significativa entre el inverso de la temperatura y el Ln de las constantes cinéticas (Fig. 28b y d). La formación del complejo ES es exotérmica ($\Delta H_s < 0$) para ambos cosustratos, aunque la entalpía es ligeramente mayor para el AcCoA que para la triptamina ($-1,11 \pm 0,036$ respecto a $-0,70 \pm 0,146$ KJ/mol).

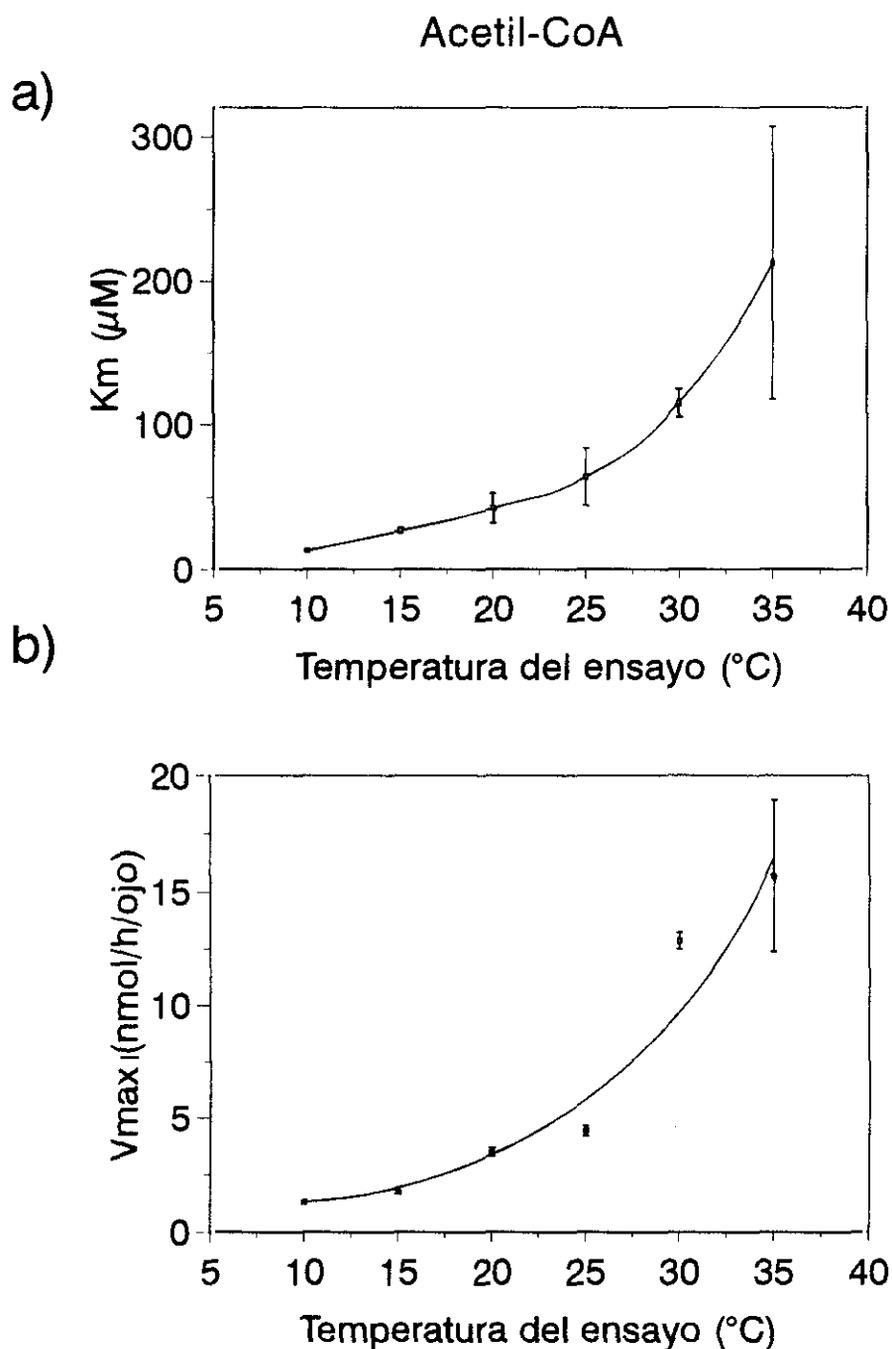


Figura 26. Efecto de la temperatura del ensayo sobre los valores de la K_m (a) y V_{max} (b) de la cinética de la NAT en retina de *R. perezii* con respecto a AcCoA, utilizando Triptamina (10 mM) como cosubstrato. Cada punto representa el valor de la constante \pm EE. de la estimación. Método de Wilkinson (1961).

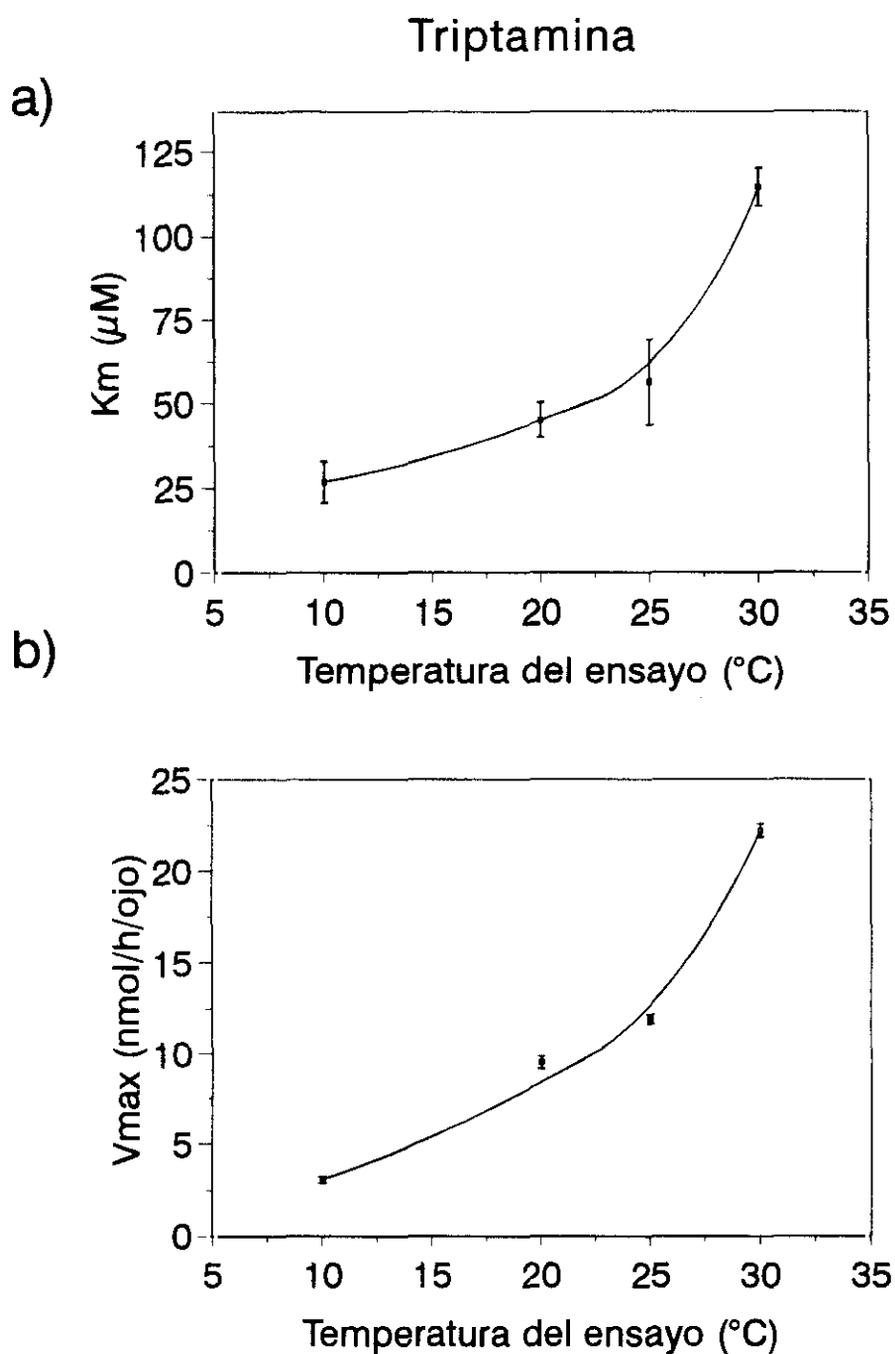


Figura 27. Efecto de la temperatura del ensayo sobre los valores de la K_m (a) y V_{max} (b) de la cinética de la NAT de retina de *R. perezi* con respecto a la triptamina, utilizando AcCoA ($250 \mu M$) como cosubstrato. Cada punto representa el valor de la constante \pm EE de la estimación. Método de Wilkinson (1961).

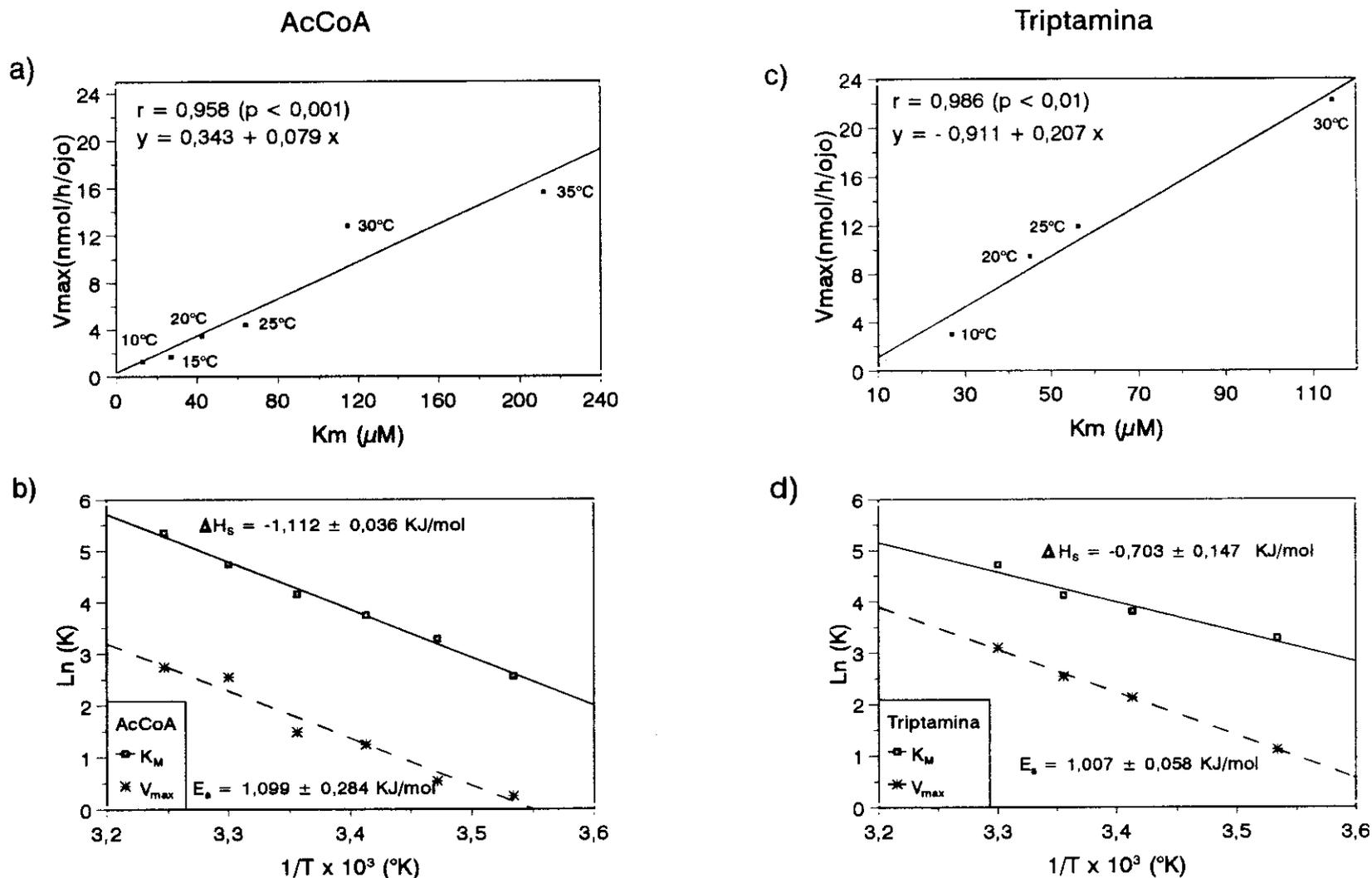


Figura 28. Correlación entre los valores de la K_M y la V_{max} determinados para la NAT en la retina de *R. perezii* siguiendo el método de Wilkinson (1961) a distintas temperaturas, y para los dos substratos: **a)** AcCoA **c)** Triptamina. Representación de Arrhenius para las constantes V_{max} y K_M , procedentes de la cinética de la NAT de retina de *R. perezii* utilizando **b)** AcCoA y **d)** triptamina. $1/T$ inverso de la temperatura.

Tabla IX. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) en el intervalo de temperaturas (10-35°C), para las constantes cinéticas de la NAT de la retina de *R. perezii*, respecto a los dos cosubstratos: AcCoA y triptamina, y para la actividad de la misma enzima valorada a una concentración de los cosubstratos inferior a sus respectivas K_M .

Intervalo T_a	Q_{10} (K_M)		Q_{10} (V_{max})		Q_{10} (NAT $_{K_M}$)	
	<u>AcCoA</u>	<u>Triptamina</u>	<u>AcCoA</u>	<u>Triptamina</u>	<u>AcCoA</u> (12 μ M)	<u>Triptamina</u> (10 μ M)
10-15	4,30	1,68	1,77	3,10	1,49	1,64
15-20	2,49		4,11		1,15	
20-25	2,27	1,56	1,61	1,58	1,30	1,05
25-30	3,20	4,12	8,42	3,47	1,56	1,47
30-35	3,42	--	1,49	--	1,29	--
$\bar{x} \pm e.$	3,14 \pm 0,36	2,45 \pm 0,83	3,48 \pm 1,33	2,71 \pm 0,58	1,36 \pm 0,07	1,39 \pm 0,17

Los coeficientes de temperatura (Q_{10}) tanto para la K_M como para la V_{max} se recogen en la Tabla IX. Puede observarse que los valores son siempre mayores que 1, lo que indica que, en todos los intervalos de temperatura estudiados, siempre se incrementa el valor de las dos constantes cinéticas, de una forma continuada y homogénea. Comparando la media de los valores de Q_{10} obtenidos para cada cosustrato, se observa que la cinética de la NAT es más sensible térmicamente con respecto a AcCoA (Q_{10} para K_M y $V_{max} > 3$) que para la triptamina (Q_{10} 2,45 y 2,7 respectivamente). En esta misma tabla se incluyen los valores de Q_{10} obtenidos para la actividad NAT en el intervalo de temperaturas utilizado en el estudio cinético, medidos a una concentración subsaturante de los cosustratos (AcCoA 12 μ M, triptamina 10 μ M). Puede observarse que la modulación térmica positiva compensa la actividad NAT, ya que la media del coeficiente de temperatura es muy inferior que el correspondiente de la K_M y V_{max} , y sólo ligeramente superior a 1 (que representaría la compensación térmica completa).

c) Inhibición por exceso de serotonina.

Como se mostró en la Tabla II, existen marcadas diferencias en las constantes cinéticas de la NAT dependiendo de la indolamina utilizada como sustrato, por lo cual, en primer lugar se realizó el estudio de la cinética de la NAT utilizando la serotonina que es el sustrato endógeno de esta enzima (Fig. 29a). Aparece una significativa inhibición de la NAT cuando la concentración de serotonina es superior a 100 μ M. La representación de Dixon (inverso de la velocidad de reacción respecto a la concentración de sustrato, figura incluida en la Fig. 29a) muestra una correlación positiva a altas concentraciones de serotonina, indicando una cinética de inhibición por exceso de sustrato.

Debido al hecho de que en este análisis se usó el complejo de serotonina-sulfato de creatinina, cabe la posibilidad de que la creatinina sea la responsable de la inhibición observada, pudiendo ser malinterpretada como una inhibición producida por la serotonina. Para probar esta posibilidad, se desarrolló el ensayo de la NAT utilizando concentraciones crecientes de sulfato de creatina (compuesto que se isomeriza a creatinina en solución acuosa) en el mismo intervalo que el utilizado para la caracterización cinética (0-10 mM), demostrándose la falta de efecto de la creatina sobre la actividad NAT, usando como sustratos el hidrocloreuro de triptamina o serotonina (Fig. 29b).

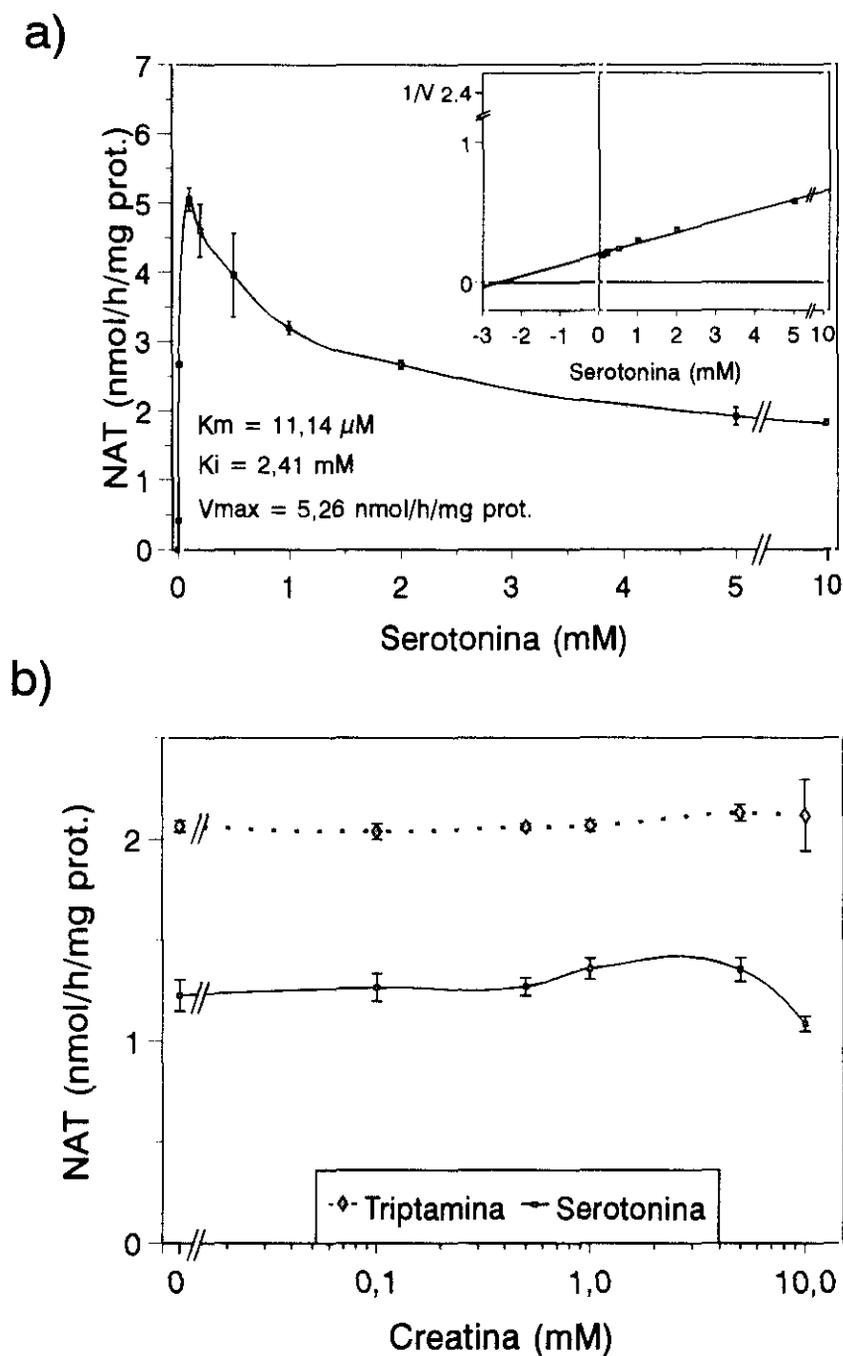


Figura 29. a) Caracterización cinética de la actividad NAT procedente de la retina de *R. perezi*, respecto a la concentración de serotonina. Se incluye la representación de Dixon en el ángulo superior para mostrar la inhibición por exceso de sustrato. b) Efecto de la concentración de creatina sobre la actividad NAT utilizando hidroclorenchloruros de serotonina y triptamina como

d) Efecto de la temperatura sobre la cinética de la NAT utilizando serotonina como sustrato.

La caracterización cinética para la triptamina y serotonina fue desarrollada en el intervalo de temperaturas (10-35°C) en dos ensayos sucesivos realizados a 10, 20, 30°C y 15, 25, 35°C respectivamente. El intervalo de concentraciones de las aminos usadas fue de 0 a 10 mM, manteniendo constante la concentración de AcCoA (250 μ M) en los dos ensayos.

En la Fig. 30 se resumen los resultados obtenidos. Se observa un incremento de la V_{max} con la temperatura para ambos sustratos (Fig 30 a). La V_{max} para la triptamina resultó ser superior que para la serotonina a todas las temperaturas ensayadas. De una forma paralela la K_M para ambas aminos incrementa (descenso en la afinidad) con la temperatura, la afinidad de la NAT por la serotonina es siempre mayor que para la triptamina (Fig. 30b). La evolución de la constante de inhibición (K_i) respecto a la temperatura se muestra en la Fig. 30c). La K_i para la triptamina muestra un ligero incremento con la temperatura, en cambio, la K_i para la serotonina muestra un patrón complejo en relación con la temperatura. El valor mínimo de la K_i se observa a 25°C, mostrando un incremento en su valor tanto a temperatura superiores como inferiores. A 10°C no se observa una inhibición significativa ($K_i > 10^5 \times K_M$).

Por último, en la Fig. 31a) se muestra la relación entre la V_{max} y la K_M , la correlación significativa observada entre ambos parámetros ($r=0,9657$; $p < 0,01$) indica la existencia de una modulación térmica positiva para la serotonina.

La representación de Arrhenius para las constantes V_{max} , K_M y K_i respecto a la serotonina se muestran en la Fig. 31b). La energía de activación es ligeramente superior ($1,28 \pm 0,15$ KJ/mol) que para el caso de AcCoA y triptamina (ver Fig. 28) aunque esta diferencia no llega a ser significativa. La unión del sustrato a la enzima muestra una $\Delta H_s < 0$ lo que indica el caracter exotérmico de dicha unión. El valor de $-0,79 \pm 0,149$ KJ/mol, es comparable a lo obtenido para la triptamina. En cambio, la energía de unión de la serotonina a la enzima como inhibidor muestra un cambio de fase a 25°C, mientras que a temperaturas inferiores a esta temperatura muestra una ΔH_i de $1,71 \pm 0,77$ KJ/mol (endotérmica), a temperaturas altas la unión de la serotonina es exotérmica $-0,91 \pm 0,25$ KJ/mol.

El modelo teórico utilizado para la inhibición por sustrato propuesto por Haldane (@ver Dixon, 1979) permite calcular una serie de parámetros derivados (Tabla X):

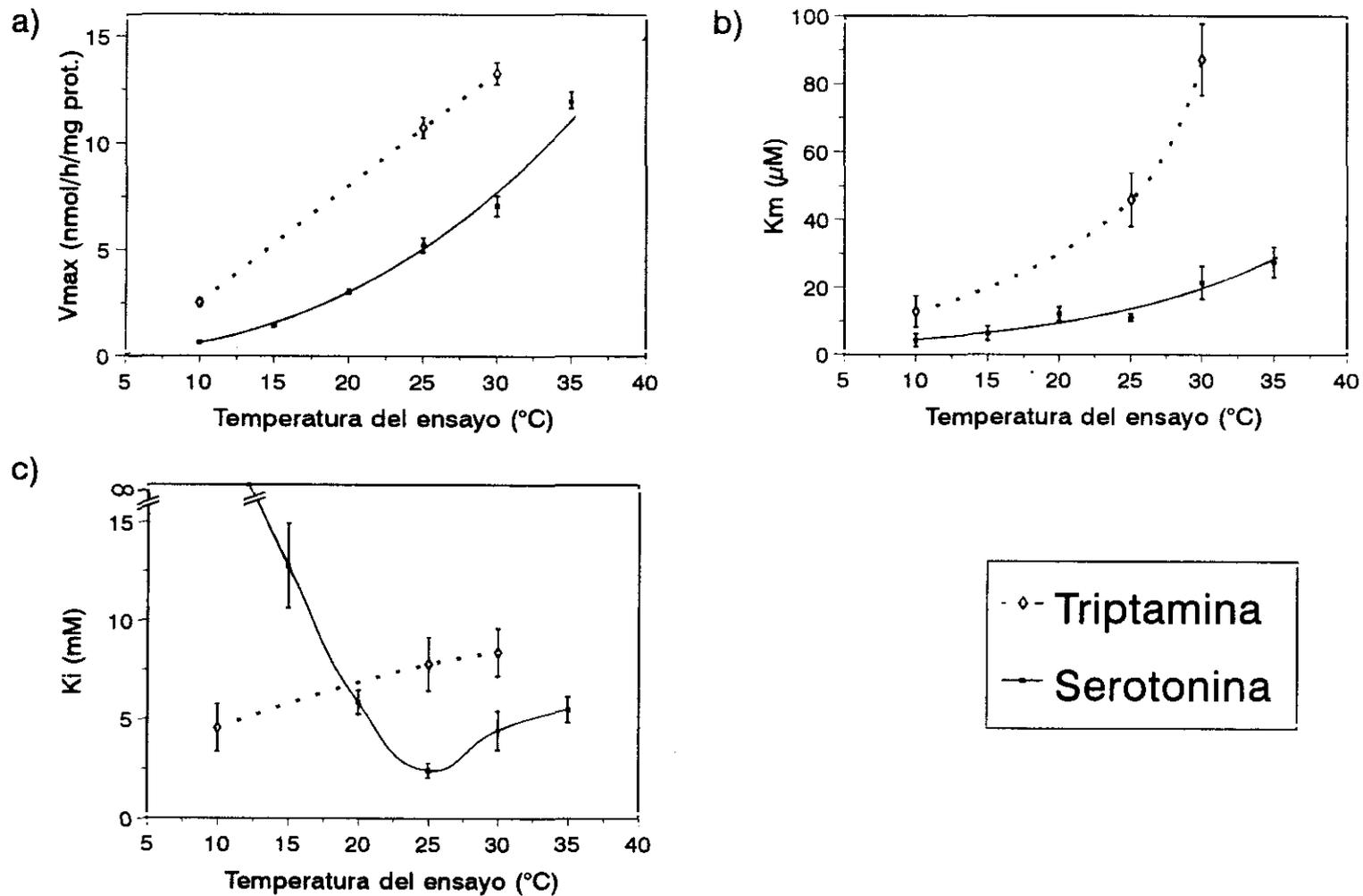


Figura 30. Efecto de la temperatura del ensayo sobre la cinética de la NAT procedente de la retina de *R. perezii* utilizando triptamina y serotonina como substrato. **a)** V_{max} , **b)** K_m , y **c)** K_i . Cada punto representa el valor de la constante \pm EE de la estimación (Método de Duggleby, 1981).

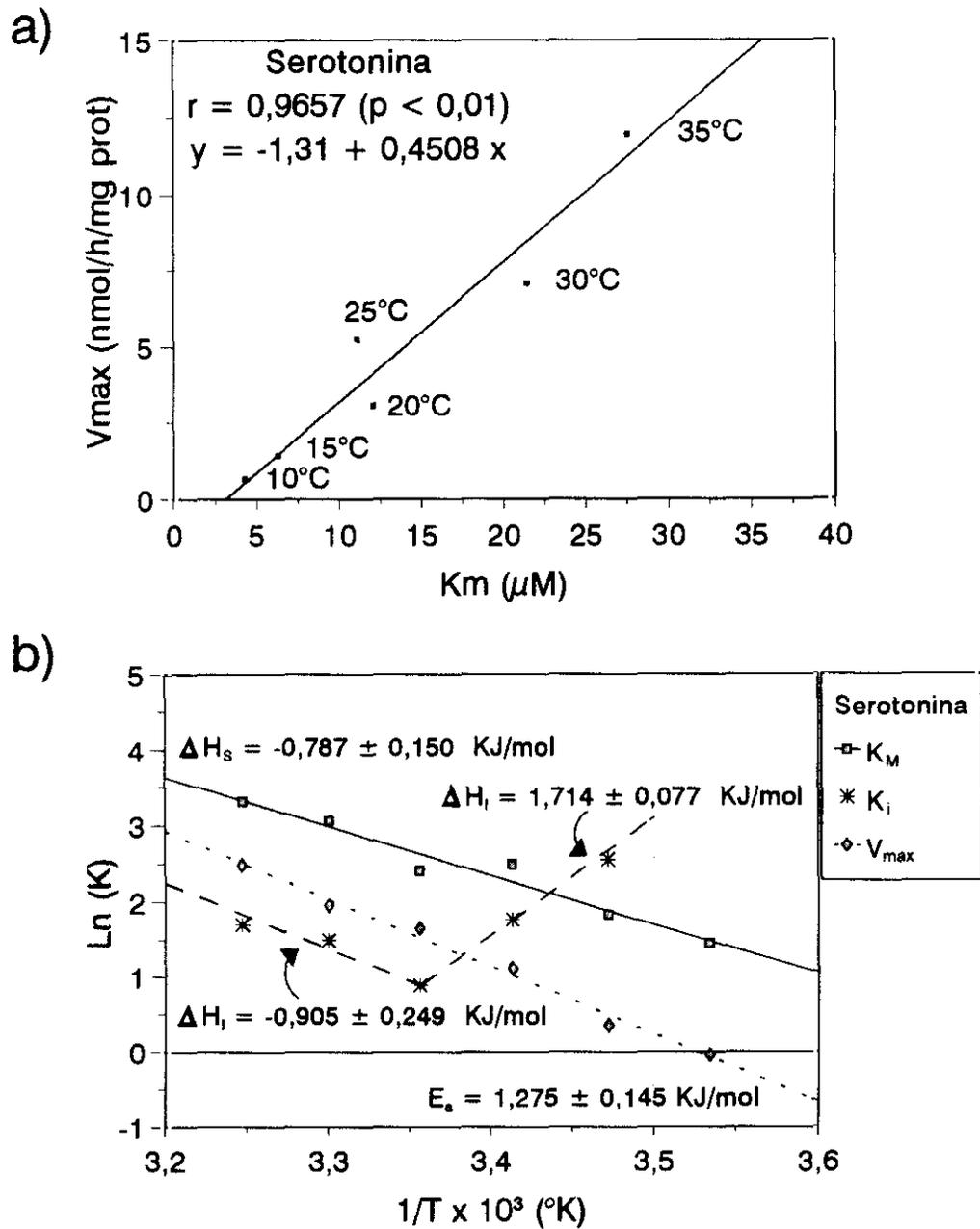


Figura 31. a) Correlación entre los valores de K_m y V_{max} determinados para la NAT en la retina de *R. perezii* siguiendo el método de Duggleby (1981) a distintas temperaturas, utilizando serotonina como sustrato. b) Representación de Arrhenius para las constantes V_{max} , K_M y K_i , procedentes de la cinética de la NAT de retina de *R. perezii* utilizando serotonina como sustrato.

Tabla X. Parámetros derivados de la cinética de la NAT de la retina de *Rana perezii*.

Substrato	Temperatura (°C)	Inhibición relativa (r)	S _{opt} (μM)	V _{alta} (nmol/h/mg prot.)
Serotonina	10	>10 ⁵	>1450	0,65
"	15	2040,9	282,9	1,35
"	20	485,6	265,8	2,78
"	25	218,7	164,0	4,61
"	30	207,9	308,8	6,21
"	35	199,8	389,1	10,47
Triptamina	10	354,7	242,1	2,27
"	25	170,0	598,2	9,29
"	30	96,3	854,6	11,01

$$r = K_i/K_M$$

$$S_{opt} = \sqrt{(K_M \times K_i)}$$

$$V_{alta} = V_{max} \times \sqrt{r} / (2 + \sqrt{r})$$

- a) Inhibición relativa ($r=K_i/K_M$). Este parámetro indica la potencia de la inhibición respecto a la constante de afinidad (K_M). Cuanto menor sea su valor, mayor será la inhibición.
- b) Concentración de sustrato óptima ($S_{opt}=\sqrt{K_M \times K_i}$). Indica la concentración de sustrato en la cual se obtiene la mayor actividad enzimática.
- c) Velocidad alta, [$V_{alta}=V_{max} \times \sqrt{r}/(2+\sqrt{r})$]. Es la velocidad de reacción a la concentración óptima de sustrato (S_{opt}).

Los valores de r para la serotonina muestran un pronunciado descenso desde 10 a 25°C, este aumento en la inhibición se detiene a temperaturas superiores a 25°C. Para la triptamina, aunque la inhibición relativa aumenta ligeramente, este efecto se debe en su mayor parte al marcado incremento de los valores de K_M , y no a un descenso importante de la K_i . El valor más bajo de la S_{opt} para la serotonina se observa a 25°C, en cambio para la triptamina la S_{opt} aumenta con la temperatura. Para ambas indolaminas V_{alta} mantiene un estrecho paralelismo con la V_{max} , como cabría esperar debido a la relación existente entre estos dos parámetros.

En la Tabla XI, se presenta la evolución del coeficiente de temperatura (Q_{10}) para las tres constantes cinéticas (V_{max} , K_M y K_i). Q_{10} para la V_{max} muestra valores altos indicando la gran dependencia de esta constante cinética con la temperatura, especialmente para la serotonina ($Q_{10} > 3$). En cuanto a los valores de Q_{10} correspondientes a la K_M aparece un comportamiento análogo, es decir, un incremento continuado de K_M con la temperatura, pero en este caso Q_{10} es mayor para la triptamina que para la serotonina.

Puede observarse que la compleja respuesta de los valores de la K_i con respecto a la temperatura para el caso de la serotonina, provoca que los valores de Q_{10} por debajo de 25°C muestren valores muy inferiores a 1, lo cual significa un pronunciado descenso del parámetro con la temperatura. En cambio para temperaturas superiores a 25°C los valores de Q_{10} son mayores que 1. Este resultado demuestra que la inhibición no tiene una dependencia simple con respecto a la temperatura, como sucede para los casos de V_{max} y K_M .

Los valores de Q_{10} correspondientes a la actividad NAT valorada en el estudio cinético utilizando una concentración de serotonina equivalente a la S_{opt} muestran una alta sensibilidad térmica de la enzima a dicha concentración de sustrato, esta sensibilidad térmica se reduce progresivamente con el incremento de temperatura (desde 4,5 a 10°C hasta 1,72 a 35°C)

Tabla XI. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) en el intervalo de temperaturas (10-35°C), para las constantes cinéticas de la NAT de la retina de *R. perezii* respecto a las dos indolaminas: triptamina y serotonina, y para la actividad de la misma enzima valorada a la concentración óptima de serotonina para la NAT.

Intervalo T*	Q_{10} (V_{max})		Q_{10} (K_M)		Q_{10} (K_i)		Q_{10} (NAT _{opt})
	Serotonina	Triptamina	Serotonina	Triptamina	Serotonina	Triptamina	Serotonina (200 μ M)
10-15	4,75		2,16		--		4,51
15-20	4,61	2,63	3,71	2,34	0,21	1,43	4,50
20-25	2,98		0,85		0,17		2,92
25-30	1,82	1,53	3,73	3,60	3,37	1,17	2,33
30-35	2,86	--	1,65	--	1,53	--	1,73
$\bar{x} \pm e.$	3,40 \pm 0,56	2,08 \pm 0,55	2,42 \pm 0,57	2,97 \pm 0,64	--	1,3 \pm 0,13	3,20 \pm 0,56

6. EFECTO DE LA ACLIMATACIÓN TÉRMICA SOBRE LA NAT.

a) Efecto sobre la cantidad de enzima.

Se analizaron las modificaciones provocadas por la aclimatación térmica a dos temperaturas (4 y 24°C) sobre la actividad NAT de la retina, para lo cual después del período de aclimatación de un mes los animales fueron sacrificados a mediodía y a medianoche, valorándose la NAT a tres temperaturas distintas 10, 20, 30°C.

La aclimatación en frío produce un incremento de aproximadamente 1,5 veces en la actividad NAT con respecto a la aclimatación en calor (Fig. 32). Dicho incremento se mantiene para todas las temperaturas del ensayo. Puede observarse también que la oscilación día-noche, típica de la actividad NAT, se conserva para las dos temperaturas de aclimatación, presentando valores superiores durante la noche en relación a sus correspondientes valores diurnos.

Los coeficiente de temperatura (Q_{10}) para la actividad NAT se muestran en la Tabla XII. No hay diferencias significativas en los valores de Q_{10} como consecuencia de la aclimatación, indicando que no ha habido ningún cambio en la sensibilidad térmica de la enzima.

b) Efecto sobre la cinética enzimática.

Como segunda parte del estudio de la aclimatación térmica sobre la NAT, se probó el efecto de dicho tratamiento experimental sobre las constantes cinéticas. Tras la aclimatación de animales adultos de *R. perezi* durante un mes a 10 °C y a 26°C se sacrificaron a medianoche, encontrándose los siguientes resultados de la caracterización cinética respecto a la AcCoA (conc. final triptamina 10 mM):

<u>Aclimatación</u>	<u>$K_M(\mu M)$</u>	<u>$V_{max}(\text{nmol/h/ojo})$</u>
10°C	42,53 \pm 10,24	6,77 \pm 0,26
26°C	49,26 \pm 2,55	4,78 \pm 0,083

Mientras que se observa un efecto claro de la temperatura alta reduciendo la V_{max} , no existen diferencias entre los valores de la K_M como consecuencia de la aclimatación.

7. SÍNTESIS DE MELATONINA EN COPAS ÓPTICAS *IN VITRO*.

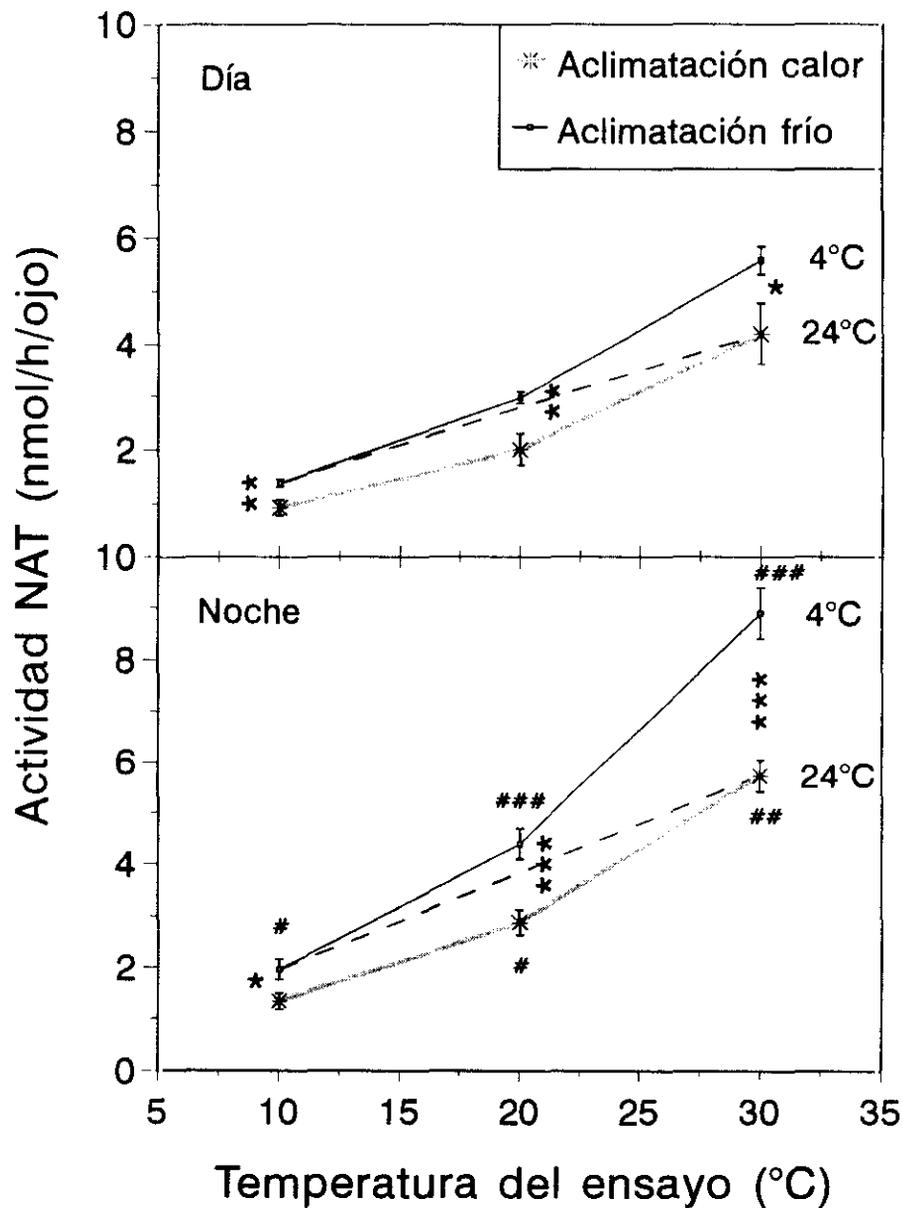


Figura 32. Efecto de la aclimatación térmica sobre la actividad NAT en la retina de *R. perezii*. Las temperaturas de aclimatación fueron 4°C y 24°C. La línea discontinua representa la respuesta crónica de la NAT a la aclimatación térmica. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,01$ entre los grupos de aclimatación. (#) indica la significación

Tabla XII. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) para los valores de actividad NAT de retina de *R. perezii* determinada a varias temperaturas, en animales aclimatados a calor ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) y frío ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante un mes.

<u>Intervalo T^a</u>	<u>Aclim. 24°C</u>		<u>Aclim. 4°C</u>	
	<u>Día</u>	<u>Noche</u>	<u>Día</u>	<u>Noche</u>
10-20	2,17 ± 0,07	2,18 ± 0,12	2,16 ± 0,09	2,28 ± 0,14
20-30	2,12 ± 0,08	2,01 ± 0,08	1,96 ± 0,06	2,03 ± 0,06

Los datos se expresan como la $\bar{x} \pm e$.

7.1. Condiciones óptimas de cultivo de copas ópticas.

a) Cantidad óptima de tejido ocular.

En primer lugar, se estudió la capacidad de síntesis de MEL por parte de cantidades variables de tejido ocular. En la Fig. 33a) se muestra la actividad NAT tras el cultivo en función de las fracciones de retinas utilizadas. Puede observarse una relación lineal entre la cantidad de tejido y la actividad enzimática, concluyéndose que el cultivo de la copa óptica completa no presenta efectos deletéreos sobre la actividad NAT.

Los niveles de MEL sintetizada en este experimento se muestran en la Fig. 33b). Las copas ópticas completas producen cantidades de MEL significativa y progresivamente superiores a lo largo del tiempo de cultivo. Durante el cultivo en oscuridad dicha síntesis resulta altamente estimulada observándose incrementos significativos consecutivos ($p < 0,01$). Cuando se cultivó 1/2 copa óptica sólo se apreció un incremento en la síntesis de MEL sobre los niveles basales en el último período de cultivo, tras 6 horas de cultivo en oscuridad. Cuando se cultiva 1/4 de copa óptica la MEL sintetizada presenta niveles basales durante todo el período de cultivo, siendo la oscuridad incapaz de estimular la síntesis.

b) Cultivo de la retina neural aislada.

En el cultivo de la retina neural aislada del epitelio pigmentado, la retina neural no mostró ninguna estimulación por la oscuridad, mostrando niveles basales de MEL durante todo el experimento (Fig. 34). Sin embargo, la copa óptica completa mantiene intacta su capacidad biosintética, observándose incrementos significativos en la producción de MEL durante el cultivo en oscuridad ($p < 0,01$ entre intervalos de tiempo consecutivos).

La actividad NAT de la retina neural medida tras las 12 horas de cultivo no mostró diferencias entre los dos grupos (copa óptica completa y retina neural aislada), indicando que el aislamiento de la retina del epitelio pigmentado no afecta a la enzima NAT, pero sí a la síntesis de MEL.

Se concluye pues que para mantener intacta la capacidad biosintética de MEL es necesario cultivar las copas ópticas completas.

c) Ciclo diario de síntesis de melatonina *in vitro*.

En la Fig. 35) se muestran los resultados obtenidos tras el cultivo de copas ópticas de *R. perezi* durante un ciclo diario completo, respetando el fotoperíodo al que estaban aclimatados previamente los animales. Durante la fase luminosa del ciclo los niveles de MEL

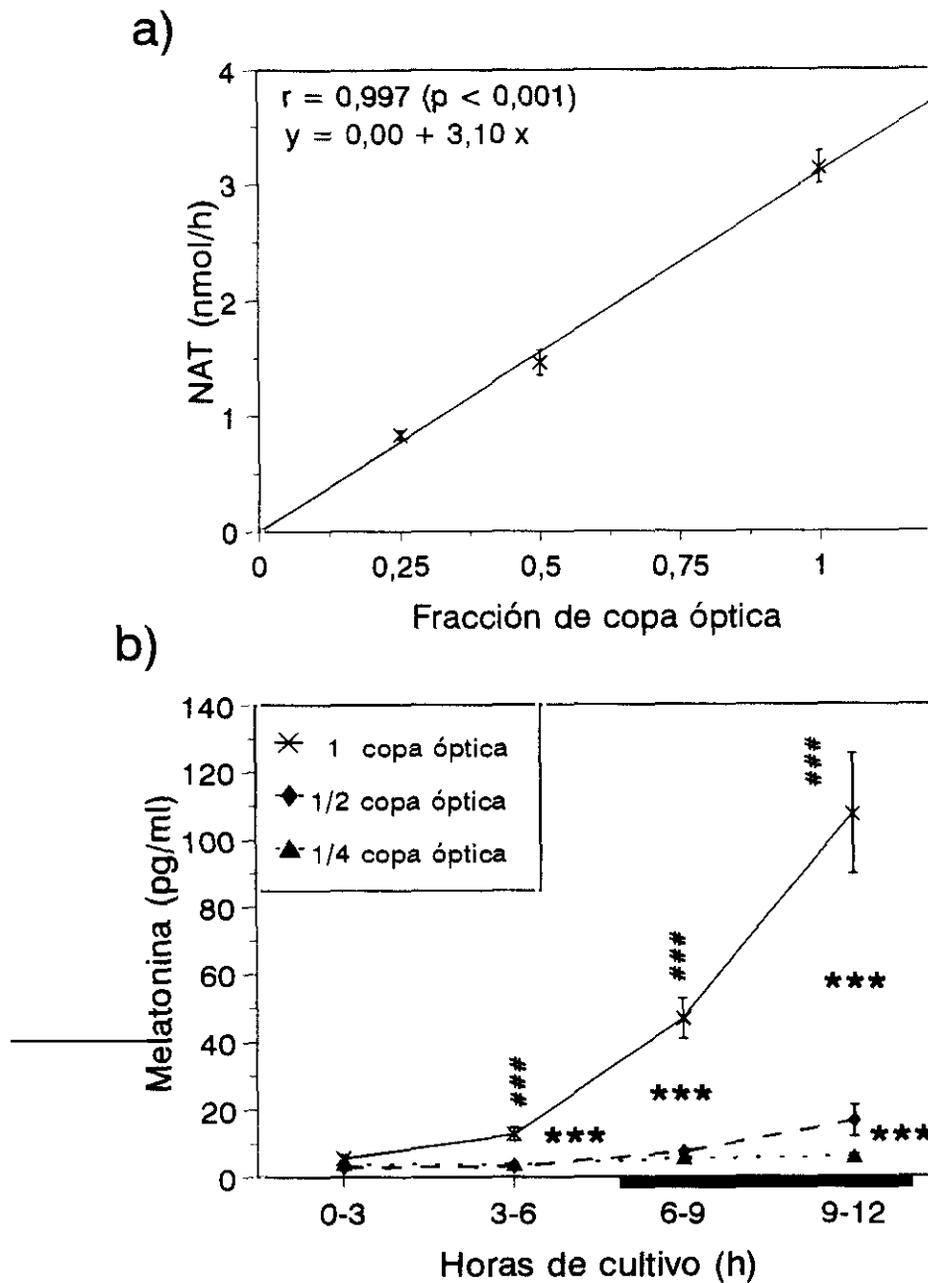


Figura 33. Capacidad biosintética de melatonina en función de la fracción de copa óptica de *R. perezi* en cultivo. a) Correlación entre la actividad NAT de la retina y la fracción de copa óptica cultivada. b) Melatonina liberada al medio durante el cultivo. La barra oscura indica el período de oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. ($n=4$) *** $p < 0,01$ entre fracciones de copa óptica. ### $p < 0,01$ entre períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo experimental.

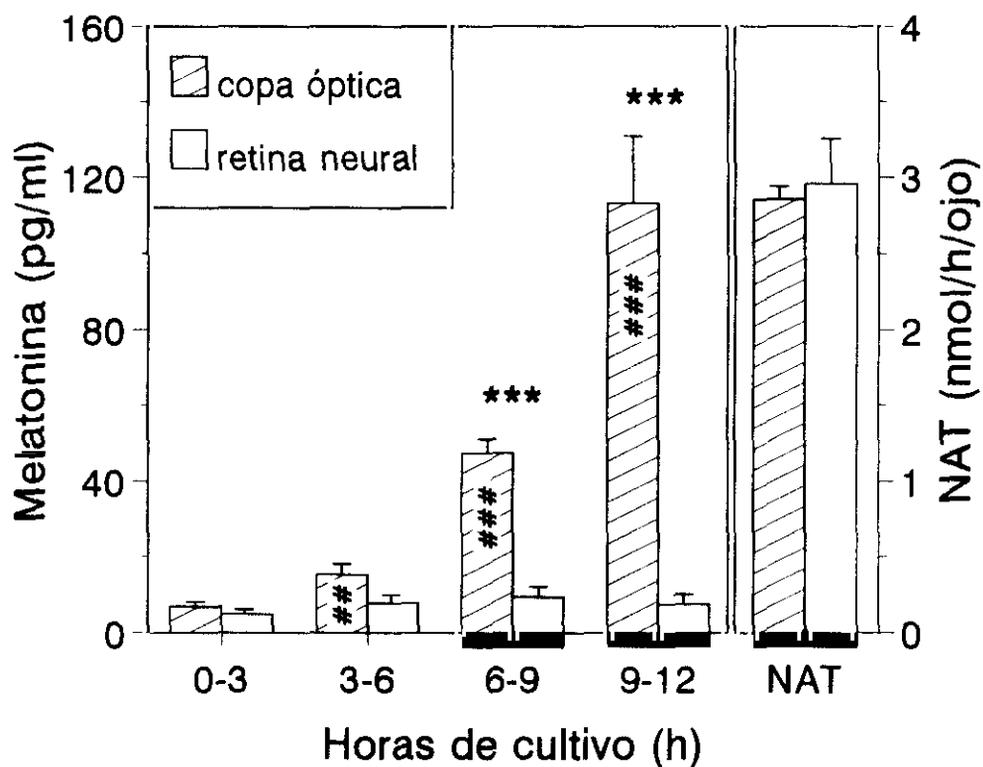


Figura 34. Producción de melatonina y actividad NAT de la retina neural aislada de *R. perezii* cultivada durante 12 horas. La barra oscura indica el período de cultivo en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=4). *** p<0,01 respecto a la retina neural aislada. (#) Dentro de las columnas indican significación estadística entre períodos de cultivo consecutivos.

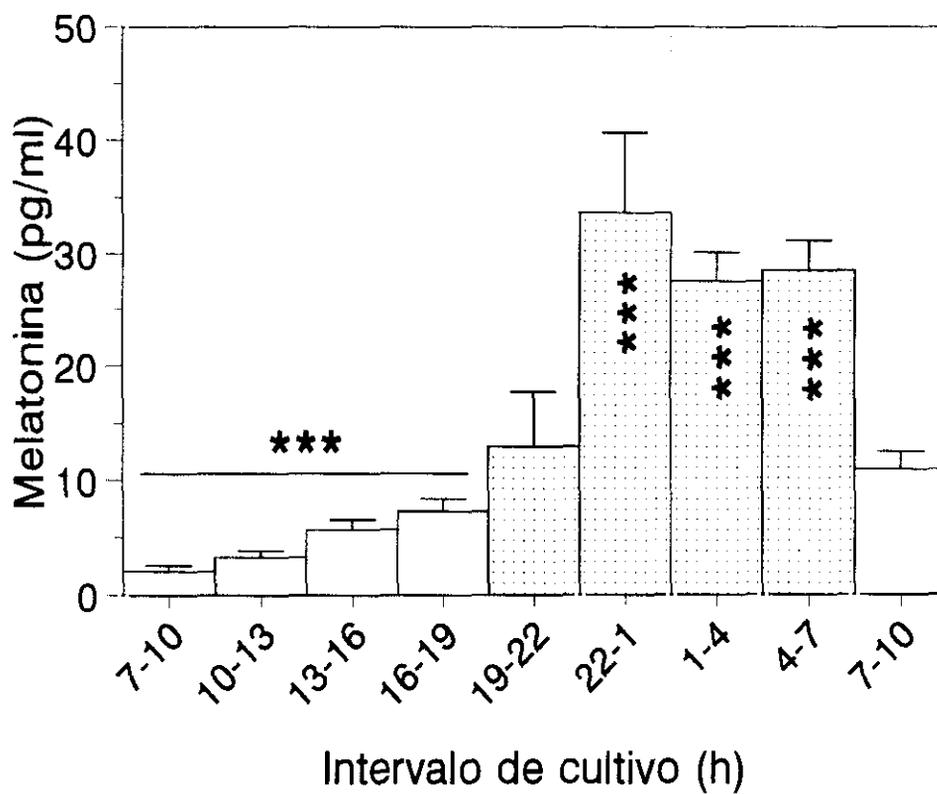


Figura 35. Ritmo diario de la síntesis de melatonina de retinas de *R. perezii* *in vitro*. Las barras sombreadas indican el período de oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=8). *** $p < 0,01$ respecto al último punto del período de luz del fotociclo.

son muy bajos (< 7 pg/ml), aunque muestran un incremento sostenido a lo largo de la misma (ANOVA $p < 0,01$, entre todos los puntos de la fase luminosa). En el período de oscuridad, se observan valores significativamente superiores de este metoxindol en el medio de cultivo (≈ 30 pg/ml, $p < 0,01$), unas 5 veces respecto a los valores diurnos excepto en las primeras tres horas de la fase oscuridad, donde el incremento observado no llega a ser significativo. Luego, las copas ópticas de *R. perezii* conservan su capacidad rítmica de sintetizar MEL, como sucede *in vivo*.

Como puede apreciarse en la Fig. 35, existen diferencias significativas entre el primer y el último punto del experimento (intervalo 7-10 horas) aunque corresponden al mismo punto temporal dentro del fotociclo, presentando el segundo intervalo valores mayores.

d) Efecto de la luz sobre la síntesis de melatonina en cultivo.

La luz mostró un efecto depresor de la actividad NAT ($p < 0,025$; Fig. 36a). Dicho efecto es contrarrestado completamente por el forskolín ($p < 0,01$), no existiendo diferencias entre los grupos cultivados con forskolín en luz o en oscuridad (Fig. 36a). Los efectos estimuladores del forskolín y de la oscuridad sobre la actividad NAT son aditivos, ya que el análisis de varianza de dos vías (los factores son condición de iluminación y presencia de forskolín), no mostró una interacción significativa entre ambos factores.

En cuanto a los niveles de MEL medidos en el medio de cultivo se obtiene un resultado paralelo (Fig. 36b), tanto en las primeras 3 horas como en el segundo período de cultivo, la luz reduce significativamente la MEL producida por las copas ópticas ($p < 0,05$ y $p < 0,025$, respectivamente). La adición del forskolín al medio estimula significativamente ($p < 0,01$) la síntesis de MEL tanto en condiciones de luz como de oscuridad. No se observa sinergia entre la oscuridad y el forskolín. Aunque el forskolín es un agente mucho más potente, incrementando los niveles de MEL en seis veces aproximadamente, mientras que la oscuridad sólo los duplica, el efecto de los factores conjuntamente sólo provoca un ligero incremento no significativo sobre los valores de MEL del grupo de forskolín cultivado en luz.

e) Dependencia de la síntesis nocturna de melatonina de la síntesis de proteínas *de novo*.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la adición de actinomicina D ($8 \mu\text{M}$) en oscuridad reduce la actividad NAT ($p < 0,05$; Fig. 37a) a niveles próximos a los obtenidos en el cultivo en luz. El fármaco no desarrolla ningún efecto significativo sobre la actividad enzimática de las copas ópticas cultivadas en luz.

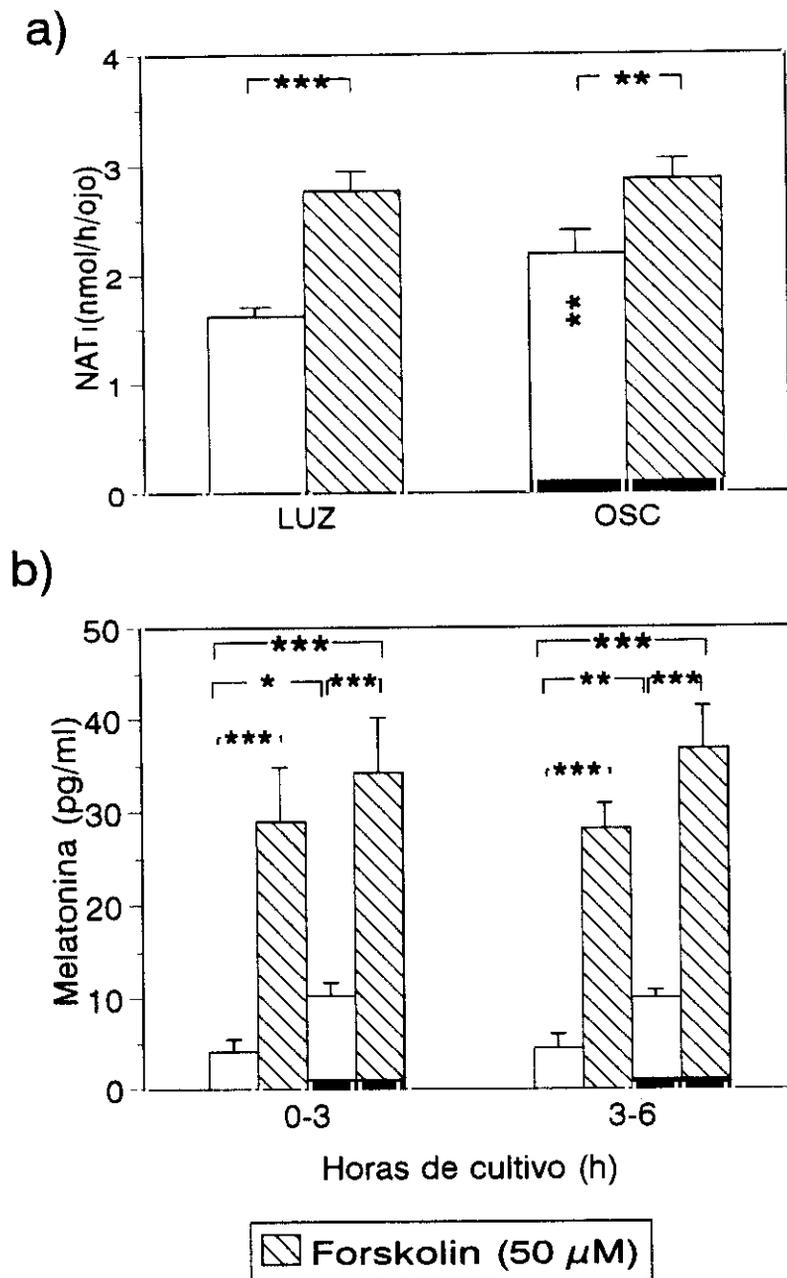


Figura 36. Efecto de la luz y del forskolin (50 μ M) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* en cultivo. **a)** Actividad NAT de la retina, **b)** Melatonina liberada al medio de cultivo. La barra oscura señala los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). * p<0,05; ** p<0,025; *** p<0,01. (*) dentro de las columnas indican la significación estadística respecto al grupo correspondiente cultivado en luz.

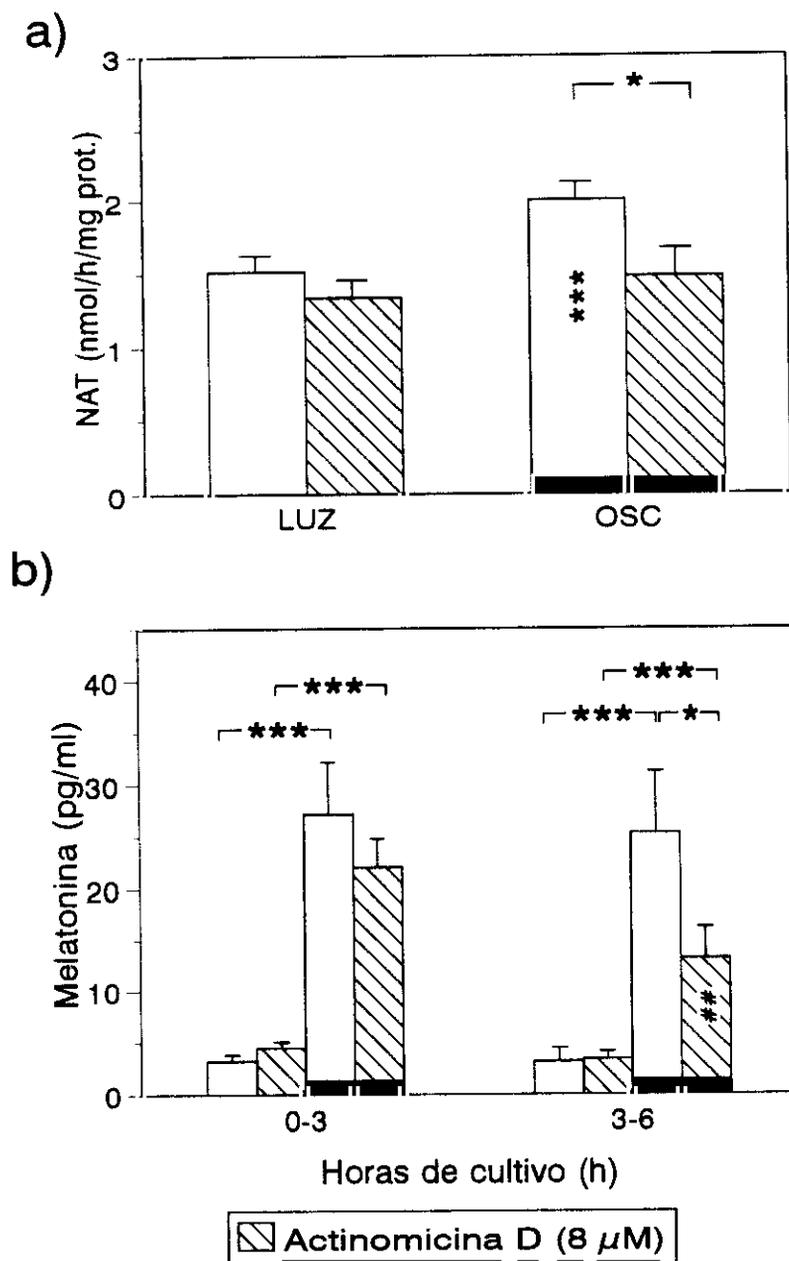


Figura 37. Efecto de la Actinomicina D (8 μ M) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezi* en cultivo. **a)** Actividad NAT de la retina, **b)** melatonina liberada al medio de cultivo. La barra oscura señala los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). * p<0,05; *** p<0,01. (*) dentro de las columnas de a) indican significación estadística respecto al grupo correspondiente cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

Durante las primeras tres horas de cultivo no se encontraron diferencias significativas en los niveles de MEL procedentes de las copas cultivadas con o sin actinomicina D (Fig. 37b). En cambio, a las 6 horas de cultivo se redujo significativamente la producción de MEL en oscuridad en presencia de actinomicina D ($p < 0,05$).

El análisis de varianza de doble vía demuestra que, para la actividad NAT, los efectos de la oscuridad y los de la actinomicina D son aditivos (la interacción de los dos factores no es significativa). En cambio, para la MEL existe una interferencia significativa, como pone de manifiesto el hecho de que la acción de la actinomicina D depende de la condición lumínica del cultivo. La actinomicina D no tiene efecto en el cultivo en luz, mientras que en oscuridad tiene un carácter inhibitor a períodos de tiempo largos (al menos 6 horas).

En el segundo experimento, se probó el efecto de la cicloheximida como fármaco inhibe la traducción proteica. La cicloheximida inhibe la actividad NAT (Fig. 38a) de forma significativa, tanto en luz ($p < 0,025$) como en oscuridad ($p < 0,01$). El análisis de varianza de dos vías, muestra el carácter aditivo de la luz y de la cicloheximida reduciendo ambos la actividad enzimática. La síntesis de MEL también se encuentra afectada por la cicloheximida (Fig. 38b). Durante las tres primeras horas de cultivo la MEL producida en oscuridad se reduce a la mitad ($p < 0,025$). Después de 6 horas la inhibición es mayor, reduciéndose los niveles hasta alcanzar casi los valores de las copas cultivadas en luz ($p < 0,01$). El análisis de varianza de dos vías muestra una interferencia significativa entre la oscuridad y la cicloheximida a las 6 horas de cultivo, esta interacción se debe a que la cicloheximida en luz no es capaz de reducir la síntesis de MEL más allá de los niveles basales.

7.2. Control catecolaminérgico de la síntesis de melatonina ocular.

En primer lugar, comprobamos si los fármacos utilizados para este estudio no interferían en el desarrollo del RIA de MEL, debido a que varios de ellos tienen estructuras químicas muy similares a los indoles. Para ello, medimos la reactividad cruzada de los mismos frente al anticuerpo antimelatonina utilizado en el RIA, comparando la unión específica entre medios de cultivo frescos, con otros a los que se les añadió los agonistas y antagonistas específicos a la concentración utilizada en los experimentos ($10 \mu\text{M}$). Como puede observarse (Tabla XIII), la unión específica de los medios con los fármacos no es estadísticamente distinta respecto al medio de cultivo sin compuesto alguno, encontrándose todos ellos dentro del intervalo de confianza al 95 % del grupo control. Con esta prueba se descarta toda posibilidad de interferencia de los fármacos utilizados en la cuantificación de

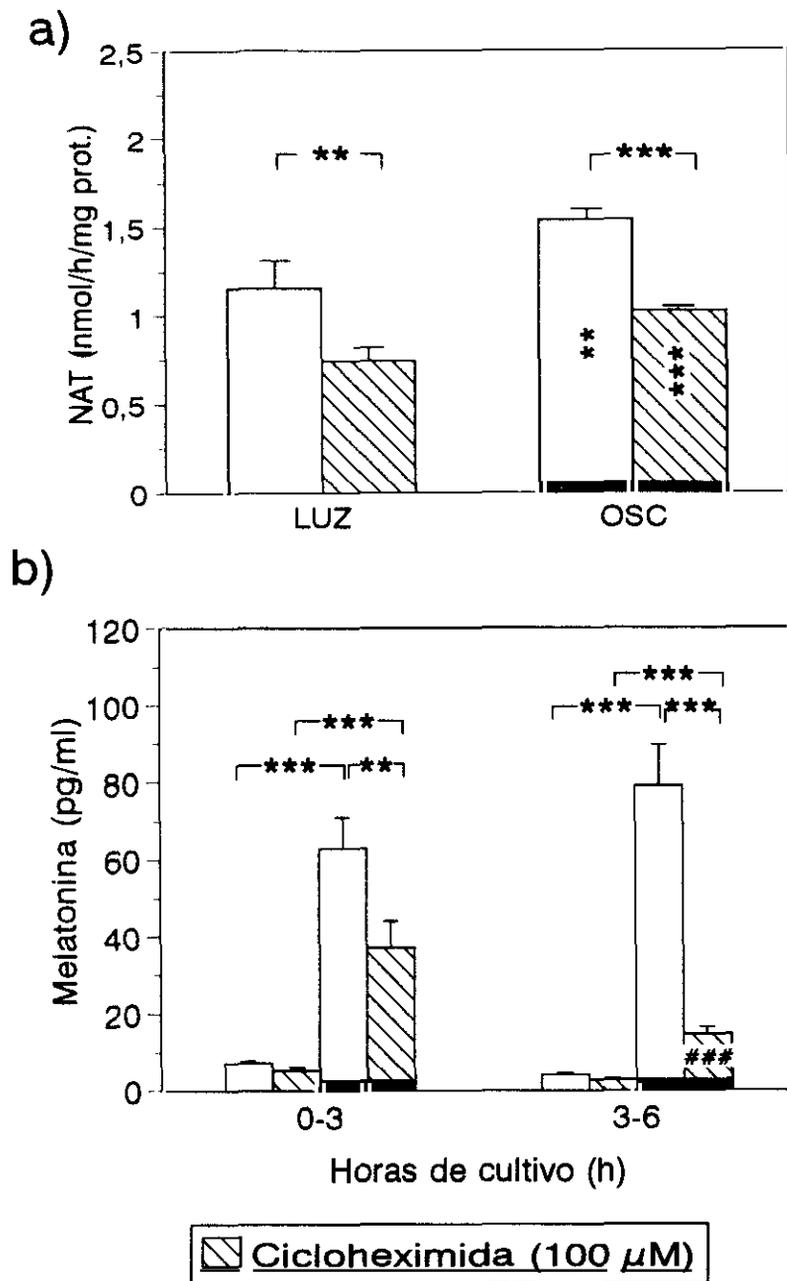


Figura 38. Efecto de la cicloheximida (100 μM) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezi* en cultivo. **a)** Actividad NAT, **b)** Melatonina liberada al medio de cultivo. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). * p<0,05; ** p<0,025; *** p<0,01. (*) dentro de las columnas de a) indican significación estadística respecto al grupo correspondiente cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

Tabla XIII. Unión específica de los medios de cultivo conteniendo los agonistas y antagonistas específicos para receptores de catecolaminas a una concentración de 10 μ M.

<u>RECEPTOR</u>	<u>COMPUESTO</u>	<u>UNIÓN ESPECÍFICA</u> <u>(% respecto al control)</u>
Control		100 \pm 3,18 (93,64-106,36)
D1-dopaminérgico	SKF 38393	98,85 \pm 4,18
	SCH 23390	98,20 \pm 5,39
D2-dopaminérgico	Quinpirol	102,07 \pm 3,35
	Sulpirida	102,47 \pm 3,50
β -Adrenérgico	Isoproterenol	100,80 \pm 3,63
	Propranolol	99,88 \pm 2,65
α 1-Adrenérgico	Fenilefrina	103,28 \pm 0,80
	Prazosín	95,68 \pm 3,50
α 2-Adrenérgico	Clonidina	97,87 \pm 4,14
	Yohimbina	102,31 \pm 4,95

Los datos se representan como el % de la unión específica \pm la desviación estándar, tomando el control como el 100 %. Entre paréntesis se indica el intervalo de confianza al 95 % del control.

MEL mediante RIA.

a) Control dopaminérgico.

En primer lugar, se probó el papel de la dopamina como modulador de la síntesis de MEL de la retina, para lo cual se añadieron agonistas y antagonistas específicos para los dos subtipos principales de receptores dopaminérgicos.

- D1-dopaminérgico. (Fig. 39).

La actividad NAT (Fig. 39a) no se ve modificada por la adición del agonista D1 (SKF 38393) ni del antagonista (SCH 23390) en ninguna de las dos condiciones de cultivo, luz u oscuridad. La oscuridad siempre incrementa de forma significativa ($p < 0,01$) la actividad NAT en todos los grupos experimentales. La MEL producida durante las tres primeras horas del cultivo (Fig. 39b) mostró una respuesta paralela a la descrita para la actividad NAT, ni el agonista ni el antagonista son capaces de modificar la estimulación inducida por la oscuridad ($p < 0,01$ para todos los grupos). En cambio, en el segundo período de cultivo (Fig. 39c) se obtuvo una respuesta específica en los ojos cultivados en oscuridad en presencia del agonista SKF 38393, resultando reducida la síntesis de MEL con respecto al grupo control ($p < 0,025$). El antagonista SCH 23390, en la dosis utilizada, no muestra ningún efecto por sí sólo, ni es capaz de revertir el efecto del SKF 38393.

- D2-Dopaminérgico (Fig. 40).

La actividad NAT (Fig. 40a) muestra una respuesta compleja tras la administración de los fármacos específicos para los receptores D2-dopaminérgicos. En condiciones de luz, el agonista D2 quinpirol reduce significativamente la actividad NAT si se administra junto con sulpirida ($p < 0,01$), la NAT también se reduce en el grupo con quinpirol exclusivamente, aunque no llega a ser significativo. El efecto estimulador de la oscuridad ($p < 0,01$ con respecto al control en luz), se ve suprimido por la acción del quinpirol ($p < 0,01$) observándose niveles de actividad enzimática similares a los que presentan las copas ópticas cultivadas en luz. En cuanto al efecto del antagonista sulpirida, a la concentración utilizada no es capaz de revertir el efecto del quinpirol, cuando se administran de forma conjunta.

La MEL muestra un comportamiento análogo al descrito para la NAT en respuesta a la adición de agentes D2-dopaminérgicos, aunque con pequeñas diferencias. El análisis de varianza de vía múltiple muestra interferencias significativas ($p < 0,025$) entre la luz y la presencia de agonista o del antagonista, indicando que los factores no tienen efectos

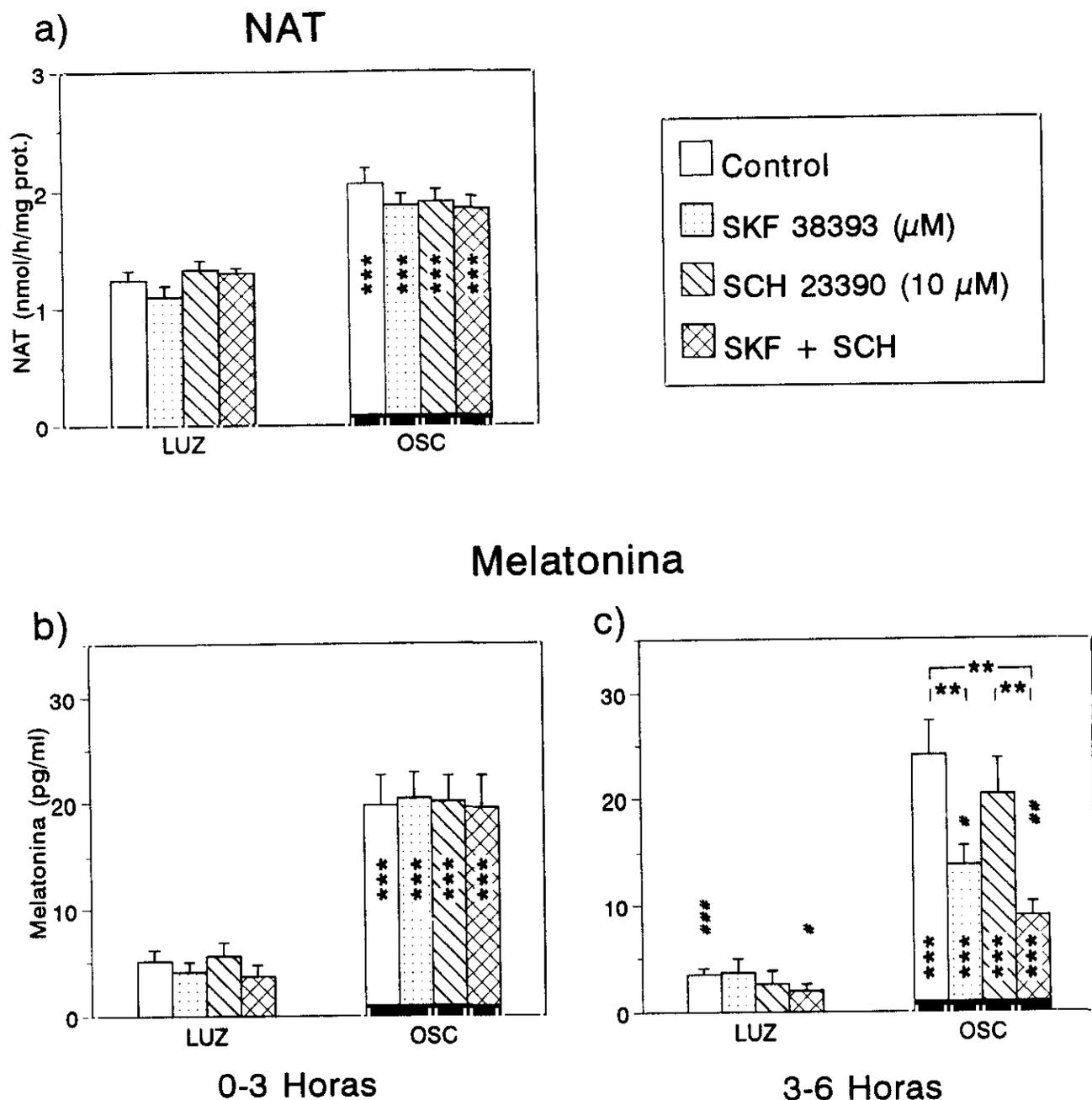


Figura 39. Efecto del agonista (SKF 38393) y del antagonista (SCH 23390) D1-dopaminérgicos sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* en cultivo. **a)** Actividad NAT. Melatonina liberada al medio: **b)** a las tres horas y **c)** a las seis horas del cultivo. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,01$. (*) dentro de las columnas indican significación estadística respecto al grupo correspondiente cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

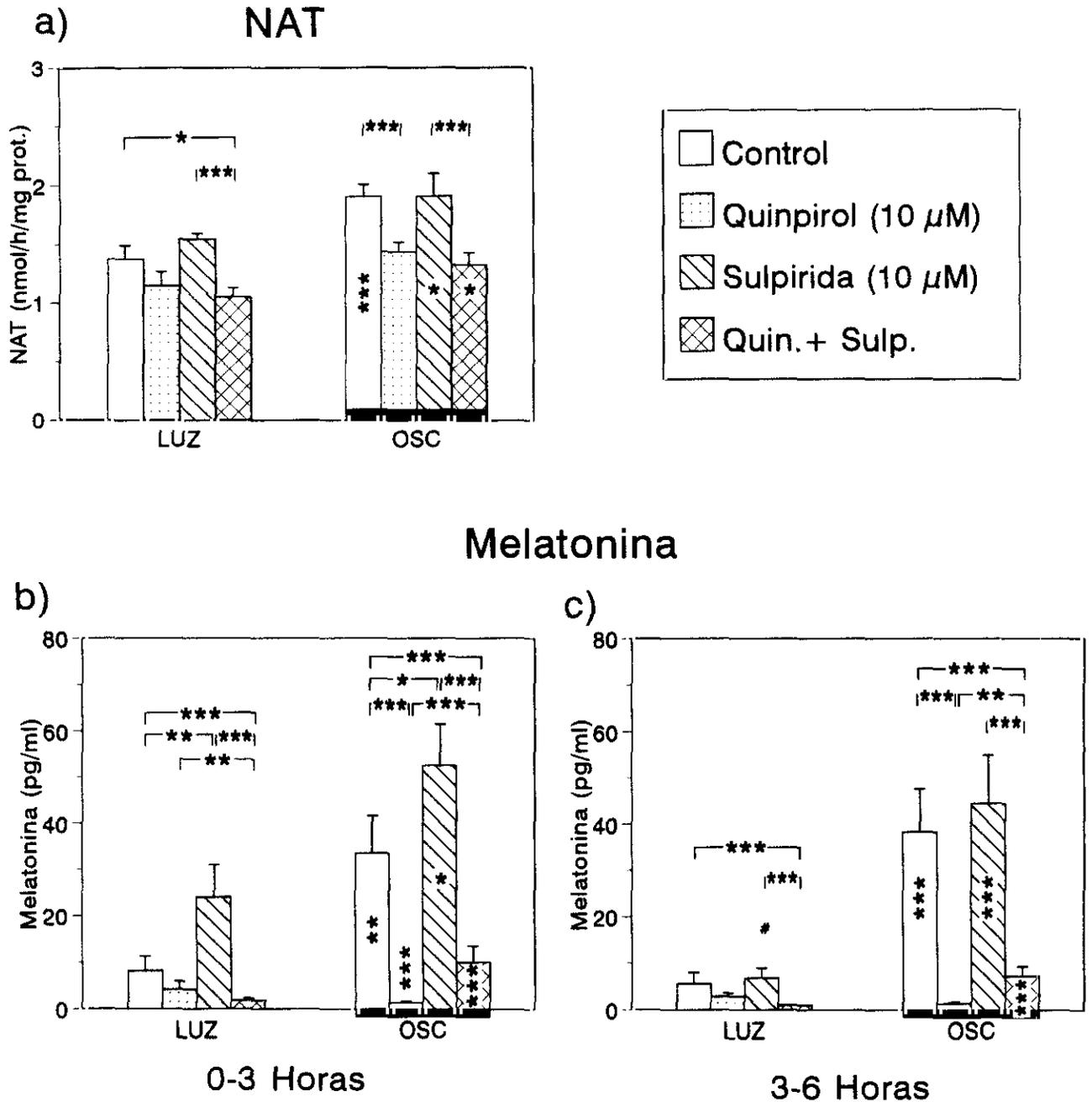


Figura 40. Efecto del agonista (quinpirol) y del antagonista (sulpirida) D2-dopaminérgicos sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* en cultivo. **a)** Actividad NAT. Melatonina liberada al medio: **b)** a las tres horas **c)** a las seis horas de cultivo. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5) * p<0,05; ** p<0,025; *** p<0,01. (*) dentro de las columnas indican significación estadística respecto al grupo correspondiente cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

multiplicativos sobre la síntesis de MEL, y por lo tanto el análisis posterior se debe realizar atendiendo por separado cada factor. Durante las tres primeras horas de cultivo (Fig. 40b), en condiciones de luz, la adición de sulpirida incrementa de forma significativa ($p < 0,025$) la producción de MEL, dicho efecto estimulador es anulado completamente cuando el quinpirol se administra conjuntamente con sulpirida ($p < 0,01$). En oscuridad, el quinpirol muestra un fuerte efecto inhibitor de la síntesis de MEL ($p < 0,01$ respecto al control), además se sigue observando el efecto estimulador de la sulpirida ($p < 0,05$ con respecto al grupo control). La especificidad del efecto del quinpirol sobre los receptores D2 queda demostrada por el hecho de que el antagonista sulpirida contrarresta, aunque solo parcialmente, el efecto del agonista ($p < 0,01$).

En el segundo período de cultivo (Fig. 40c) se observan los mismos resultados, aunque con alguna pequeña diferencia. El efecto estimulador de la sulpirida en luz no se presenta en este caso, siendo la concentración de MEL significativamente inferior comparado con este mismo grupo durante el primer período de cultivo ($p < 0,05$). En oscuridad, se observa la misma respuesta que en el primer período de cultivo, salvo que ahora no se aprecia un incremento significativo de MEL en el grupo cultivado con sulpirida respecto al control.

b) Control adrenérgico.

Probamos el posible papel de los tres subtipos principales de receptores adrenérgicos; dos con carácter estimulador (β - y α_1 -) y uno inhibitor (α_2 -adrenérgico).

- β -Adrenérgicos (Fig. 41).

De la actividad NAT (Fig. 41a), cabe destacar el efecto inhibitor del agonista isoproterenol en luz ($p < 0,05$). La adición de isoproterenol anula el incremento inducido por la oscuridad ($p < 0,05$), mientras que el antagonista propranolol administrado conjuntamente con el agonista es incapaz de revertir este efecto a la concentración utilizada ($p < 0,01$ respecto al grupo con propranolol exclusivamente).

En condiciones de luz, no se observa ninguna diferencia en la producción de MEL entre los distintos grupos experimentales. En cambio, en oscuridad la MEL incrementa significativamente en los grupos control y tratado con propranolol respecto a sus correspondientes grupos en luz ($p < 0,01$). Como sucede con la actividad NAT, el isoproterenol reduce significativamente ($p < 0,01$) la MEL producida en oscuridad, y el propranolol no es capaz de revertir el efecto del isoproterenol.

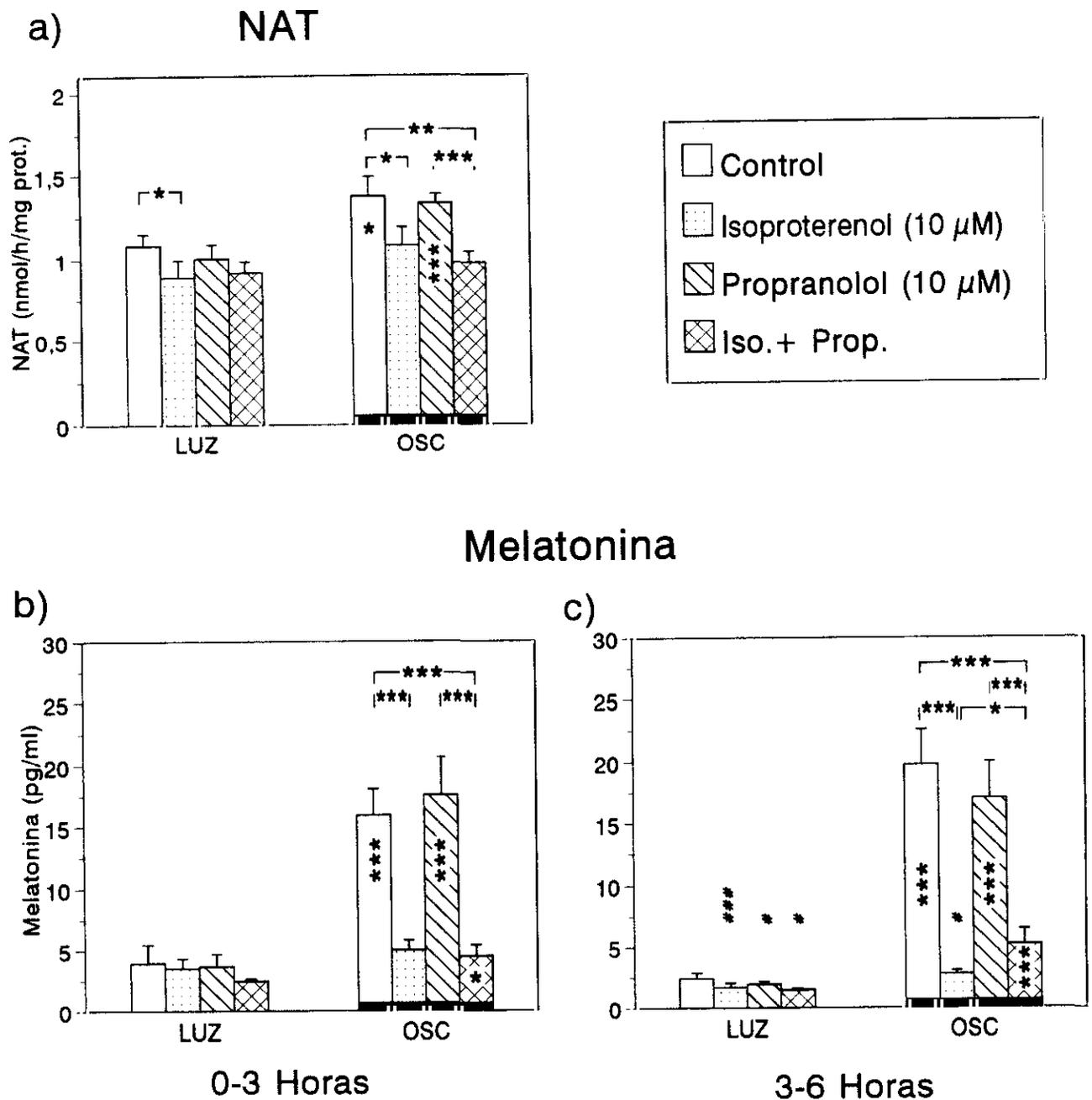


Figura 41. Efecto del agonista (isoproterenol) y del antagonista (propranolol) β -adrenérgicos sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* en cultivo. **a)** Actividad NAT. Melatonina liberada al medio: **b)** a las tres horas, **c)** a las seis horas de cultivo. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5) * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,01$. (*) dentro de las columnas indican significación estadística respecto al correspondiente grupo cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

Los resultados obtenidos durante el segundo período de cultivo (Fig. 41c), son comparables a los obtenidos en el período anterior, no existiendo diferencias entre los distintos grupos. Se encuentra una ausencia de acción de dichos fármacos en condiciones de cultivo en luz. En oscuridad, con respecto al período de cultivo anterior, cabe destacar una ligera reversión del efecto del isoproterenol por el propranolol ($p < 0,05$, comparando el grupo cultivado con isoproterenol respecto al grupo que lleva agonista y antagonista conjuntamente).

- $\alpha 1$ -Adrenérgicos (Fig. 42).

La actividad NAT ocular (Fig. 42a) medida tras el cultivo en luz muestra una inhibición significativa frente al agonista fenilefrina, tanto si se administra de forma aislada ($p < 0,01$), o junto con el antagonista prazosín ($p < 0,025$). El cultivo en oscuridad aumenta la actividad NAT en todos los grupos, aunque sigue observándose el efecto inhibitor de la fenilefrina reduciendo la actividad enzimática ($p < 0,01$), análogamente a lo que sucede en el cultivo en luz el prazosín no es capaz de revertir el efecto del agonista a la concentración utilizada. Por tanto, el prazosín no induce respuesta alguna en la actividad NAT bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

En cambio, en cuanto a la MEL producida, el antagonista tiene un efecto muy claro, incrementando significativamente ($p < 0,01$) la MEL producida en luz durante las tres primeras horas de cultivo (Fig. 42b), la adición del agonista reduce significativamente ($p < 0,05$) este efecto del prazosín. En oscuridad, el efecto estimulador del prazosín se amplifica más aún, siendo significativa la diferencia entre los grupos cultivados en luz y en oscuridad ($p < 0,05$).

Durante el segundo período de incubación (Fig. 42c) cabe destacar las siguientes respuestas: la oscuridad incrementa de forma considerable la MEL sintetizada en los grupos control y suplementado con fenilefrina ($p < 0,01$). El efecto estimulador del prazosín se mantiene tanto en luz ($p < 0,01$) como en oscuridad ($p < 0,025$) respecto a sus correspondientes grupos control. La adición del agonista y el antagonista de forma conjunta anula totalmente el efecto del prazosín, igualando los niveles de MEL a los del grupo control.

El análisis de varianza de múltiple vía muestra que, mientras que para la actividad NAT no hay interacciones significativas entre los distintos factores, para la MEL hay una clara interacción ($p < 0,01$) entre el prazosín y la fenilefrina. Dicha interacción se basa a los

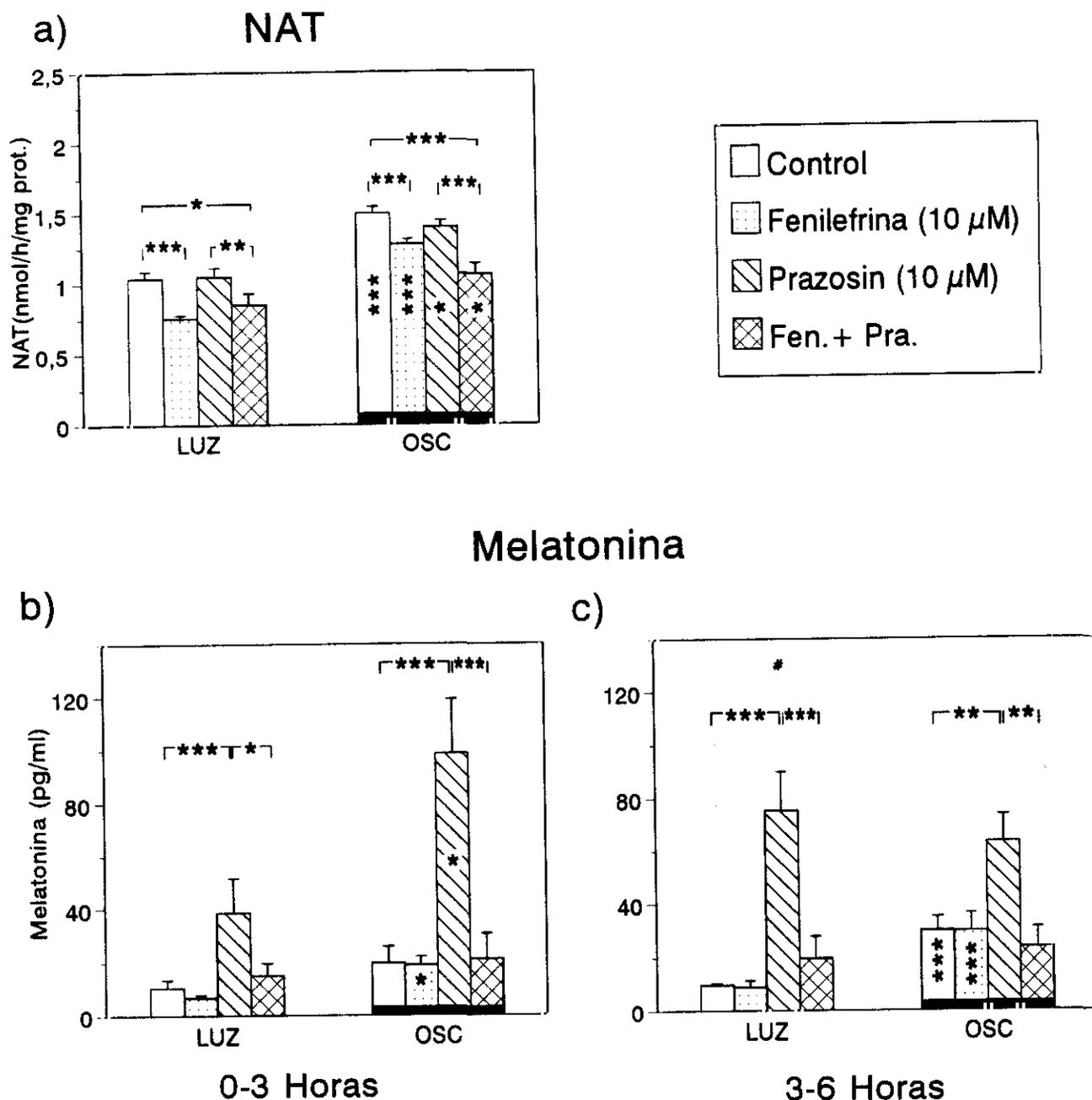


Figura 42. Efecto del agonista (fenilefrina) y del antagonista (prazosín) α_1 -adrenérgicos sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* en cultivo. **a)** Actividad NAT. Melatonina liberada al medio: **b)** a las tres horas, **c)** a las seis horas de cultivo. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5) * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,01$. (*) dentro de las columnas indican significación estadística respecto al correspondiente grupo cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

siguientes resultados, mientras que la fenilefrina por si sola no es capaz de modificar la producción de MEL, cuando se administra conjuntamente con prazosín anula los efectos de este último tanto en luz como en oscuridad, lo que determina la ausencia de aditividad entre los efectos del agonista y el antagonista.

- α 2-Adrenérgicos (Fig. 43).

En cuanto al estudio del posible papel de los receptores α 2-adrenérgicos, sobre la síntesis de MEL, se encontró que la actividad NAT (Fig. 43a) no se vio afectada por el agonista (clonidina) ni por el antagonista (yohimbina). Estos dos compuestos tampoco modificaron la actividad enzimática de las copas ópticas cultivadas en la oscuridad, apreciándose incrementos significativos en todos los grupos respecto a sus correspondientes cultivados en luz ($p < 0,025$).

Los resultados de la síntesis de MEL se muestran en las Fig. 43b y c). De forma análoga a lo comentado para la NAT, los fármacos específicos para los receptores α 2 no tuvieron ningún efecto sobre la síntesis de MEL, aunque se observa un ligero incremento ($p < 0,05$) de la concentración de este metoxindol en el grupo cultivado en oscuridad en presencia de agonista y antagonista conjuntamente. En el segundo período de incubación, no se obtiene ninguna diferencia entre los grupos experimentales, conservándose el efecto estimulador de la oscuridad en todos los grupos ($p < 0,01$). El incremento es de unas 5-6 veces respecto a la MEL producida en luz.

- Modo de acción de los agentes β -adrenérgicos (Fig. 44).

Con el fin de averiguar si el efecto del isoproterenol se debe a la existencia de verdaderos receptores β -adrenérgicos en la retina o a una unión inespecífica a receptores D2-dopaminérgicos, cultivamos copas ópticas de *R. perezii* en presencia de isoproterenol ($10 \mu\text{M}$) y del antagonista D2 sulpirida ($50 \mu\text{M}$) en condiciones de oscuridad, cuando la síntesis de MEL se encuentra activada.

La actividad NAT resulta inhibida por el isoproterenol (Fig. 44a; $p < 0,025$) hasta alcanzar niveles similares a los observados en las copas cultivadas en luz. Este efecto inhibitor del isoproterenol es contrarrestado por la sulpirida ($p < 0,01$), incrementándose la actividad enzimática hasta alcanzar el nivel del grupo control cultivado en oscuridad.

La MEL confirma el papel antagónico de la sulpirida respecto al isoproterenol. Durante las tres primeras horas de cultivo (Fig 43b), la reducción de los niveles de MEL

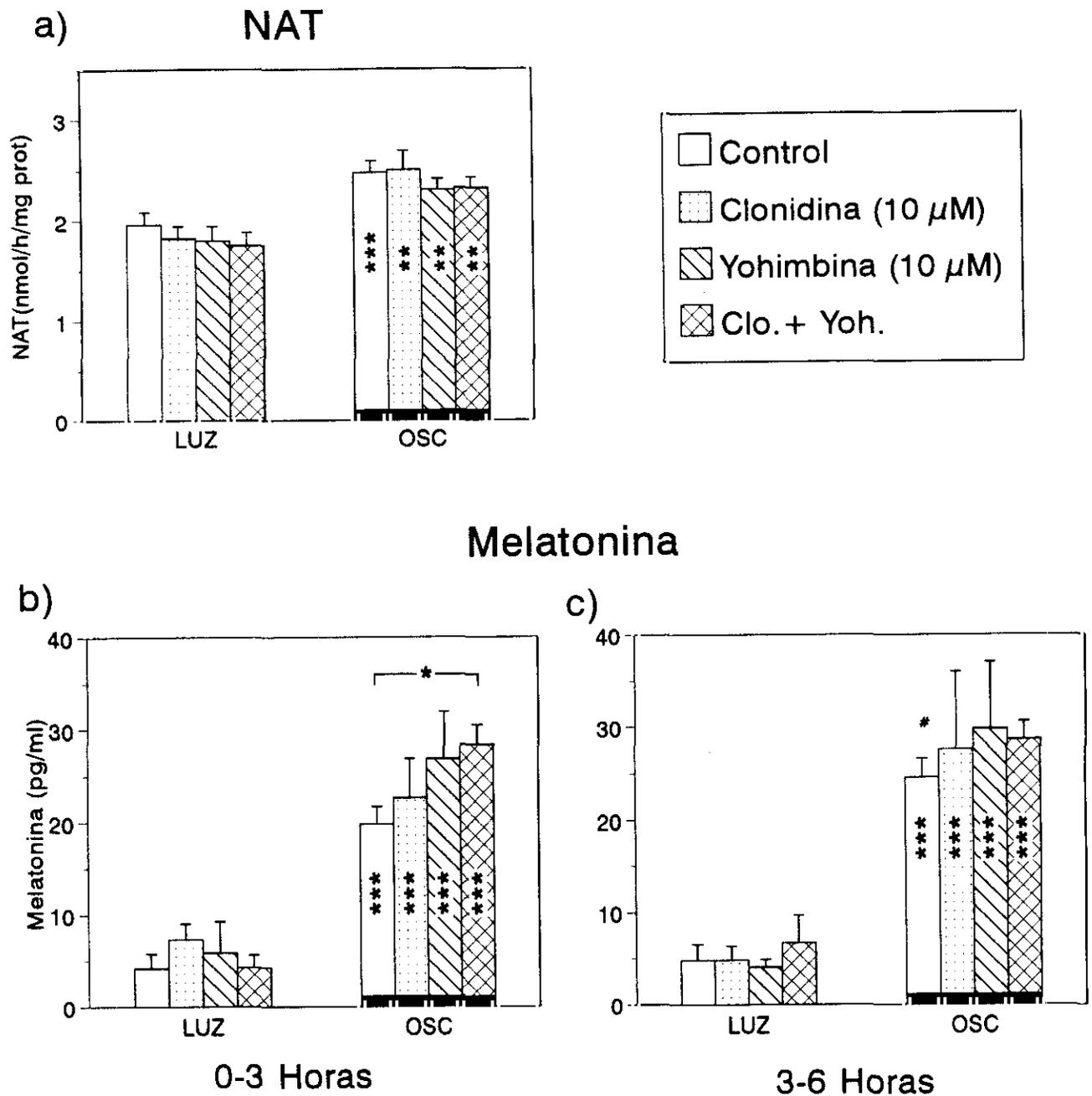


Figura 43. Efecto del agonista (clonidina) y del antagonista (yohimbina) α_2 -adrenérgicos sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* en cultivo. **a)** Actividad NAT. Melatonina liberada al medio: **b)** a las tres horas, **c)** a las seis horas de cultivo. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{X} \pm e$. (n=5) * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,01$. (*) dentro de las columnas indican significación estadística respecto al correspondiente grupo cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

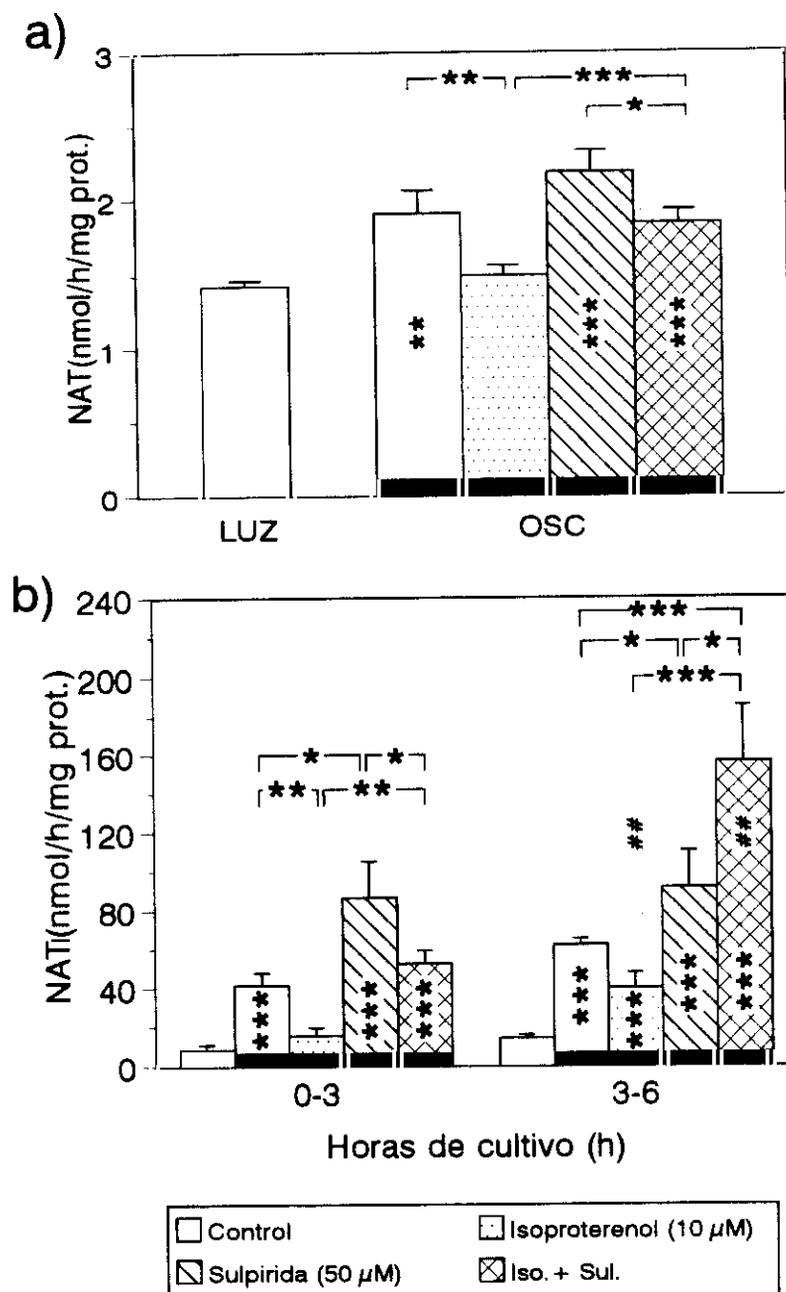


Figura 44. Efecto del isoproterenol y de la sulpirida sobre la capacidad biosintética de melatonina en copas ópticas de *R. perezii* en cultivo. **a)** Actividad NAT, **b)** Melatonina liberada al medio. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). * p<0,05; ** p<0,025; *** p<0,01. (*) dentro de las columnas indican la significación estadística respecto al grupo cultivado en luz. (#) indica significación estadística entre la melatonina medida del mismo grupo en períodos de cultivo consecutivos.

obtenida por la acción del isoproterenol ($p < 0,025$ respecto al control de oscuridad) es contrarrestada por la sulpirida ($p < 0,025$).

A las seis horas de cultivo, el efecto inhibitor del isoproterenol es mucho menor no existiendo diferencias significativas entre este grupo y el control, mientras que el efecto estimulador de la sulpirida administrada conjuntamente con isoproterenol resulta incrementado ($p < 0,01$).

El efecto de la sulpirida a la dosis utilizada ($50 \mu\text{M}$), es capaz por si sola de incrementar la síntesis de MEL, demostrándose que en las condiciones de cultivo utilizadas, existe un cierto tono dopaminérgico en la copas ópticas cultivadas en oscuridad, que resulta anulado por la adición del antagonista D2.

7.3. Sistemas de segundos mensajeros.

Una vez conocidas las catecolaminas implicadas en el control y generación del ritmo de NAT y MEL ocular, a continuación nos propusimos estudiar los sistemas de segundos mensajeros intracelulares encargados de transportar los mensajes químicos desde la membrana del fotorreceptor al citoplasma, donde tiene lugar la síntesis de MEL.

a) Sistema del AMPc.

- Efecto del dibutiril-AMPc.

El hecho de que el forskolín revierta el efecto inhibitor de la luz sobre la actividad NAT y la síntesis de MEL (Fig. 36) sugiere que el sistema del AMPc se encuentra implicado en el control de la síntesis de MEL. A tenor de estos resultados nos planteamos profundizar sobre la implicación de este nucleótido cíclico en la síntesis de MEL.

Como puede observarse en la Fig. 45a) el dibutiril-AMPc es capaz de aumentar la NAT en las dos condiciones de cultivo, luz y oscuridad. Por lo tanto, el dibutiril-AMPc en la concentración empleada (1 mM) es capaz de revertir el efecto inhibitor de la luz. El análisis de varianza de dos vías, demuestra el carácter aditivo de la oscuridad y del dibutiril-AMPc estimulando la actividad NAT.

Los resultados de la MEL (Fig. 45b), muestran también el efector estimulador del dibutiril-AMPc. El análisis de varianza de dos vías confirma el carácter multiplicativo de los dos factores estimulando la síntesis de MEL. La oscuridad incrementa la MEL en aproximadamente 6 veces ($p < 0,01$) mientras que el dibutiril-AMPc sólo lo duplica ($p < 0,01$). Cuando ambos factores actúan conjuntamente, la MEL sintetizada aumenta unas

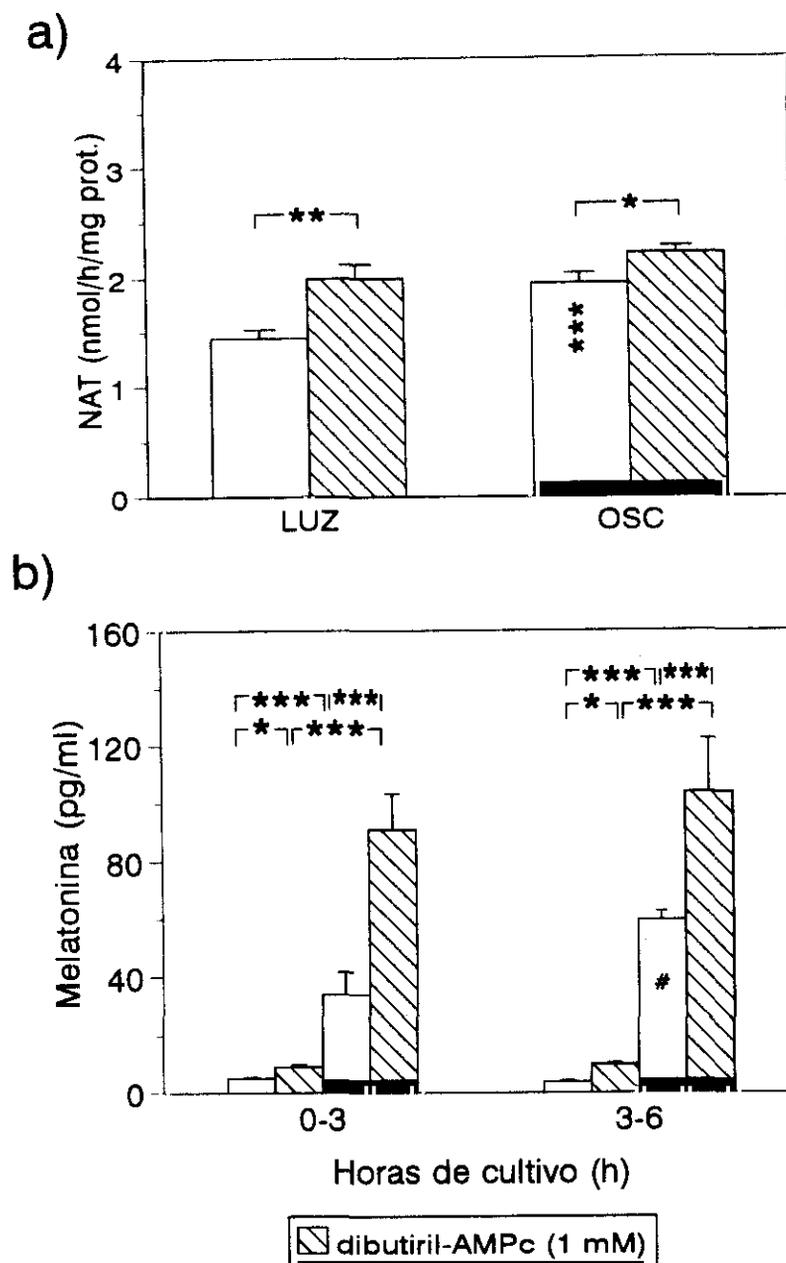


Figura 45. Efecto del dibutiril-AMPC (1 mM) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezi* en cultivo. **a)** Actividad NAT, **b)** Melatonina liberada al medio. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5) * p<0,05; ** p<0,025; *** p<0,01. (*) dentro de las columnas indican significación estadística con respecto al grupo correspondiente cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

10 veces. No existen grandes diferencias como consecuencia del tiempo de cultivo, sólo se observa un ligero incremento en la MEL sintetizada por las copas ópticas en oscuridad ($p < 0,05$) a las 6 horas.

Una vez demostrado el papel de los niveles intracelulares del AMPc en la generación del ritmo de síntesis de MEL, nos propusimos estudiar la importancia, tanto de la síntesis como de la degradación del nucleótido cíclico, en el mantenimiento de la funcionalidad del fotorreceptor.

- **Efecto del forskolín y IBMX.**

En la Fig. 46a) muestra como la actividad NAT se incrementa significativamente tanto por la adición de IBMX ($p < 0,05$) como de forskolín ($p < 0,05$). Cuando ambos compuestos se añaden de forma conjunta, el incremento de NAT es mayor que cuando se añaden por separado ($p < 0,01$ frente a $p < 0,05$). Con respecto a la síntesis de MEL, el ANOVA de doble vía muestra el efecto sinérgico de ambos tratamientos, es decir, el IBMX ($75 \mu\text{M}$) duplica la producción de MEL (Fig. 46b), el forskolín la cuadruplica, y ambos fármacos conjuntamente aumentan la producción de MEL en 10-12 veces ($p < 0,01$).

Dado que el efecto inhibitor del IBMX sobre las fosfodiesterasas no muestra un perfil típico dosis-respuesta, sino que para conseguir el 100 % de la inhibición de dichas enzimas es necesario utilizar concentraciones muy altas de IBMX, repetimos el experimento anterior aumentando la concentración de IBMX empleada (1 mM), para asegurarnos de la inhibición total de la actividad fosfodiesterasa en los fotorreceptores.

No se observan diferencias importantes entre el efecto del IBMX a $75 \mu\text{M}$ (Fig. 46a) y 1 mM (Fig. 47a) sobre la actividad NAT. De nuevo se manifiesta un efecto aditivo significativo entre el forskolín y el IBMX incrementando ambos factores la actividad enzimática. En cuanto a la producción de MEL, el IBMX a una concentración de 1 mM, incrementa la producción de MEL unas 10 veces ($p < 0,01$), dicho incremento es muy superior al observado a la concentración de $75 \mu\text{M}$, que sólo lo duplicaba. El efecto del forskolín ($50 \mu\text{M}$) se mantiene, estimulando la producción de MEL en unas 4 veces ($p < 0,01$), mientras que la acción conjunta de ambos fármacos es capaz de elevar la síntesis de MEL entre 40-50 veces ($p < 0,01$). Este efecto estimulador del IBMX sobre los niveles de MEL resulta ligeramente aumentado durante el segundo período de cultivo ($p < 0,01$).

b) **Sistema del GMPc.**

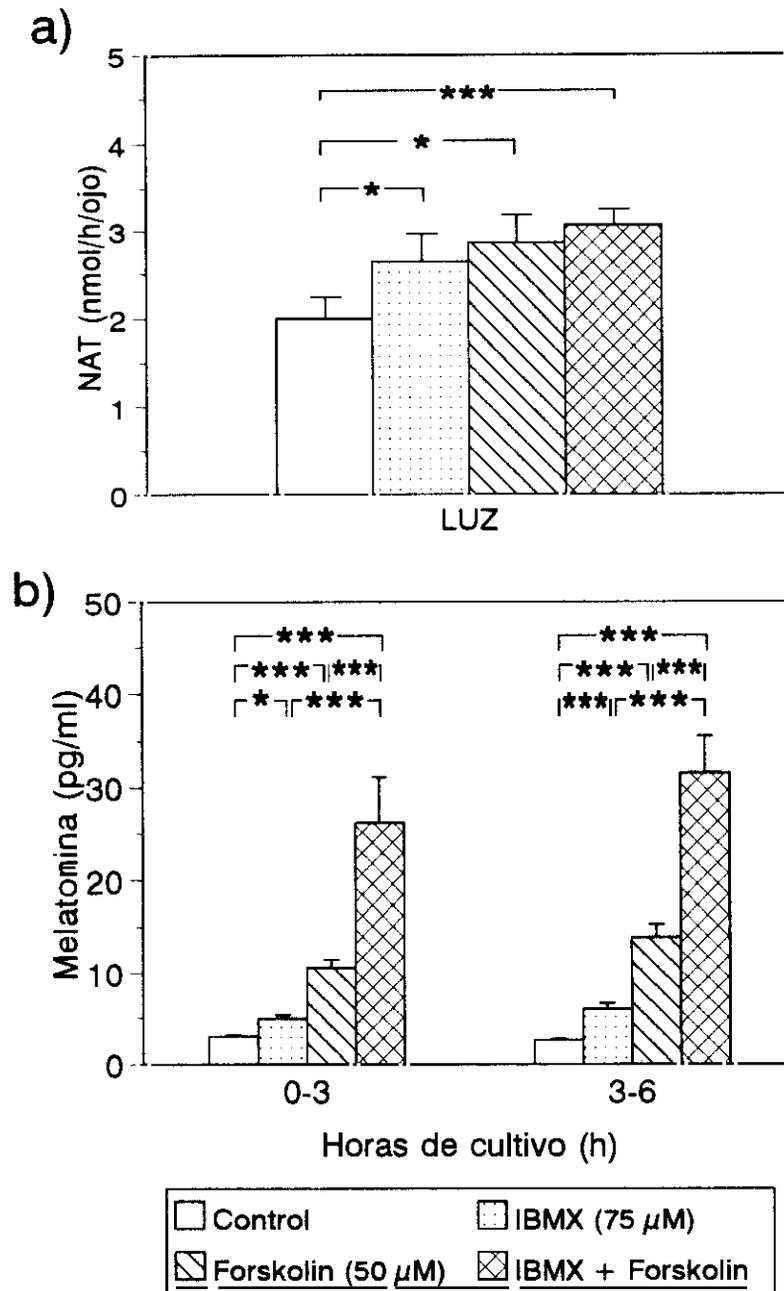


Figura 46. Efecto del IBMX (75 μ M) y del forskolin (50 μ M) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* cultivadas en luz. **a)** Actividad NAT, **b)** Melatonina liberada al medio de cultivo. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5) * p<0,05; *** p<0,01.

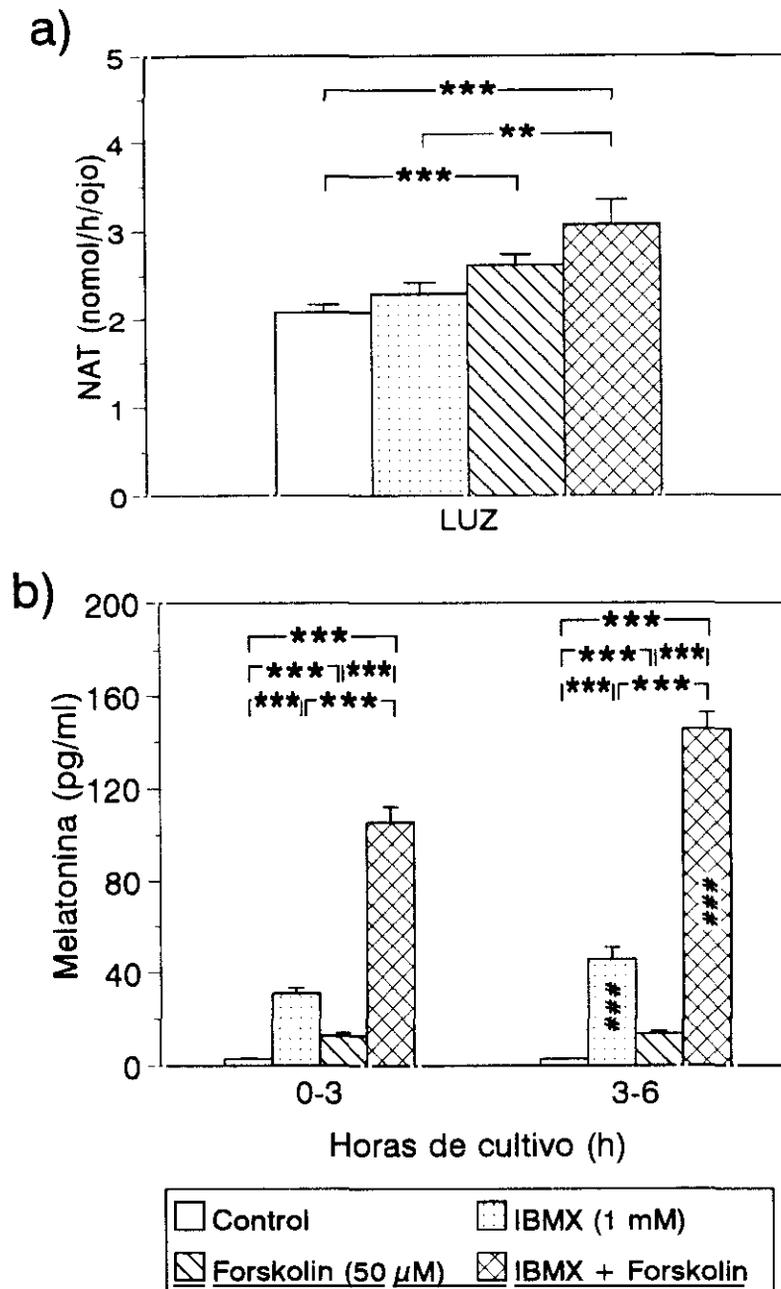


Figura 47. Efecto del IBMX (1 mM) y del forskolin (50 μ M) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* cultivadas en luz. **a)** Actividad NAT, **b)** Melatonina liberada al medio de cultivo. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). ** p<0,025; *** p<0,01. (#) Dentro de las columnas indica significación estadística de la melatonina medida en períodos de cultivo consecutivos del mismo grupo.

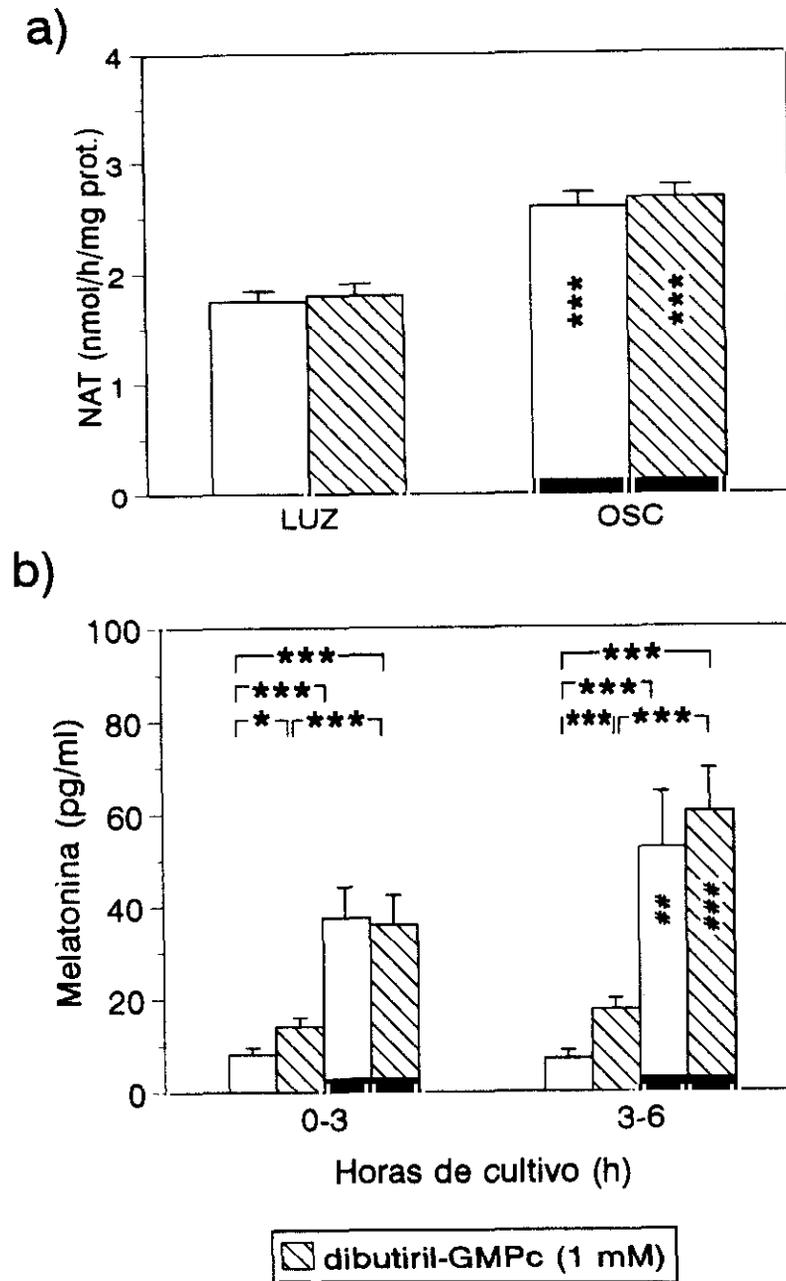


Figura 48. Efecto del dibutiril-GMPc (1 mM) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezi* en cultivo. **a)** Actividad NAT, **b)** Melatonina liberada al medio. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5) * p<0,05; ** p<0,025; *** p<0,01. (*) dentro de las columnas indican significación estadística con respecto al correspondiente grupo cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida del mismo grupo en períodos de cultivo consecutivos.

Tras el tiempo de cultivo, la actividad NAT no se vio afectada por la adición del nucleótido cíclico, no mostrando diferencias significativas, ni en las copas cultivadas en luz, ni en oscuridad (Fig. 48), aunque en estas últimas se observó el efecto estimulador de la oscuridad ($p < 0,01$).

El dibutilil-GMPc no modificó la MEL producida por las copas ópticas cultivadas en oscuridad (Fig. 48b), en cambio la MEL producida en luz se vio significativamente aumentada con la adición del análogo del GMPc.

c) Sistema del Calcio.

- Efecto del EGTA.

En la Fig. 49a) se muestran los resultados obtenidos de la actividad NAT. Mientras que en luz el EGTA no tiene ningún efecto sobre la actividad enzimática, en oscuridad el EGTA es capaz de anular totalmente el incremento de NAT que se produce normalmente en estas condiciones ($p < 0,01$). Es más, dicho efecto inhibitor es capaz de reducir la actividad enzimática por debajo de los niveles correspondientes del grupo cultivado en luz ($p < 0,025$).

En cuanto a la MEL producida (Fig. 49b), se observa un resultado similar, el EGTA no tiene ningún efecto en las copas ópticas cultivadas en luz, mientras que en oscuridad se anula totalmente el incremento nocturno de MEL ($p < 0,01$). Dicho efecto inhibitor se mantiene durante todo el período de cultivo.

- Efecto del potasio.

En contra de lo que cabría esperar la despolarización masiva de las células provocada por el potasio, tiene un efecto inhibitor sobre la actividad NAT (Fig. 50a), la adición de potasio reduce de forma muy significativa la actividad enzimática, tanto en luz como en oscuridad ($p < 0,01$ en ambos casos). La producción de MEL (Fig. 50b) también se encuentra afectada negativamente, el potasio anula totalmente la síntesis de MEL estimulada por la oscuridad ($p < 0,01$).

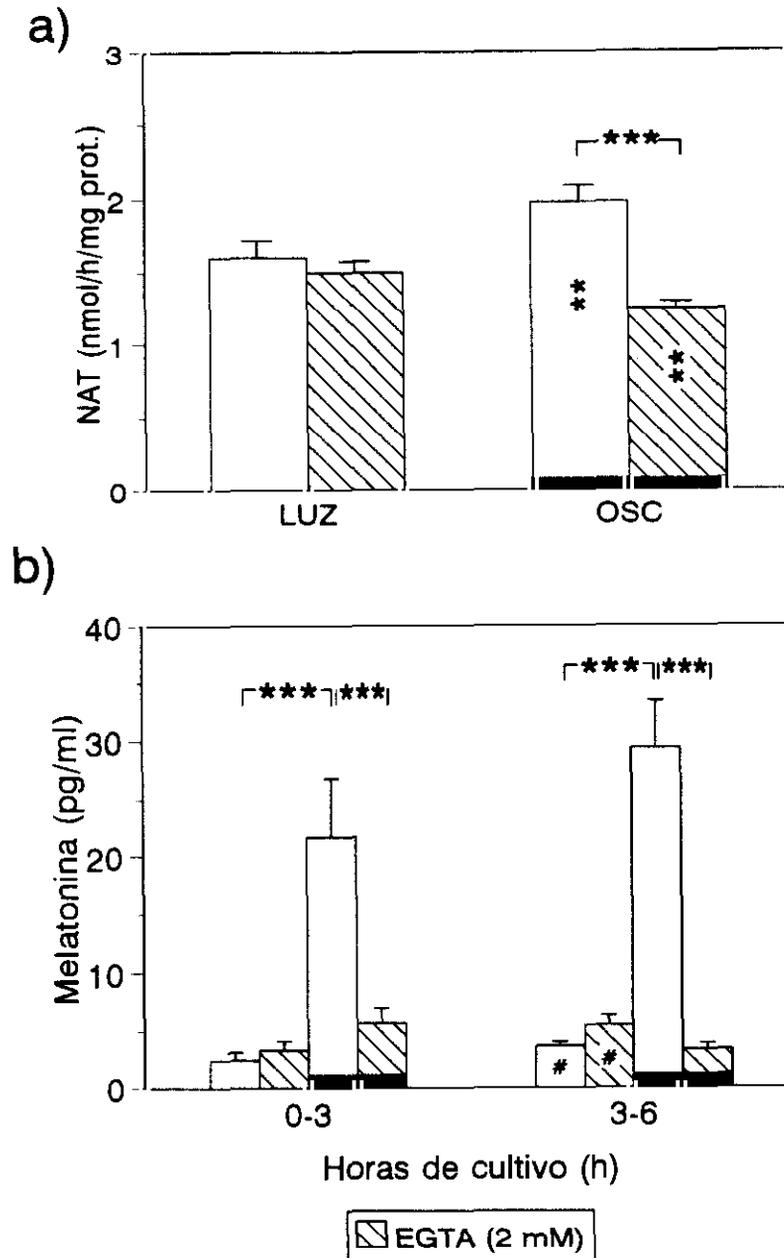


Figura 49. Efecto del EGTA (2 mM) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezii* en cultivo. **a)** Actividad NAT, **b)** Melatonina liberada al medio. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). * p<0,05; ** p<0,025; *** p<0,01. (*) dentro de las columnas indican significación estadística con respecto al correspondiente grupo cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida del mismo grupo en períodos de cultivo consecutivos.

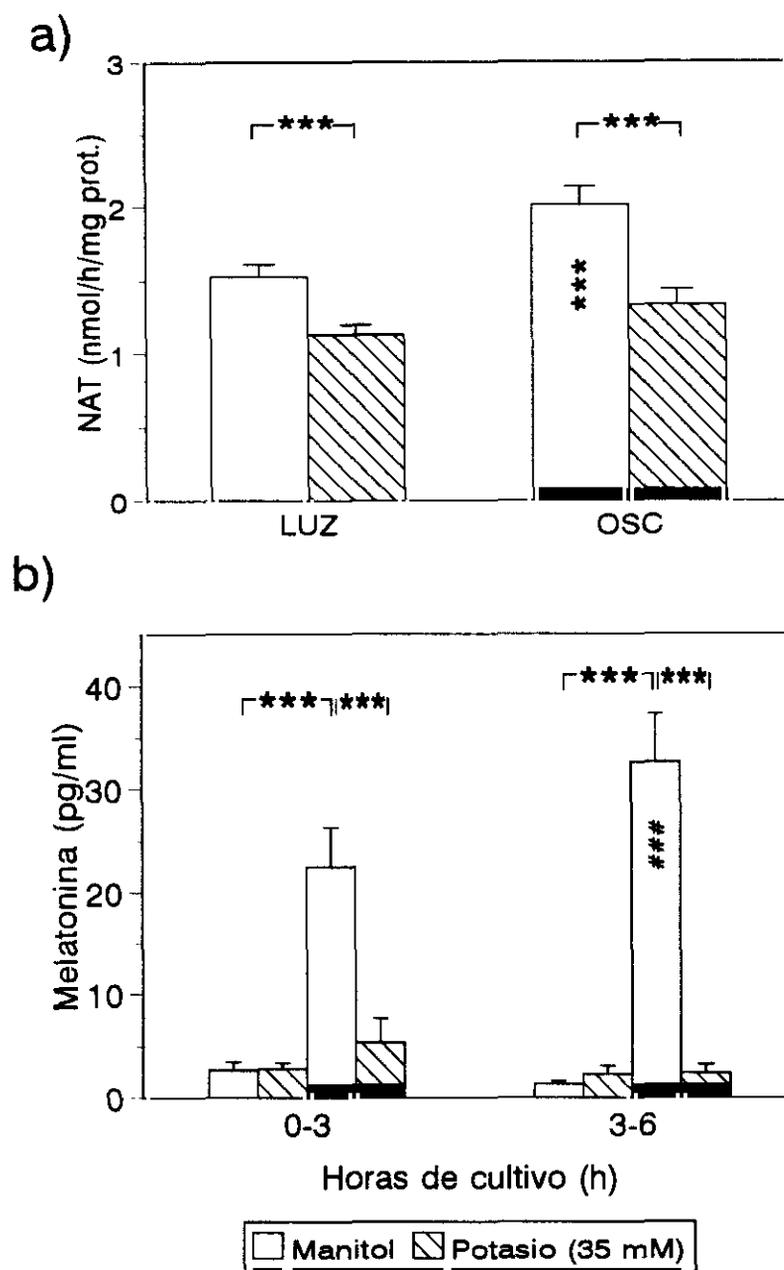


Figura 50. Efecto del potasio (35 mM) sobre la capacidad biosintética de melatonina de copas ópticas de *R. perezi* en cultivo. **a)** Actividad NAT, **b)** Melatonina liberada al medio. La barra oscura indica los grupos incubados en oscuridad. Los datos se representan como la $\bar{x} \pm e$. (n=5). *** p<0,01. (*) dentro de las columnas indican significación estadística con respecto al correspondiente grupo cultivado en luz. (#) Indica significación estadística de la melatonina medida del mismo grupo en períodos

V. DISCUSIÓN

ENSAYO ENZIMÁTICO Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

Desde que la actividad NAT de la glándula pineal fue detectada por primera vez en 1960 por Weissbach y colaboradores, utilizando [¹⁴C]serotonina como sustrato y aislando la [¹⁴C]N-acetilserotonina y [¹⁴C]melatonina resultante mediante TLC, esta enzima ha sido objeto de un gran número de trabajos, enfocados al estudio de su implicación como enzima limitante de la síntesis de melatonina. La técnica radioisotópica, basada en el uso de TLC para aislar y cuantificar los productos de la reacción, fue utilizada hasta los primeros años de la década de los 70 (Klein *et al.*, 1970).

El método de valoración de la actividad NAT ha sido mejorado paulatinamente con dos objetivos principales: estabilizar la enzima durante el ensayo e incrementar la sensibilidad del mismo (Sudgen *et al.*, 1983). Deguchi y Axelrod en 1972 utilizaron la triptamina y [¹⁴C]AcCoA como sustratos de la enzima, deteniendo la reacción con tampón borato pH 10 y extrayendo los productos marcados con una mezcla de tolueno:alcohol isoamilo (97:3).

Este método original posteriormente fue simplificado (Parfitt *et al.*, 1975), sustituyendo el tolueno:isoamilo por cloroformo para parar la reacción y extraer los productos, y utilizando una concentración mayor de sustratos para medir la actividad enzimática en condiciones saturantes. Este método descrito por Parfitt y colaboradores ha sido utilizado por numerosos grupos de investigación para la determinación de la actividad NAT. Posteriormente fueron introducidas una serie de leves modificaciones en el ensayo radioenzimático, con el fin de mejorar la estabilidad de la enzima durante el ensayo (Hamm y Menaker, 1981), o en su lugar, para adaptar el ensayo a distintas especies animales (hámster, Steinlechner *et al.*, 1984; pollo y rata Rodríguez-Cabello *et al.*, 1990a), incluyendo modificaciones en el pH, el volumen de reacción o el procedimiento de extracción.

La reducción de los volúmenes del ensayo (microensayos), se ha empleado también como un medio eficaz para aumentar la sensibilidad, hasta el punto de que es posible medir la NAT en un 1/50 de glándula pineal de rata (Sugden *et al.*, 1983).

En los últimos años, las técnicas de HPLC han permitido disponer de un método alternativo al radioenzimatoensayo para cuantificar los productos de la reacción (Thomas *et al.*, 1990; Fajardo *et al.*, 1992). Esta variante aumenta la sensibilidad debido a que permite el uso de concentraciones altas de AcCoA, obviando el problema de la dilución excesiva del marcador que se produce en el radioenzimatoensayo, además el uso de los detectores fluorimétricos o electroquímicos permiten una valoración más específica de los productos de la reacción.

Ya se ha comentado previamente en esta Memoria la gran inestabilidad de la NAT, tanto en condiciones *in vivo* tras la exposición del animal a la luz durante la noche (Klein y Weller, 1972), como *in vitro* en los homogeneizados de tejido (Olcese y Møller, 1989). Esta característica ha imposibilitado hasta la fecha el conocimiento de muchos de los aspectos de esta enzima, a pesar del gran número de trabajos publicados (Binkley *et al.*, 1979; Binkley, 1981). Además, la alta inestabilidad propia de la enzima reduce su vida media a unos pocos minutos, lo que implica que ha de ser sintetizada *de novo* constantemente en la célula.

Hasta el momento, se han propuesto una serie de hipótesis concretas para explicar la inestabilidad de la NAT. Una primera hipótesis se basa en la inactivación rápida de la NAT mediante un mecanismo de intercambio tiol:disulfido, que conduce a la oxidación del centro activo por la formación de un puente disulfuro en un residuo de Cys esencial para la catálisis enzimática (Namboodiri *et al.*, 1980). En apoyo de esta hipótesis se ha observado que la adición al ensayo de compuestos con grupos -SH libres, como por ejemplo la cisteamina o ditioneitol, protegen la enzima manteniéndola en su estado activo (Binkley *et al.*, 1979). En la actualidad se desconocen los compuestos celulares endógenos que podrían llevar a cabo esta regulación, por lo que la importancia fisiológica de este mecanismo en condiciones *in vivo* resulta bastante cuestionable.

Para la inactivación específica de la NAT en la glándula pineal de rata se ha propuesto otra hipótesis, basada en la existencia de un factor responsable de la inactivación (Chan y Ebadi, 1981). Dicho factor aparecería exclusivamente durante el día inhibiendo la actividad NAT (Khoory y Schloot, 1986).

En el caso de la retina de *Rana* la actividad NAT en el homogeneizado de retina es especialmente lábil, lo que posiblemente haya determinado la ausencia total de trabajos enfocados al estudio de esta enzima en los anfibios. La actividad enzimática se reduce a niveles no detectables durante el tiempo del ensayo (15-20 min.). Una posible explicación para esta rápida inactivación de la enzima es que alguna de las condiciones físico-químicas del ensayo estén muy alejadas de las condiciones intracelulares necesarias para permitir la expresión de su actividad. Por ejemplo, la destrucción de la compartimentación intracelular es una de las causas propuestas para explicar una pérdida similar de la actividad enzimática en la glándula pineal de pollo *in vitro* (Rodríguez-Cabello *et al.*, 1989).

El efecto protector del EGTA, quelante específico del calcio, sobre la NAT en homogeneizados de retina de *R. perezi*, indicaría que el calcio estaría implicado en la inactivación de la enzima. Este efecto del EGTA ha sido descrito anteriormente para la NAT

de la glándula pineal de pollo, rata (Rodríguez-Cabello *et al.*, 1990) y bóvidos (Fajardo *et al.*, 1992). Los ácidos policarboxílicos (con propiedades quelantes inespecíficas de iones metálicos) también protegen de forma significativa la NAT (Namboodiri *et al.*, 1979). Por tanto, una reducción de la concentración del calcio libre es una condición necesaria para mantener activa la enzima. El EGTA es especialmente eficaz para este propósito ya que hemos observado que es capaz de mantener la actividad NAT durante más de 3 horas a 25°C sin reducciones significativas.

Por otra parte, la acción del calcio sobre la NAT parece ser muy compleja, posiblemente este ión esté involucrado tanto en los mecanismos que regulan la síntesis y la degradación de la enzima como en su capacidad catalítica. En condiciones *in vitro*, el calcio es un potente activador de la NAT en la glándula pineal de rata (Morton, 1987a), no obstante la importancia fisiológica de esta acción activadora puede que no sea relevante, debido a que la concentración activadora óptima de calcio es 10 mM, muy superior a las concentraciones de este ión en el citoplasma, lugar donde se encuentra la NAT *in vivo*.

El equipo de la Dra. Agapito ha sugerido que el efecto del calcio sobre la NAT se debe a la activación de algún proceso de degradación específico (Rodríguez-Cabello *et al.*, 1989). Las proteasas activadas por calcio (calpaínas) podrían llevar a cabo este proceso, en este sentido la adición de detergentes no iónicos, como Triton X-100 o Nonidet P40, al homogeneizado de glándula pineal de pollo contrarresta el efecto protector del EGTA (Rodríguez-Cabello *et al.*, 1990). El detergente podría solubilizar las calpaínas unidas a las membranas (Johnson, 1990) promoviendo la degradación de la NAT.

En cuanto al efecto de la dilución del homogeneizado sobre la actividad NAT, parece ser que depende de varias circunstancias, mientras que utilizando homogeneizados de glándula pineal de rata se obtiene una correlación positiva entre la cantidad de homogeneizado y la actividad enzimática (Deguchi y Axelrod, 1972), Binkley y colaboradores en 1979, observaron que la dilución del homogeneizado de pineal de pollo incrementa la estabilidad de la NAT, mostrando así la existencia de sustancias inhibitoras en el homogeneizado. En nuestro caso no observamos ningún efecto, ni de tipo favorable ni desfavorable, como consecuencia de la dilución de la enzima, conservándose la linealidad entre actividad NAT y cantidad de homogeneizado. Es decir, las condiciones del ensayo utilizadas en el presente trabajo aseguran la linealidad de la reacción, no produciéndose pérdidas de actividad asociadas a agotamiento de los substratos o a una posible inhibición de la enzima por otros componentes del homogeneizado.

Otro método ampliamente utilizado para estabilizar la NAT en el ensayo es la adición de AcCoA en altas concentraciones durante la homogeneización del tejido (Binkley *et al.*, 1976; Binkley *et al.*, 1979, Hamm y Menaker, 1981). La unión de este sustrato a la enzima protege su centro activo, evitando la oxidación del mismo y consecuentemente la desactivación de la NAT.

En nuestro estudio la adición de AcCoA previa al ensayo no protege la NAT ocular de *R. perezi* en ausencia de EGTA. Parece ser pues, que el mecanismo de inactivación de la NAT depende del tejido biológico y del método de valoración utilizado. En el caso de la retina de rana la inactivación de la NAT por proteasas activadas por calcio podría ser mucho más importante que la desactivación por intercambio tiol:disulfido, mecanismo que podría ser la vía mayoritaria existente en la glándula pineal de algunas especies (Webb *et al.*, 1986).

En el análisis de las condiciones físico-químicas necesarias para conseguir la actividad óptima de esta enzima *in vitro*, se ha descrito que la actividad NAT depende de la concentración de iones del tampón del ensayo (Namboodiri *et al.*, 1979), siendo necesaria una concentración de al menos 150 mM de Na⁺, o en su lugar K⁺, para obtener su actividad óptima (Morton, 1989). Esto indica que la NAT necesita una fuerza iónica alta para su proceso de catálisis, aunque no muestra especificidad por el catión monovalente. La estimulación de la NAT por la fuerza iónica puede venir determinada por cambios en el estado de polimerización de la enzima, ya que se ha determinado que en la glándula pineal de rata la NAT puede presentarse en varias formas oligoméricas (Namboodiri *et al.*, 1987b). También se ha descrito un efecto estimulador específico del fosfato para la NAT de pollo (Hamm y Menaker, 1981). La utilización de un tampón fosfato con una concentración de 250 mM para el ensayo de la NAT de retina de *R. perezi* satisface estos dos requisitos, alta concentración de potasio y fosfato.

Compuestos relacionados con el fosfato ricos en enlaces de alta energía, como el pirofosfato, trifosfatos y difosfatos de nucleótidos, también tienen un claro efecto protector para la enzima (Namboodiri *et al.*, 1979), sugiriéndose que la NAT activa podría ser una forma fosforilada.

El pH tiene una importancia crucial tanto en la conservación de la enzima activa (Namboodiri *et al.*, 1979) como en su capacidad catalítica. En general, el pH para la determinación de la NAT en vertebrados se encuentra en el intervalo 6,5-6,8 (Deguchi y Axelrod, 1972; Vaněček y Illnerová, 1980; Namboodiri *et al.*, 1987), observándose que pH superiores a 6,9 inactivan irreversiblemente la NAT (Steinlechner *et al.*, 1984). Para la retina

de *R. perezii* sólo es posible detectar actividad NAT en un intervalo muy estrecho de pH, entre 6,1 y 7, obteniéndose la actividad óptima a 6,4-6,5. La actividad enzimática disminuye bruscamente a pH menores de 6, lo que puede deberse a la pérdida de la capacidad quelante de calcio del EGTA.

La NAT muestra también una extrema termosensibilidad (Morton, 1982), a 37°C la enzima de pineal de pollo se reduce al 45 % de su valor inicial tras 20 minutos de incubación (Binkley *et al.*, 1979). Debido a este hecho, el tiempo del ensayo debe reducirse para conservar la linealidad durante el ensayo, por ejemplo, en el método original se recomienda una incubación de 10 min a 37°C para la glándula pineal de rata (Deguchi y Axelrod, 1972). La NAT de la retina en roedores es aún más sensible, sólo mantiene su linealidad durante los primeros 5 min. del ensayo (*Meriones unguiculatus*, Olcese y Moller, 1989). Por el contrario la NAT de la retina de *R. perezii* protegida con EGTA conserva la linealidad de la reacción durante al menos 30 min. cuando se incuba a 25°C ó a 35°C

En relación con los blancos del ensayo, en la descripción del método radioenzimático original para la NAT se recomienda que tras la extracción el disolvente debe evaporarse antes del contaje, con el fin de reducir las cuentas que no corresponden al producto marcado, obteniéndose así unos tubos blanco más reproducibles (Deguchi y Axelrod, 1972). En el protocolo utilizado en esta Memoria para la valoración enzimática se siguieron estas recomendaciones, obteniéndose unos tubos blanco sólo ligeramente por encima del fondo del contaje, con lo que el límite de sensibilidad de ensayo es muy bajo.

En el método original también se recomienda la utilización de triptamina como sustrato por una serie de ventajas, por ejemplo una evaporación del disolvente más sencilla, y la ausencia de transformaciones posteriores del producto de la reacción en el homogeneizado. Cuando, de forma alternativa, se emplea serotonina como sustrato es necesario la utilización de alcohol isoamilo para la extracción, sin embargo este disolvente tiene el inconveniente de proporcionar unos tubos blanco más altos debido a su mayor polaridad, arrastrando más [¹⁴C]AcCoA que el cloroformo o el tolueno (Deguchi y Axelrod, 1972). A priori, la serotonina endógena presente en el homogeneizado podría interferir en el ensayo, sin embargo en el caso concreto de la retina de rana, hemos observado que esta interferencia con la serotonina endógena es depreciable (tras la extracción con alcohol isoamilo no se obtuvieron diferencias entre blancos sin homogeneizado y blancos sin serotonina).

La mayor parte (92 %) de la actividad NAT en la retina de *R. perezii* se ha localizado en la retina neural, corroborándose los resultados obtenidos en otras especies (Iuvone y Besharse, 1983).

En relación con la caracterización cinética, cuando se utiliza un método "a punto final", como en el caso que nos ocupa, han de tomarse una serie de precauciones adicionales para asegurarse que se está estimando la velocidad real (o inicial), siendo requisitos imprescindibles que los sustratos no se agoten durante la duración del ensayo, y que los productos formados no se acumulen en cantidad suficiente como para inhibir la reacción. En nuestro caso, el producto formado es siempre inferior al 10 % de la AcCoA total añadida, por lo que los sustratos no son nunca limitantes, además la linealidad de la reacción se conserva durante al menos 30 minutos, aun cuando se acelere la reacción con temperatura elevada (35°C), lo que indica que el producto formado en el ensayo no inhibe la NAT.

La cinética de la NAT en la retina de *R. perezii* muestra una forma hiperbólica típica de la ecuación de Michaelis-Menten para ambos cosustratos (triptamina y AcCoA), permitiendo así la estimación de las constantes K_M y V_{max} . Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio cinético en la retina de los vertebrados, por lo cual las comparaciones de las constantes cinéticas nos vemos obligados a compararlas con las descritas para la glándula pineal.

La diferencia en los tamaños de la glándula pineal en las distintas especies estudiadas impide la comparación interespecífica de la V_{max} . Este problema podría solucionarse expresando la actividad enzimática específica, referida al contenido de proteínas, sin embargo los distintos métodos de valorar la actividad enzimática en el homogeneizado con o sin centrifugación previa, también dificultan dicha comparación.

Los valores obtenidos por nosotros en relación a la K_M para la AcCoA en la retina de *Rana perezii* (69 μM) se encuentran dentro del intervalo descrito en la bibliografía para la glándula pineal de otras especies (rata: 11-150 μM Deguchi, 1975a; Morton, 1982; Voisin *et al.*, 1984; Reiter *et al.*, 1990. *Ovis*: 78 μM Voisin *et al.*, 1984. *Bos* 25-50 μM Chan y Ebadi, 1980; Fajardo *et al.*, 1992). En cambio, la K_M para la triptamina es muy variable dependiendo de la especie estudiada, mientras que en la pineal de rata esta constante presenta un valor muy elevado (1-4 mM: Voisin *et al.*, 1984; Deguchi, 1975a; Morton, 1982; Khoory y Schloot, 1986; Reiter *et al.*, 1990), en la pineal de otros mamíferos la K_M es muy inferior (*Ovis*: 85-100 μM , Voisin *et al.*, 1984; *Bos*: 5-31 μM , Chan y Ebadi, 1980; Fajardo *et al.*,

1992; *Meriones*: 100 μM , Olcese y Moller, 1989; *Oryctolagus*: 160 μM , Heim *et al.*, 1991) y más acorde con el valor calculado por nosotros (48-65 μM) para la retina de *R. perezii*. Estas diferencias en la cinética de la NAT con respecto a la amina aceptora puede ser indicativo de diferencias en la síntesis de melatonina entre las distintas especies.

En los estudios anteriormente mencionados no aparecen grandes diferencias entre las K_M de la triptamina y la serotonina, en cambio la NAT de la retina de *R. perezii* muestra una afinidad mayor por la serotonina que por la triptamina ($K_M = 20 \mu\text{M}$ frente a 50-60 μM ; Tabla II). Además, la afinidad para ambas indolaminas resulta ser independiente de la concentración de AcCoA añadida. El cociente V_{max}/K_M ha sido utilizado en los estudios de especificidad de sustrato como criterio de elección del mejor sustrato para una enzima determinada (Grant *et al.*, 1991), en nuestro caso, debido a la mayor afinidad de la serotonina, este cociente es mayor para este indol que para la triptamina (ver Tabla II).

Los estudios cinéticos realizados con homogeneizados crudos de tejidos tienen el inconveniente de posibles interferencias por parte de otras actividades enzimáticas presentes en la preparación, y que pueden determinar tanto una degradación del sustrato como del producto. Por ejemplo, la MAO, enzima responsable del metabolismo de monoaminas en el tejido nervioso, podría interferir en los estudios cinéticos reduciendo la concentración de las indolaminas utilizadas como sustratos para la NAT. La adición de pargilina (potente inhibidor de la actividad MAO en poiquiloterms, Olcese y de Vlaming, 1979) o eserina (inhibidor de la degradación de melatonina, Cahill y Besharse, 1989) demuestra que, esta posible interferencia en los resultados finales resulta despreciable, al menos en nuestras condiciones de ensayo.

Teniendo en cuenta las pruebas obtenidas podemos afirmar que la actividad NAT puede determinarse en la retina de *R. perezii* por un método radioenzimático con las siguientes condiciones óptimas:

- Tampón del ensayo: Fosfato potásico 0,25 M pH=6,5
- Tampón de homogeneización: Tampón fosfato suplementado con 20 mM EGTA
- Cantidad de tejido: 1/3 de retina por tubo.
- Tiempo de incubación: 20 minutos.
- Temperatura de incubación: 25°C
- Sustratos: triptamina (10 mM) o serotonina (10 mM), indistintamente. AcCoA (50 μM).

La elección de las concentraciones de sustratos para la realización rutinaria del ensayo de la NAT se hizo atendiendo a los siguientes criterios. Es conveniente utilizar concentraciones saturantes de la amina aceptora de grupos acetilo, no solo para obtener la actividad enzimática máxima, sino también para minimizar los efectos negativos de otras enzimas presentes en el homogeneizado crudo, en su competencia por este sustrato (Namboodiri *et al.*, 1987a). En cuanto a la amina que conviene utilizar, a priori la serotonina debería ser el sustrato elegido, debido a su mayor cociente (V_{max}/K_M), no obstante en la estimación de la actividad NAT en la retina de *R. perezi* se eligió la triptamina en base a la mayor sencillez del proceso de extracción, ya que en condiciones saturantes (las utilizadas en el ensayo) no hay diferencias en la determinación de la actividad enzimática con ambas aminas. Sin embargo, pensamos que para el desarrollo de los estudios cinéticos debe utilizarse la serotonina como sustrato, con el fin de obtener una idea más cercana de la situación de la enzima *in vivo*.

La concentración de AcCoA (50 μ M) se eligió en base a dos motivos, es un valor cercano a las concentraciones fisiológicas determinadas en la glándula pineal de varios mamíferos (King y Steinlechner, 1985), y además la utilización de concentraciones elevadas de AcCoA produciría una dilución excesiva del sustrato marcado, con lo cual la sensibilidad y precisión del ensayo resultarían muy disminuidas.

En varias especies de aves y mamíferos se ha observado que la síntesis de melatonina se reduce con la edad, una vez superado el período de crecimiento (Skene *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1989). Esta disminución se ha correlacionado con una pérdida del número de células de la glándula pineal (Reuss *et al.*, 1990), y un descenso de las actividades enzimáticas de la ruta biosintética (NAT y HIOMT, Dax y Sugden, 1988). Una reducción similar con la edad también se ha descrito para la retina de aves (Pang *et al.*, 1989) y mamíferos (Pulido y Clifford, 1986). Los anuros son animales de crecimiento continuo (Jørgensen, 1992), encontrándose en *R. perezi* una relación directa entre el tamaño corporal y la edad (Patón *et al.*, 1991). Antes de interpretar los resultados obtenidos de la relación entre tamaño y NAT ocular, hay que tener en cuenta que la retina de anuros sólo crece por los bordes externos, no cambiando su grosor (Zhu *et al.*, 1990), es decir, que mientras que el tamaño total del ojo crece proporcionalmente al cubo de su radio, la retina sólo lo hace proporcionalmente al cuadrado del mismo. La ley alométrica que relaciona la superficie con el volumen presupone que el crecimiento de ambas estructuras debe estar relacionado por un exponente de 0,667 (Hill y Wyse, 1992). En cambio, experimentalmente hemos obtenido un

exponente de sólo 0,472 (Fig. 8b) para la actividad NAT ocular. En consecuencia, aunque la actividad NAT en la retina crece con el tamaño corporal, su cantidad relativa disminuye en los animales grandes. Presentando pues en la rana una correlación con el tamaño corporal similar a la descrita en otros vertebrados poiquilothermos (Firth *et al.*, 1979; Gern *et al.*, 1978).

La actividad NAT es idéntica en ambos ojos del mismo animal, como lo demuestra la significación estadística del coeficiente de correlación. El hecho de que los ojos sean una estructura par, con un patrón de NAT idéntico en ambos, y que la retina tenga un mayor tamaño que la pineal implica una serie de ventajas para el estudio experimental de esta enzima en la retina frente a su análisis en la glándula pineal, tanto *in vivo* como *in vitro*. En los tratamientos experimentales siempre se puede disponer de un ojo control procedente del mismo animal, aparte de la indiscutible ventaja que supone poder disponer de una cantidad de tejido varias veces superior a la proporcionada por la glándula pineal de los anuros.

Se ha demostrado la existencia de una oscilación día-noche en la actividad NAT de la retina de varias especies de vertebrados, presentando durante la noche un incremento de 2-3 veces en la retina de los mamíferos (Miller *et al.*, 1980; Olcese y Moller, 1989), siendo este incremento mucho más marcado en aves y en cultivo de copas ópticas de *Xenopus* (Hamm y Menaker, 1981; Zawilska y Nowak, 1992; Iuvone y Besharse, 1983). La retina de *R. perezi* muestra una diferencia pequeña, pero significativa, entre los valores de día y noche de la actividad NAT, que se debe a un aumento en la cantidad de enzima durante la noche y no a cambios en la afinidad por los substratos, ya que se conserva la K_M . Esta conservación de la K_M concuerda con resultados obtenidos en la glándula pineal de mamíferos (King y Steinlechner, 1985).

El incremento nocturno de la NAT en la retina de *R. perezi* es inhibido por la exposición a la luz, obteniéndose los valores típicos diurnos tras una exposición de solo 10 minutos. Esta fotosensibilidad de la NAT ocular nocturna ha sido demostrada anteriormente en numerosos trabajos (Iuvone y Besharse, 1983; Hamm *et al.*, 1983; Nowak y Zurawska, 1989; Nowak, 1990)

Resulta llamativo la alta actividad NAT observada durante el día en la retina de la rana, hecho que no se ha encontrado en otras especies. Estos niveles diurnos podrían depender de la acción de otras enzimas (N-acetiltransferasas) presentes en la retina, que *in vivo* pueden no intervenir en la síntesis de melatonina, pero pueden contribuir en la actividad

enzimática total valorada en el ensayo radioenzimático. En relación a este aspecto se ha demostrado la existencia de otras enzimas capaces de acetilar aminas aromáticas como la triptamina, pudiendo llegar a constituir una parte importante de la actividad valorada durante la fase luminosa del fotociclo en la retina de *R. perezi*.

Bajo la denominación N-acetiltransferasas (NAT) se agrupan una serie de enzimas caracterizadas por acetilar aminas aromáticas utilizando AcCoA como donador de grupos acetilo (Deguchi, 1992). La clasificación de estas enzimas se realiza atendiendo a su especificidad de sustrato, la arilalquilamina NAT (AA-NAT) solo es capaz de acetilar grupos amino unidos al anillo aromático por una cadena alquílica de dos carbonos, mientras que la arilamina NAT (A-NAT) tiene un espectro de sustratos más amplio acetilando grupos amino unidos directamente al anillo aromático. Estos dos tipos de enzimas, además, difieren entre sí en su función biológica. La AA-NAT está implicada en la síntesis de melatonina en los vertebrados y en la inactivación de aminas cerebrales en insectos (Smith, 1990), aunque se desconoce si aparte de su especificidad de sustrato estas enzimas AA-NAT poseen otras analogías a nivel molecular o en su regulación. La función principal de la A-NAT es la detoxificación de multitud de aminas exógenas, lo que explica su alta concentración y amplia distribución en distintos tejidos (Deguchi, 1992).

Las A-NAT forman un gran grupo de isoenzimas que muestran variantes específicas de cada tejido (Reeves *et al.*, 1991), e incluso dentro del mismo tejido pueden expresarse varias formas con especificidades de sustrato distintas. La A-NAT del hígado de mamíferos (y otras regiones de tubo digestivo) ha sido estudiada con mayor profundidad, presentándose al menos dos isoenzimas con especificidades de sustrato características (Heim *et al.*, 1991; Ogolla *et al.*, 1990). En la especie humana existe un polimorfismo genético para una de estas isoenzimas hepáticas, que se ha relacionado con la predisposición a padecer ciertos tipos de cáncer (Kirlin *et al.*, 1991; Blum *et al.*, 1990).

Una serie de estudios confirman la existencia de A-NAT en la pineal de los vertebrados (Voisin *et al.*, 1984), y en el resto del sistema nervioso del pollo (Ohtomi y Deguchi, 1990) y la rata (Gaudet *et al.*, 1991), presentando una actividad moderada en la retina. En estos estudios se ha utilizado p-fenetidina para la valoración de la A-NAT en el sistema nervioso, debido a que esta amina es el sustrato más general para todas las isoenzimas de A-NAT descritas (Ohsako y Deguchi, 1990), y en especial la A-NAT cerebral muestra una alta afinidad por este sustrato (K_M 22 μ M Ohtomi y Deguchi, 1990),

comprobandose que esta enzima es incapaz de acetilar arilaquilaminas (Ohtomi *et al.*, 1990). La función de la A-NAT en el sistema nervioso posiblemente esté relacionada con la metabolización de aminas endógenas no identificadas en la actualidad (Gaudet *et al.*, 1991).

Las dos actividades NAT estudiadas en la glándula pineal, y aisladas por métodos cromatográficos pueden diferenciarse por una serie de características distintivas, la A-NAT no muestra una oscilación diaria, y tampoco responde a agentes estimulantes de la AA-NAT como el isoproterenol, o tratamientos depresores como la cicloheximida o la denervación de la glándula (Voisin *et al.*, 1984). Recientemente, se ha demostrado la falta de semejanza a nivel inmunológico entre ambas formas de NAT en el conejo (Heim *et al.*, 1991).

En esta Memoria hemos utilizado p-fenetidina como sustrato para los estudios realizados sobre A-NAT en la retina de *R. perezi*. La A-NAT muestra una baja actividad (0,5-1 nmol/h/mg prot) en comparación con la descrita para otras especies, como por ejemplo en la retina de pollo (300 nmol/h/mg prot; Ohtomi y Deguchi, 1990), lo que indica que en el caso hipotético de que esta enzima fuese capaz de acetilar triptamina, cuantitativamente dicha contribución sería mínima.

La A-NAT es mucho menos dependiente del pH del tampón del ensayo que la AA-NAT, detectándose actividad en el intervalo 6-8. Parece ser que el pH óptimo para la actividad de esta enzima depende del estado de ionización de la amina, las arilaminas son bases muy débiles con pK_a en torno a 3-5, lo que significa que se encuentran sin carga a pH fisiológicos (Mattano *et al.*, 1989), por el contrario las arilaquilaminas son bases moderadamente fuertes, por ejemplo la serotonina posee un pK_a de 9,8, lo que quiere decir que a pH neutros se encuentra protonada dificultando la acción de la A-NAT sobre ella. Concretamente, sólo se conoce con certeza un caso en que una A-NAT puede acetilar de forma significativa serotonina, corresponde a la enzima hepática de paloma que muestra un pH óptimo de 9,5 para esta indolamina (Mannens *et al.*, 1990).

La cinética de la A-NAT de la retina de *R. perezi* muestra un perfil hiperbólico, cuya constante K_M es 11 μM . Este valor coincide con lo descrito para la A-NAT de la glándula pineal de pollo (K_M 10-20 μM ; Ohtomi *et al.*, 1989), presentando valores ligeramente superiores en los mamíferos (rata 270 μM , oveja 380 μM ; Voisin *et al.*, 1984).

Ante la cuestión de si la A-NAT presente en los órganos productores de melatonina puede acetilar indolaminas *in vivo*, una serie de características enzimológicas distintivas entre la actividad NAT global valorada durante el día y durante la noche (Binkley, 1983), serían evidencias indirectas que podrían apoyar esta hipótesis, por ejemplo el efecto protector del

EGTA observado en la glándula pineal de rata y pollo sobre la NAT nocturna no se manifiesta en la actividad enzimática valorada durante el día (Rodríguez-Cabello, 1990). Por otra parte, la NAT diurna de la glándula pineal de rata presenta un pH óptimo distinto al de la NAT nocturna (Friedhoff y Miller, 1977).

En el caso de la retina de *R. perezi*, hay una serie de hechos en contra de la acetilación de arilalquilaminas por parte de la A-NAT. Entre los criterios cinéticos que apoyan la hipótesis de que la triptamina es acetilada exclusivamente la AA-NAT, destacamos la linealidad de la representación de Lineweaver-Burk respecto a la concentración de triptamina (Fig. 4b y 6b) y la constancia en el cociente entre la actividad NAT medida a dos concentraciones de sustrato en dos momentos distintos del ciclo diario (Fig. 8a y b), lo que indica que en el ensayo se está valorando sólo una enzima.

Sin embargo, estos criterios cinéticos utilizando un sólo sustrato tienen el inconveniente de que sólo son capaces de diferenciar dos enzimas si sus constantes cinéticas son muy diferentes, pero esto no podría demostrarse si las diferencias en sus respectivas K_M fueran menores a un orden de magnitud (10 veces).

Por otra parte, cuando en homogeneizados de retina de rana se utilizan dos sustratos que teóricamente son específicos para cada una de las dos formas de la NAT (triptamina y p-fenetidina), se obtiene una oscilación día-noche típica de la actividad AA-NAT, mientras que la A-NAT no muestra diferencias día-noche. Además, no existe correlación significativa entre la actividad valorada con las dos aminas en la misma muestra. Por último, el test de la aditividad indica que cada amina es acetilada única y exclusivamente por una enzima, como sucede en la glándula pineal de rata (Voisin *et al.*, 1984). Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, podemos afirmar que utilizando triptamina en el ensayo, únicamente se valora la actividad AA-NAT ocular.

Además de las diferencias entre la A-NAT y la AA-NAT en cuanto a la especificidad de sustrato y a los requerimientos en el pH, estas dos enzimas son también distintas en cuanto al mecanismo de catálisis.

El mecanismo catalítico de la AA-NAT parece ser de tipo ordenado (Morton, 1986b), para que tenga lugar la reacción se necesita la formación de un complejo intermedio entre la enzima y los dos cosustratos simultáneamente. En cambio, la A-NAT muestra una cinética de tipo ping-pong o de doble desplazamiento (Cribb *et al.*, 1991; Andrés *et al.*, 1988; Blum *et al.*, 1990), es decir, nunca se unen los dos sustratos a la enzima de forma simultánea,

en primer lugar el centro activo resulta acetilado por la AcCoA en un residuo Cys (Andres *et al.*, 1988), y tras la liberación del resto CoA, se une la amina para ser acetilada. Cinéticamente, se detecta este mecanismo con la aparición de líneas paralelas en la representación de Lineweaver-Burk a medida que aumenta la concentración del cosustrato (Kilbane *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados estudiando la inhibición aparente de la serotonina sobre ambas actividades AA-NAT y A-NAT en la retina de *R. perezii*, cuando éstas se valoran utilizando triptamina y p-fenetidina, respectivamente, corroboran las diferencias cinéticas entre ellas. En este tipo de estudios el valor estimado de la K_i puede ser considerado como una medida de la capacidad de la serotonina para actuar como sustrato alternativo de cada una de las dos enzimas. Este tipo de análisis se utilizó en el método original que describía el ensayo de NAT en la glándula pineal de rata para comprobar que tanto la triptamina como la serotonina eran acetiladas por la misma enzima (Deguchi y Axelrod, 1972).

La K_i para la A-NAT es muy superior comparada con el valor de esta constante calculada para la AA-NAT, indicando que la serotonina es un sustrato muy pobre para la A-NAT en comparación con la p-fenetidina. El valor de la K_i para la AA-NAT es similar al valor de la K_M para la serotonina, confirmando la idea de que la serotonina es un sustrato específico únicamente para la AA-NAT.

DESARROLLO ONTOGENICO DE LA NAT OCULAR.

El número de trabajos dedicados al estudio de la aparición de la síntesis rítmica de melatonina durante la ontogenia es muy escaso y están referidos la mayoría de ellos a la glándula pineal de los mamíferos.

Los mamíferos constituyen un caso especial dentro de los vertebrados debido a la estrecha relación que tiene el feto respecto a la madre. Durante la gestación la melatonina materna atraviesa la placenta (Zemdegs *et al.*, 1988), sirviendo de señal química para los receptores de melatonina situados en el sistema nervioso del feto (Carlson *et al.*, 1991). Durante los primeros días de vida extrauterina la leche, con vehículo de la melatonina materna hacia el neonato, sigue manteniendo esta conexión materno-fetal (Duncan *et al.*, 1986). Debido a estas razones, el desarrollo de la síntesis de melatonina en el recién nacido se encuentra muy retrasado respecto a otros vertebrados.

En los roedores aparece en primer lugar el ritmo de NAT y el ritmo de melatonina durante la primera semana de vida (Klein *et al.*, 1981), antes de que la retina muestre una respuesta a la luz (Torres y Lytle, 1990). La aparición de este ritmo en la glándula pineal es anterior al desarrollo de la innervación simpática de la glándula (Kaufman y Menaker, 1991), luego el ritmo del neonato está determinado por la influencia de la madre (Deguchi, 1975a). En la especie humana el ritmo de melatonina aparece tardíamente, a los tres meses de edad (Attanasio *et al.*, 1986).

En el pollo, las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de melatonina aparecen durante la última semana de incubación (HIOMT, Bernard *et al.*, 1991; NAT Zeman y Illnerová, 1990), en la glándula pineal en primer lugar, y 24 horas después en la retina (Iuvone, 1990). En el día 20 de desarrollo aparece un ritmo claro tanto de melatonina (Zeman *et al.*, 1992) como de NAT (Iuvone, 1990) en la retina, coincidiendo con la aparición de la respuesta ocular a la luz (Zeman *et al.*, 1992). Tras la eclosión, las actividades enzimáticas aumentan muy rápidamente durante las primeras semanas de vida, alcanzándose en muy poco tiempo el perfil típico del animal adulto (Bernard *et al.*, 1991; Iuvone, 1990).

Los primeros estudios realizados sobre el origen ontogénico de la melatonina en los anuros se realizaron en los años setenta con *X. laevis*, utilizando técnicas espectrofluorimétricas para medir este indol. Estos autores encontraron un incremento en el contenido de melatonina en el estado 41-42 (Baker, 1969), conteniendo los ojos laterales entre 75-90 % del total (Baker and Hoff, 1971). La aparición de la actividad HIOMT ocular tiene lugar más temprano, coincidiendo con el momento de la eclosión (Baker *et al.*, 1965).

El presente estudio es el primero que muestra la ontogenia del ritmo de NAT ocular en diferentes especies de anfibios anuros. En el primer estadio elegido para la determinación de la NAT, inmediatamente después de la eclosión, no se apreció una diferencia día-noche estadísticamente significativa en los niveles de NAT de *R. perezi*, ni en *X. laevis*. Estudios morfológicos realizados en esta misma etapa del desarrollo indican que los fotorreceptores de la retina ya presentan segmentos externos (Nilsson, 1964) conteniendo los componentes de la cascada visual (Korf *et al.*, 1989), además desarrollan una respuesta eléctrica a la estimulación luminosa, aunque el mensaje eléctrico no se propaga aún a otras células de la retina (Nilsson y Crescitelli, 1970). Por tanto, cabría esperar que en este estado de desarrollo la retina de anuros fuera capaz de sintetizar melatonina, sin embargo hay que tener en cuenta

que el número de fotorreceptores es escaso (Nilsson, 1964), lo que explicaría la no detección del ritmo de NAT en esta etapa tan temprana.

Un auténtico ritmo día/noche de NAT aparece por primera vez en el estado 25 (G) en *R. perezi* y en el 43-44 (NF) en *X. laevis*. En esta etapa ya se puede distinguir morfológicamente los conos de los bastones (Korf *et al.*, 1989), los contactos sinápticos desde el fotorreceptor hasta el techo óptico se encuentran desarrollados (Grürn, 1982), observándose respuesta electrofisiológica a estímulos luminosos en el nervio óptico (Nilsson y Crescitelli, 1970; Marc, 1986).

Si se compara el perfil rítmico de la NAT en esta etapa inicial con el ritmo encontrado en los estados de desarrollo posteriores, se observa que los valores diurnos son más elevados al principio, mientras que el máximo nocturno es similar (ver Tabla V). Esta diferencia posiblemente se deba a que las células amacrinas dopaminérgicas se desarrollan tarde en la retina de los anuros (estados 44-46 en *Xenopus*, Sarthy *et al.*, 1981 y 26 en *Rana*, Reh? y Tully, 1986 @D-160), por lo cual el papel depresor de esta catecolamina en el ritmo de NAT demostrada en los adultos por Iuvone (1986b) no tendría lugar en esta etapa, justificándose así los relativamente altos niveles diurnos.

En el resto de los estados estudiados, no se observan grandes cambios cualitativos en el patrón rítmico de la actividad NAT, aunque parece ser que el proceso de metamorfosis provoca cambios cuantitativos, reduciendo considerablemente los niveles de la actividad NAT tanto para *R. perezi* como para *X. laevis*.

Se ha intentado sistematizar las formas de los perfiles rítmicos de MEL y la NAT con el fin de buscar correlaciones entre éstos y sus posibles funciones. Como puntos descriptivos del ritmo se consideran el momento del máximo dentro de la fase oscura del ciclo, y las pendientes que delimitan el pico, (Illnerová, 1992).

El perfil rítmico de la NAT observado en esta Memoria resulta ser muy variable dependiendo de la especie de anuro estudiada. Se pueden observar características similares entre *R. perezi* y *B. calamita*, ambos muestran el máximo en la primera mitad del periodo obscuro, lo que implica un ascenso muy rápido en la actividad NAT y un descenso progresivo durante el resto de la noche. Este tipo de ritmo no se ha descrito para ninguna especie de mamífero, aunque sí se ha encontrado en otros poiquiloterms (reptiles, *Terrapene* (Vivien-Roëls, 1988). Sin embargo, *D. pictus* y *X. laevis* muestran el pico de la actividad

NAT en la segunda mitad del periodo nocturno, pudiendose asimilar al perfil rítmico característico de la mayoría de los mamíferos.

Estos diferentes patrones descritos podrían representar posibles relaciones filogenéticas entre una especie y su ritmo de NAT. *D. pictus* y *X. laevis* son representantes muy antiguos dentro de los anuros (suborden *Archaeobatrachia*), en cambio los géneros *Rana* y *Bufo* corresponden a las ramas filogenéticas más modernas (suborden *Neobatrachia*; Duellman y Trueb, 1986). La zona climática de donde proceden las especies estudiadas también podría constituir un factor que determine las características cronobiológicas del ritmo de la NAT ocular. Mientras que *X. laevis* es un anuro tropical de origen africano, las otras especies habitan en la zona templada. En este sentido, el perfil de *X. laevis* muestra una característica distintiva respecto a las otras especies, su actividad NAT durante el día es casi indetectable, en contraposición a los anuros de la zona templada. Aunque con el nivel de conocimientos actualmente disponibles resulta muy especulativo relacionar las características del ritmo de NAT con el ambiente que ocupan las distintas especies, es una hipótesis atractiva plantear a la melatonina y su regulación a través de los ritmos de NAT como elementos adaptativos de los animales frente a los cambios estacionales.

La melatonina ha sido relacionada con acciones sobre el crecimiento de varias especies de anfibios (*R. ridibunda*, *D. pictus*, y *X. laevis*, Delgado *et al.*, 1984, 1987) y sobre la metamorfosis (Wright *et al.*, 1988, 1991; Burns *et al.*, 1987), implicando a este metoxindol en la acción del fotoperiodo sobre estos procesos del desarrollo de larvas de anuros. En principio, los perfiles de mamíferos se clasificaron en tres tipos (Reiter, 1991):

ESTACIONALES

En el presente estudio se ha caracterizado la evolución estacional de los perfiles diarios de la actividad NAT y la producción de melatonina por la retina de *R. perezii*. En la evolución estacional de la síntesis de melatonina en vertebrados son varios los factores ambientales que a priori pueden intervenir, de ellos el más evidente es la duración del fotoperiodo, ya que los órganos que sintetizan melatonina responden a la información luminosa, no obstante es imprescindible considerar el papel que la temperatura puede desempeñar, al ser éste un parámetro ambiental que experimenta cambios importantes a lo largo de las estaciones en las zonas templadas del planeta. Analizaremos por separado los efectos de estos dos factores ambientales sobre la MEL ocular y la actividad NAT.

Los ritmos de MEL en *R. perezii* muestran la máxima oscilación en verano, siendo totalmente anulados en invierno. Una respuesta similar se ha descrito para la pineal de poiquilotermos (*Testudo*: Vivien-Roëls et al., 1979; *Salmo*: Birks and Ewing, 1986). En un estudio estacional anterior realizado en nuestro laboratorio en la misma especie de anuro se han obtenido resultados similares en los ritmos de melatonina en ojos, pineal y plasma (Delgado y Vivien-Roëls, 1989). Sin embargo, en los mamíferos en condiciones naturales se ha descrito una evolución opuesta, niveles de melatonina menores (Brainard et al., 1982), o ausencia de ritmo diario en verano (Eloranta et al., 1992).

La correlación clásica entre extensión de la fase oscura y la duración del máximo nocturno en los niveles de MEL descrita para numerosas especies de vertebrados, se observó también en *R. perezii*. La duración de los niveles elevados de melatonina ocular es muy similar en primavera y verano (con fotoperiodos muy parecidos), en cambio en otoño dicha duración aumenta, coincidiendo con el mayor número de horas de oscuridad en esta época. En este sentido, se ha propuesto que la duración del pico está controlada por dos osciladores endógenos independientes, que controlarían específicamente el aumento y el descenso nocturno (Illnerová y Vaněček, 1983). Experimentalmente, se ha comprobado que el tiempo necesario desde el comienzo de la oscuridad hasta que se produce el máximo nocturno se conserva en hamster, independientemente del fotoperiodo (Steinlechner et al., 1987). La constancia de la acrofase en el ritmo de MEL ocular de *R. perezii*, dos horas antes de medianoche, apoya esta hipótesis.

No obstante, en algunos trabajos el cambio del fotoperiodo también implica cambios en la amplitud del ritmo de MEL (*Felis*: Leyva et al., 1984; *Macropus*: McConnell et al., 1985). El hamster europeo (*Cricetus cricetus*) constituye el caso extremo, fotoperiodos largos, propios de primavera y verano, anulan el ritmo de melatonina y de la actividad NAT en la glándula pineal (Pévet et al., 1989). Conviene tener en cuenta que esta especie tiene un pico de melatonina del tipo 2, es decir, hay un periodo de latencia nocturna anterior a la aparición del pico, en fotoperiodos largos este periodo de latencia puede ser tan largo como la fase oscura, por lo que el ritmo de melatonina no llega a expresarse.

En la regulación de la amplitud del pico nocturno de MEL, la temperatura se ha propuesto como un factor esencial, desempeñando funciones netamente distintas dependiendo del grupo animal. En *R. perezii* la amplitud del pico nocturno muestra una correlación positiva con la temperatura ambiental, como ha sido descrito en otras especies de

poiquilotermos (Vivien-Roëls et al., 1979, 1988; Menaker and Wisner, 1983; Firth et al., 1991; Firth et al., 1989 M-548; Rawding y Hutchison, 1992), el ritmo desaparece totalmente a temperaturas bajas (*Anolis*, Underwood y Calaban, 1987; Delgado y Vivien-Roëls, 1989). Este efecto de la temperatura baja inhibiendo el pico de melatonina aparece también en los mamíferos, pero sólo cuando abandonan su condición de homeotermia, por ejemplo durante la hibernación (*Marmota* (Florant et al., 1984) hamster (Darrow et al., 1986; Vanecek et al., 1984). En cambio, cuando los mamíferos no están en hibernación, la temperatura baja normalmente tiene un efecto estimulador sobre la MEL (Stokkan et al., 1991). Este efecto agudo del frío se ha relacionado con una activación de sistema simpático inducida por el estrés térmico, lo que aumenta la liberación de noradrenalina, y la consecuente estimulación de la síntesis de melatonina a través de receptores β y $\alpha 1$. Sin embargo, en aves se produce la respuesta contraria, reducción que posiblemente se deba a la NA actuando sobre receptores $\alpha 2$ (*Coturnix*, Lee et al., 1990). En esta misma especie también se ha mostrado un aumento de la MEL ocular como respuesta al frío, aunque se desconoce a través de que mecanismo se produce (Lee et al., 1989).

Nuestro resultados confirman la hipótesis previamente sugerida para otras especies de poiquilotermos (Vivien-Roëls, 1985; Vivien-Roëls et al., 1988), la temperatura determina la altura del pico nocturno de melatonina, mientras que la longitud del fotoperiodo determina el periodo de tiempo durante el cual estos niveles se encuentran elevados en la retina de *R. perezii*.

El único estudio sobre la variación estacional de la actividad NAT en poiquilotermos se ha realizado en la glándula pineal de *Salmo gairdneri*, no apareciendo cambios estacionales en los niveles de esta enzima (Morton y Forbes, 1988). En mamíferos, la evolución estacional de la actividad NAT muestra un estrecho paralelismo con los niveles de MEL. Sin embargo, nuestros resultados muestran una situación totalmente contraria para *R. perezii*, la temperatura baja durante el invierno induce un aumento de la actividad NAT diurna y nocturna, aunque esta mayor actividad enzimática no se correlaciona con una mayor producción de MEL. En verano, los niveles medios de NAT están reducidos, pero la amplitud tanto del ritmo de NAT como de MEL es máxima.

La discrepancia entre síntesis de melatonina y actividad NAT podría deberse a una alta sensibilidad térmica de la enzima, lo que impediría una catálisis efectiva a temperatura baja. También es necesario considerar el efecto de la temperatura sobre otros pasos de la ruta

de la síntesis de melatonina, como por ejemplo la formación de serotonina, u otras actividades enzimáticas, como la triptófano hidroxilasa o la HIOMT. Esta última enzima no muestra ritmo diario en la retina de rana a temperatura constante, pero en cambio cuando se encuentra sometida a un descenso nocturno de la temperatura, aparece un incremento en la actividad HIOMT al comienzo de la fase oscura (Eichler y Moore, 1975), coincidiendo temporalmente con el máximo de melatonina encontrado por nosotros.

En los mamíferos la actividad NAT de la pineal parece ser un buen índice para estimar la síntesis de melatonina, aunque en algunas especies como en hamster (Steinlechner *et al.*, 1984) el máximo nocturno de melatonina tiene lugar antes que para la NAT, o en oveja donde factores que afectan a la NAT no modifican la producción de melatonina y viceversa (Van Camp *et al.*, 1991). En nuestro caso, la retina de *R. perezi* presenta el mismo hecho, la melatonina asciende rápidamente durante la noche mostrando el máximo entre una y dos horas antes que la actividad NAT (ver Tablas VI y VII). Hipótesis de la amplitud, pero posiblemente sea el modo de acción de la melatonina más probable en poiquiloterms, debido a que en estos vertebrados la variación del ritmo de melatonina como respuesta a los factores ambientales se basa principalmente en cambios en la concentración, siendo en comparación los cambios en la duración del pico mucho menores.

La regulación dual (mediante el fotoperiodo y temperatura) de la síntesis de melatonina podría tener un significado adaptativo. En anfibios, la función de la melatonina con mayor soporte experimental es su papel como factor antigonadotrópico regulando la función ovárica y testicular (Delgado *et al.*, 1983; Alonso-Bedate *et al.*, 1988). La atresia ovárica, que se sabe esta promovida por la melatonina (Alonso-Gómez *et al.*, 1990), tiene lugar durante el verano cuando los niveles de melatonina son máximos pero la duración del pico es menor, señalando hacia la hipótesis de la amplitud como más probable en esta especie.

Los resultados obtenidos en los experimentos de aclimatación térmica, apoyan la hipótesis de que las diferencias estacionales observadas en los niveles de NAT en retina de *R. perezi* se deben a la temperatura ya que en este experimento el fotoperiodo (12L:12D) fué el mismo en los dos grupos. La reducción de los niveles de actividad NAT en los grupos aclimatados en calor, determina la existencia de un fenómeno de compensación térmica para esta enzima. Además, la pendiente positiva que muestra la respuesta crónica a la aclimatación

(línea discontinua Fig. 32) indica que dicha compensación es parcial, es decir, que aunque la cantidad de enzima se ha reducido dicha reducción no es suficiente como para compensar el descenso de actividad enzimática debida a la temperatura baja. Procesos de compensación parcial se han descrito para numerosas enzimas sin embargo los mecanismos de compensación completa (Gil y Barja de Quiroga, 1988) están mucho menos extendidos.

De forma general, el tipo de compensación que desarrollan durante la aclimatación depende del intervalo de temperaturas utilizado, una misma enzima puede mostrar compensación a temperaturas correspondientes al intervalo de variación térmica anual durante el periodo de actividad del animal, y a temperaturas inferiores mostrar una compensación inversa (Hazel y Prosser, 1974). Este mecanismo se ha relacionado con la adaptación a la hibernación, con el fin de que el animal reduzca su metabolismo al máximo en épocas de inactividad o reposo. La desaparición total de la síntesis de melatonina ocular en *R. perezi* durante el invierno, podría inducir a pensar que la NAT, como enzima responsable de su síntesis, mostrase un fenómeno de compensación inversa en esta época del año, sin embargo, tanto los datos estacionales con el experimento de aclimatación no confirman este planteamiento, sino que se observa un fenómeno de compensación parcial de la enzima, que significa que altos niveles de NAT no se traducen en altos niveles de melatonina. Por lo que una vez más, nuestros resultados llevan a concluir que no es la cantidad de NAT la única responsable en la síntesis rítmica de melatonina, sino que otros factores deben intervenir activamente.

Comparando exclusivamente la actividad enzimática medida a distintas temperaturas no se puede concluir si la aclimatación térmica produce cambios cuantitativos o cualitativos en la enzima. La respuesta aguda de cada grupo de aclimatación a la temperatura puede considerarse como un índice de la sensibilidad térmica de la enzima. Cuando las pendientes de las respuestas agudas comparando distintos grupos de aclimatación son distintas, significa que durante el tiempo de aclimatación se han producido modificaciones en alguna de las características enzimáticas (por ejemplo la sensibilidad térmica de la K_M o cambios en su energía de activación). En este sentido, una posible estrategia adaptativa frente a la temperatura es la existencia de varias isoenzimas térmicamente distintas, como se ha descrito en ciertas especies de salmónidos (Baldwin, 1971) y anuros (Barja de Quiroga *et al.*, 1985; Gil y Barja de Quiroga, 1988). No obstante el fenómeno de las isoenzimas como estrategia adaptativa está muy poco extendido en el reino animal, probablemente debido a problemas de índole genético, ya que se necesita que las especies tengan un origen poliploide (como

sucede en los salmónidos y en algunas ranas verdes europeas, (Tunner y Heppich-Tunner, 1991). *R. perezi* es un buen candidato para localizar isoenzimas como mecanismo de adaptación térmica, sin embargo, el paralelismo obtenido entre las rectas de aclimatación correspondientes a nuestros grupos experimentales descartan esta posibilidad para la NAT.

Se concluye pues, que el efecto de la aclimatación se debe fundamentalmente a cambios en la cantidad de enzima (representado por la V_{max}), y no debido a cambios de las características cinéticas de la enzima, por ejemplo, en su afinidad por el substrato AcCoA.

Aunque también se han descrito efectos directos de la temperatura en la glándula pineal en cultivo de lucio (*Esox lucius*; Falcón y Collin, 1989), reduciéndose la actividad NAT para temperaturas superiores al óptimo para esta especie (20°C).

El caso concreto de la actividad NAT de *R. perezi* las respuestas agudas de esta enzima a la temperatura del ensayo son totalmente paralelas (como también se refleja en los del coeficiente Q_{10} , ver Tabla XII). Además, tampoco aparecen cambios en el valor de la K_M . Se puede concluir que, la temperatura cambia exclusivamente la cantidad de enzima, sin modificar sus características enzimáticas. En este sentido se sabe que el frío es un estimulador de síntesis general de proteínas en poiquiloterms (Hazel y Prosser, 1974).

La comprensión de como la temperatura puede afectar la síntesis de melatonina a través de la NAT, además de conocer como este factor ambiental modifica la cantidad de la enzima, debe incluirse estudios sobre la dependencia de las características cinéticas con la temperatura. Este es el primer estudio que muestra la acción de la temperatura sobre la cinética de la NAT en anfibios.

Los hechos más importantes a destacar de la temperatura sobre las constantes cinéticas de la NAT de retina de *R. perezi*, es su dependencia respecto a este factor ambiental, tanto para la AcCoA como para la triptamina, el incremento de la temperatura provoca una subida en el valor de la V_{max} y la K_M , mostrando un coeficiente de temperatura Q_{10} muy elevado (superior a 2,5 ver Tabla IX). El incremento de la K_M y la V_{max} es exponencial en el intervalo de temperaturas ensayado, como puede observarse por la linealidad de de representación de Arrhenius (Ver Fig. 28). En cambio, en la NAT de glándula pineal de rata se observa una discontinuidad en este tipo de representación a una temperatura de 30,5°C (Morton, 1982), la explicación dada en este trabajo para este comportamiento se basa en un hipotético cambio

de fase a esa temperatura crítica. En retina de *R. perezi* no aparece ningún cambio de fase asociado a la E_a o a ΔH_s , indicando una importante diferencia cualitativa entre la sensibilidad térmica de la enzima de mamíferos y anfibios.

Teóricamente, la energía de activación es característica de cada enzima (Dixon y Webb, 1979), no influyendo la naturaleza química del sustrato, esto es cierto para la NAT de *R. perezi*, ya que no existen diferencias entre las correspondientes E_a calculadas para cada sustrato. En cambio, la energía de unión de cada cosustrato a la enzima es muy distinta, siendo más exotérmica, y por lo tanto más sensible térmicamente, la unión de la AcCoA que la de la triptamina. Las implicaciones funcionales de estas diferencias se desconocen.

El incremento de la K_M y la V_{max} con la temperatura (modulación térmica positiva) ha sido considerado como un tipo de estrategia adaptativa efectiva para proporcionar una compensación inmediata de la actividad catalítica frente a cambios rápidos de temperatura, ya que la aceleración de la reacción provocada por la subida de temperatura se contrarresta con una pérdida de afinidad por los sustratos.

Además de la NAT, otras enzimas del sistema nervioso de anuros muestran esta estrategia adaptativa, como por ejemplo la MAO (Ureña y Hall, 1982). Pero la extensión de este fenómeno en poiquiloterms es mucho más amplia, habiendo sido descrita para multitud de enzimas de las rutas bioquímicas encargadas en la generación de energía, como la glucólisis, ciclo de Krebs y cadena de transporte electrónico (Hazel y Prosser, 1974; Mendiola y De Costa, 1990).

La modulación térmica positiva indicaría que la actividad NAT sería independiente de la temperatura. Pero hay que tener en cuenta que la compensación inmediata sólo se produciría en concentraciones de sustrato bajas (no saturantes). Experimentalmente, se observa esta compensación en la NAT cuando se valora su actividad a concentraciones muy bajas de sustrato (AcCoA 12 μM , triptamina 10 μM ver Tabla IX).

En general, se considera que *in vivo* las enzimas trabajan con concentraciones de sustrato alrededor del valor de su K_M (Fersht, 1977), pero también hay excepciones a esta regla, apareciendo concentraciones endógenas de sustrato muy superiores al valor de esta constante cinética (Mendiola y De Costa, 1990). La concentración endógena de sustratos de la NAT en la retina se desconoce, luego la modulación térmica positiva no tiene por que implicar necesariamente una compensación inmediata en *R. perezi*.

Aunque la utilización de triptamina como amina en el ensayo de la NAT tiene ventajas metodológicas, hay que tener en cuenta que para los estudios cinéticos destinados a averiguar

el papel de la NAT en la regulación de la síntesis de melatonina *in vivo*, es preferible la utilización del sustrato endógeno, la serotonina, razón por lo cual se comparó el comportamiento cinético de la NAT ocular frente a la temperatura del ensayo utilizando dos aminos (triptamina y serotonina).

Cuando la NAT se caracteriza cinéticamente respecto a la concentración de serotonina cabe destacar la aparición de una inhibición asociada a altas concentraciones de serotonina. Este resultado puede deberse a la existencia de un contaminante que acompañe al sustrato y que inhiba la enzima (Dixon y Webb, 1979), aunque este podría ser nuestro caso ya que el sustrato utilizado es una sal de serotonina con creatinina, esta explicación queda descartada pues la creatina (que se transforma en creatinina en solución acuosa) no tiene ningún efecto sobre la actividad NAT.

Los estudios cinéticos de la NAT realizados en otras especies no muestran evidencias de una inhibición por la serotonina, excepto el trabajo realizado por Khoory y Schloot (1986) en la glándula pineal de rata, en el que se describe una inhibición similar, aparece aunque sólo para la NAT diurna. Aunque no se puede descartar que este mecanismo de inhibición por sustrato sea específico de determinados grupos animales, conviene hacer constar que posiblemente la inhibición no ha sido detectada debido a que la mayoría de los estudios se realizan utilizando triptamina como sustrato, o a que las concentraciones utilizadas se encuentran dentro del intervalo subinhibitorio.

La inhibición por sustrato comúnmente observada en las reacciones bisustrato con un mecanismo catalítico ordenado para la unión de los sustratos (como es el caso de la NAT, Morton, 1986b), se produce por un error en el orden de entrada de los sustratos. Si el sustrato que entra en segundo lugar en la catálisis normal, se une al centro activo antes de la unión del primer sustrato, el resultado final es un complejo ES inactivo, este parece ser el caso de la inhibición por sustrato de la HIOMT (Morton, 1986a). Pero para la NAT esta no puede ser la explicación debido a que la serotonina se une antes que la AcCoA (Morton, 1986b), posiblemente el efecto inhibitorio de la serotonina se deba a que a altas concentraciones impida la salida del centro activo de la CoA una vez transferido el grupo acetilo.

Cinéticamente, esto se traduce en que la serotonina muestra dos constantes de afinidad distintas, un lugar de baja afinidad cuando actúa como sustrato, y otro de afinidad mayor cuando actúa como inhibidor. Esta hipótesis del doble papel de la serotonina queda corroborada por la inhibición mixta que ejerce la serotonina cuando la actividad NAT se

valora con triptamina (ver Fig. 9a), la constante de inhibición competitiva ($K_i = 13,6 \mu\text{M}$) corresponde a la K_M de la serotonina ($11,1 \mu\text{M}$) por la NAT, mientras que la inhibición no competitiva ($K_i' = 1,6 \text{ mM}$) está de acuerdo con la constante de inhibición para la serotonina estimada en la caracterización a 25°C ($2,4 \text{ mM}$).

La inhibición de la NAT por el substrato se muestra dependiente de la temperatura de incubación y de la amina utilizada, la inhibición por la serotonina desaparece a temperaturas bajas, mientras que cuando se utiliza triptamina esta inhibición se conserva. Esta misma dependencia termal ha sido descrita para la HIOMT de la glándula pineal de *Salmo gairdneri* (Morton y Forbes, 1989) aunque la enzima homóloga de mamíferos no la presenta (Morton y Kock, 1990).

Observando la representación de Arrhenius respecto a la constante K_i , (Fig. 31b) es evidente que se produce un punto de inflexión a 25°C , transformándose la unión de la serotonina al sitio inhibidor de la enzima de endotérmica a temperaturas inferiores a 25°C a exotérmica para temperaturas superiores. Este cambio de fase en la constante de inhibición se ha descrito para otras enzimas como la fumarato hidratasa (Dixon y Webb, 1979) aunque las implicaciones en la función de esta última enzima no están claras.

Proponemos que la inhibición por substrato podría ser un mecanismo utilizado por la retina de rana para amplificar el ritmo diario de melatonina a partir del ritmo de NAT. Por un lado, la acción de la NAT, incrementada durante la noche, reduciría la concentración de serotonina, lo que reduciría la inhibición y como consecuencia la producción de melatonina resultaría aumentada por encima de la que sería esperable por el pequeño incremento nocturno de la cantidad de NAT. En apoyo de esta hipótesis, la serotonina en la glándula pineal muestra un perfil invertido o adelantado respecto al ritmo de melatonina tanto en pioquilotermos (Mahapatra *et al.*, 1986; Vivien-Roëls *et al.*, 1979) como mamíferos (Mefford *et al.*, 1983). Este mecanismo podría explicar la diferencia de amplitudes noche/día observadas entre la melatonina (15-20 veces y la NAT (1,5-2 veces) de rana en verano (ver Tablas VI y VII).

La oscilación diaria de la temperatura (o termociclo), que se ha demostrado que interviene en la síntesis de melatonina de otras especies (Underwood y Calaban, 1987), también podría influir en la síntesis de melatonina de *R. perezii* a través de la cinética de inhibición de la NAT, debido a la influencia de temperatura sobre la K_i y la concentración óptima de la serotonina (S_{opt}) para la NAT. Este efecto influiría más claramente en el intervalo de temperaturas del verano en el habitat natural de los animales), ya que la

inhibición máxima (K_i más baja) aparece a 25°C o ligeramente superior (correspondiente a la temperatura diurna), mientras que temperaturas ligeramente inferiores (20°C temperaturas nocturnas) la acetilación de serotonina se vería favorecida por una S_{opt} menor.

REGULACION ENDOGENA DE LA SINTESIS DE MELATONINA

El cultivo de la glándula pineal de mamíferos y aves ha sido ampliamente utilizado para la realización de estudios farmacológicos y cronobiológicos sobre la síntesis de melatonina. Puesto que uno de los objetivos de la presente Tesis era contribuir al conocimiento de la regulación endógena de la síntesis de melatonina ocular, nos planteamos la puesta en marcha de un modelo experimental *in vitro* para la retina de *R. perezi*.

La utilización del cultivo de tejidos de anfibios tiene una serie de ventajas e inconvenientes frente a los, comúnmente utilizados, tejidos de mamíferos (Rafferty, 1976). Las primeros son, por lo general, mucho más resistentes a alteraciones en las condiciones de cultivo, como por ejemplo, cambios en la presión osmótica del medio, siendo posible cultivar dichos tejidos de forma óptima en un intervalo de 120 a 290 mOsmoles, sin observar efectos negativos en la viabilidad celular. La principal ventaja del empleo de este tipo de tejidos es su carácter poiquilotermo, la utilización de temperaturas bajas en el cultivo mejora la solubilidad del O_2 y CO_2 en el medio, luego la posible necrosis tisular producida por hipoxia es menos frecuente, lo que permite cultivar fragmentos de órganos de gran tamaño. La temperatura inferior también simplifica el manejo de estos tejidos, ya que las características del medio se conservan durante más tiempo, y por tanto los cambios del mismo pueden espaciarse. A pesar de las ventajas expuestas, el cultivo de tejidos de anfibios no está muy extendido como modelo experimental (salvo los ovocitos de *Xenopus*), probablemente debido a la dificultad que conlleva la obtención de cultivos asépticos dado el carácter acuático de la mayoría de los anfibios, lo que complica inevitablemente la obtención de cultivos primarios libres de microorganismos (Rafferty, 1976).

Los tejidos de anfibios tienen unos requerimientos nutricionales similares a los de mamíferos y aves. Por regla general, se suelen utilizar los mismos medios de cultivo, aunque diluidos al 60-80% con respecto a la concentración en el cultivo de tejidos de mamíferos. Para el trabajo experimental realizado en nuestro laboratorio sobre el cultivo de copas ópticas de *R. perezi* se siguió el método descrito por Stamper y Licht (1990), utilizando un medio general de cultivo de tejidos (DME), que se ha preparado diluido en una proporción 2:3 respecto al método de preparación original. Además se incluyeron una serie de

modificaciones específicas para el cultivo de la retina, como la adición de ácido ascórbico (100 μ M) y la utilización de una concentración alta de bicarbonato (35 mM), que ha demostrado ser la óptima para el mantenimiento de la funcionalidad de la retina (Besharse y Dunis, 1983b).

Como primer paso, se ha de comprobar que las copas ópticas de *R. perezii* mantienen la capacidad de sintetizar melatonina en cultivo. La división de la copa óptica en fragmentos, aunque no afecta a la actividad NAT, reduce considerablemente la cantidad de melatonina liberada al medio. La glándula pineal de pollo en cultivo también manifiesta una influencia negativa consecuente a la manipulación del tejido, la división de la misma reduce la cantidad total de melatonina producida (Takahashi y Menaker, 1984), posiblemente debido a una reducción importante en el número de células viables.

Trabajos realizados con la retina de trucha demostraron que la retina neural aislada es capaz de sintetizar MEL a partir de serotonina (Gern y Ralph, 1979), en cambio en *R. perezii* la retina neural pierde dicha capacidad. Mantener un contacto directo entre el epitelio pigmentado y los fotorreceptores posiblemente resulte imprescindible, debido al papel desempeñado por dicho epitelio en el proceso de nutrición de los fotorreceptores *in vivo* (Clark, 1986).

En segundo lugar, ha de demostrarse que las copas ópticas conservan *in vitro* la ritmicidad en la síntesis de melatonina, y que son capaces de responder a estímulos externos. Las copas ópticas de *R. perezii* mantienen la síntesis rítmica de melatonina en cultivo durante al menos un ciclo completo de 24 horas, mostrando niveles superiores de melatonina en el medio durante la noche. El estímulo de la luz durante el periodo oscuro del fotociclo anula totalmente la síntesis de melatonina, reduciéndose también los niveles de NAT hasta alcanzar los valores diurnos, respuesta análoga a la observada en la retina de *Xenopus* (Iuvone *et al.*, 1987).

Esta ritmicidad y fotosensibilidad de la retina de *R. perezii* en cultivo, contrasta con la glándula pineal de mamíferos, la cual pierde estas propiedades en el momento que pierde su conexión con el sistema simpático, o por la extirpación del ganglio cervical superior (Reiter, 1991 Z-728) o por el cultivo de dicha glándula (Daya y Fata, 1986; Santana *et al.*, 1989).

En cambio la glándula pineal de aves sigue conservando su síntesis rítmica de melatonina en cultivo con un periodo de 24 horas (Riebman y Binkley, 1979; Deguchi, 1979), indicando el carácter circadiano del ritmo en esta glándula. Además existen evidencias

experimentales suficientes como para suponer que cada célula es en sí un oscilador endógeno debido a que la glándula fragmentada (Takahashi y Menaker, 1984), y el cultivo de pinealocitos disgregados coservan esta ritmicidad (Zatz *et al.*, 1988).

La glándula pineal de teleósteos también muestra las características propias de un ritmo circadiano, expresión en condiciones de oscuridad constante, y fotosensibilidad del ritmo (Falcón *et al.*, 1991).

En cuanto a los trabajos que indiquen la existencia de un oscilador endógeno en la retina son menos numerosos, *in vivo* el ojo separado del nervio óptico sigue mostrando la síntesis rítmica de melatonina en aves (Barret y Underwood, 1991) indicando que en estos vertebrados la melatonina ocular no depende de la conexión con el resto del sistema nervioso.

Las copas ópticas de *Xenopus* en cultivo muestran un ritmo circadiano en la actividad NAT, con unos valores de la actividad enzimática similares a lo observado *in vivo* (Besharse e Iuvone, 1983; Iuvone y Besharse, 1983). Estos resultados indican que la síntesis de melatonina ocular tiene una regulación autónoma respecto a la glándula pineal (Cahill y Besharse, 1990). En cambio, la localización del oscilador es más controvertida, el cultivo de fotorreceptores retinianos de pollo aislados (Iuvone *et al.*, 1990) y de las células de retinoblastoma humano (Janavs *et al.*, 1991) muestran que aunque estas células poseen la ruta de biosíntesis de melatonina intacta no presentan un ritmo endógeno. Estos resultados indicarían que es necesaria la conservación de la estructura retinal para la expresión del ritmo, y que en este caso el oscilador sería la retina completa (Cahill y Besharse, 1990), pero hay que tener en cuenta que las células anteriormente mencionadas puede que no representen las condiciones de los fotorreceptores *in vivo* ya que son células embrionarias o cancerosas, y el mecanismo de oscilación puede que no esté desarrollado. La solución a la incógnita de si los fotorreceptores de la retina poseen en si mismos el oscilador endógeno (analogamente a los pinealocitos de aves), sería posible si se dispusiera de un modelo experimental con fotorreceptores retinianos de animales adultos.

En todos los vertebrados estudiados hasta la fecha se ha demostrado que para la aparición del pico nocturno de melatonina tanto en la glándula pineal como en la retina es necesaria la síntesis proteica *de novo*, la adición de inhibidores de la transcripción o de la traducción anulan dicho ritmo (Riebman y Binkley, 1979; Deguchi, 1979; Janavs *et al.*, 1991; Besharse *et al.*, 1984). Además, la acción de la cicloheximida (inhibidor de la traducción) es más rápida que la acción de la actinomicina D (inhibición de la transcripción) (Iuvone *et al.*, 1990). Los resultados obtenidos con estos fármacos en copas ópticas de *R.*

perezi son análogos, posiblemente la permanencia de ARNm activo en la célula cuando se utiliza la actinovicina D explique porqué este fármaco tiene una acción más lenta, aunque igual de eficaz, respecto a la cicloheximida.

El modelo *in vitro* de las copas ópticas de *R. perezi* muestra una reproductibilidad aceptable, tanto en luz como en oscuridad, la actividad NAT de las copas ópticas coinciden con los valores determinados *in vivo*. Esta concordancia entre la situación *in vivo* e *in vitro* también se ha descrito para las copas ópticas de *Xenopus* (Besharse e Iuvone, 1983) y en glándula pineal de pollo (Wainwright y Wainwright, 1979).

En cuanto a la melatonina liberada al medio, los niveles basales de las copas cultivadas en luz son iguales o inferiores a 5 pg/ml en todos los cultivos, en cambio hay una variación mayor en los valores máximos de melatonina entre los distintos experimentos, que se explica por el distinto tamaño de los animales utilizados en cada experimento. En conclusión, el cultivo estático de copas ópticas de *R. perezi* es un modelo experimental válido para estudio farmacológicos sobre la neuroquímica de la retina, que se pueden realizar en un máximo de 12 horas. Para poder utilizar este método en estudios cronobiológicos sobre la ritmicidad endógena en este tejido sería necesario demostrar que el cultivo es viable al menos durante varios días.

En el control extracelular de la síntesis de melatonina en vertebrados está fundamentalmente realizado por las monoaminas. La validez de los resultados de los estudios farmacológicos depende de la utilización de agonistas y antagonistas específicos para estos compuestos dada la gran analogía estructural entre las distintas catecolaminas e indolaminas, y al gran número de subtipos de receptores de membrana existentes, en los últimos años ha habido un gran avance en este campo debido a la aparición de fármacos cada vez más específicos, lo que simplifica la interpretación de los resultados obtenidos.

En la glándula pineal de mamíferos y aves está demostrado que la regulación de la síntesis de melatonina se lleva a cabo principalmente, por un control adrenérgico procedente de la inervación simpática de la glándula. En mamíferos, el ritmo de melatonina (y de la actividad NAT) dependen de liberación nocturna de noradrenalina de los terminales sinápticos, lo que estimula la síntesis de melatonina. En los primeros trabajos, el receptor postsináptico implicado en esta respuesta es el subtipo β (Reiter, 1984), pero más adelante se demostró que la noradrenalina se une también a receptores de tipo $\alpha 1$ (Ho y Klein, 1987). La acción de la NA a través de este último receptor no es directa, debido a que es necesario

a activación conjunta de los receptores β y $\alpha 1$ para observar la acción sinérgica en la síntesis de melatonina. Recientemente, se ha descrito variaciones interespecíficas sobre este esquema general de la regulación dual, por ejemplo en oveja parece que la acción de la noradrenalina sobre los receptores $\alpha 1$ y β no es simultánea, el receptor β controla los niveles de MEL durante las horas centrales de la noche, correlacionándose con el incremento de la actividad NAT, en cambio el abrupto incremento de MEL durante las primeras horas de la noche se produce sin cambios en la NAT y están regulados exclusivamente por receptores del tipo $\alpha 1$ (Van Camp *et al.*, 1991). La serotonina, además de ser el precursor de la melatonina, puede actuar como un factor autocrino en la glándula pineal de mamíferos, esta indolamina puede liberarse del pinealocito y unirse a receptores específicos de tipo 5-HT₂ (Govitrapong *et al.*, 1991), la consecuencia de esto es una amplificación de la estimulación provocada por los agonistas β (Sugden, 1990).

En la glándula pineal de aves la regulación catecolaminérgica es distinta, la actividad máxima del sistema simpático en la glándula pineal de estos vertebrados está invertida respecto a los mamíferos, teniendo lugar durante el día, el receptor implicado en la regulación simpática es del subtipo $\alpha 2$ de carácter inhibitorio (Rudeen *et al.*, 1990; Pratt y Takahashi, 1987). También se han descrito receptores de tipo β cuya activación provoca un aumento de AMPc que no se traduce en una estimulación de la actividad NAT, posiblemente estos receptores se encuentren en las células pineales no productoras de melatonina (Voisin *et al.*, 1990). Junto al control catecolaminérgico, la adenosina puede ser considerada como un factor autocrino en la glándula pineal de pollo, este compuesto ejerce un acción doble, a bajas concentraciones es inhibitoria (a través de receptores A1) pero a concentraciones elevadas estimula la glándula pineal (receptores A2) (Falcón *et al.*, 1988).

Se conoce mucho menos sobre el control adrenérgico en la glándula pineal de los vertebrados poiquiloterms, los escasos trabajos realizados se refieren a pineal de teleosteos, donde la NAT resulta estimulada por agonistas β - (Falcón *et al.*, 1991) e inhibida por agonistas $\alpha 1$ (Falcón y Collin, 1989). El origen de la NA es incierto debido a que la glándula pineal de estos vertebrados no tiene inervación simpática, implicándose a las catecolaminas circulantes como responsables de la regulación de la glándula pineal (Falcón *et al.*, 1991).

En cuanto a la regulación en la retina las catecolaminas también están implicadas, principalmente la dopamina. Los agonistas D2 (quinpirol) reducen la actividad NAT en retina de *Xenopus* (Iuvone, 1986b), y de pollo (Zawilska y Iuvone, 1989). Los datos experimentales indican que la dopamina actúa directamente sobre el fotorreceptor, debido a que la

estimulación de la NAT inducida por forskolín y/o IBMX es contrarrestada por la dopamina, en cambio cuando se utilizan análogos del AMPc este efecto no se observa (Iuvone y Besharse, 1986c; Nowak *et al.*, 1990; Iuvone *et al.*, 1990). Esta acción directa sobre los fotorreceptores está también apoyada por el efecto sobre cultivo de fotorreceptores aislados donde no existen sinápsis funcionales entre las células (Iuvone *et al.*, 1990).

Los resultados obtenidos en *R. perezi* concuerdan con los anteriores, la dopamina reduce la actividad NAT y la melatonina liberada al medio por las copas ópticas a través de receptores D2, la especificidad de la respuesta queda demostrada por la acción antagónica de la sulpirida sobre el quinpirol en la melatonina sintetizada. Aunque el efecto inhibitor del SKF 38393 (agonista D1) sobre la melatonina podría indicar un papel importante por parte de este otro tipo de receptor dopaminérgico. Este hipotético control D1-dopaminérgico en la retina de *R. perezi* posiblemente no se realice directamente sobre el fotorreceptor ya que su actividad NAT no resultó modificada, sino más bien afectaría a otro paso en la ruta biosintética, como por ejemplo la captación de triptófano, en la que estaría implicado el epitelio pigmentado. En favor de esta hipótesis se conoce que agonistas D1 actúan sobre este epitelio de *Rana catesbeiana* promoviendo la situación típica diurna de los gránulos de pigmento, además de otros procesos celulares (Dearry *et al.*, 1990 F-335).

Se conoce que la luz es capaz de activar la liberación de dopamina en la retina (Boatright *et al.*, 1989), pero existe controversia sobre la ruta que sigue la información luminosa desde el fotorreceptor hasta las células dopaminérgicas en la retina interna. Por una parte, hay una serie de trabajos que implican al canal visual ON, las células bipolares ON (sensibles a APB) estimularían directamente las células amacrinas dopaminérgicas (Besharse, 1992; Besharse y Witkovsky, 1992; *Necturus* Dong y McReynolds, 1991). Pero por otra parte hay evidencias que sugieren que el canal visual OFF también tendría un papel destacado, en este caso se trataría de una vía indirecta, ya que las células bipolares OFF utilizarían una interneurona amacrina GABAérgica para suprimir de forma tónica la liberación de dopamina durante la noche (Boatright e Iuvone, 1989a y b; Witkovski y Dearry, 1992).

Durante los últimos años han ido apareciendo una serie de trabajos que discrepan del esquema rígido anteriormente descrito: un control adrenérgico en la glándula pineal y un control dopaminérgico en la retina (Zawilska e Iuvone, 1989). Se han descrito receptores dopaminérgicos (D1 y D2) en glándula pineal de mamíferos (Govitrapong *et al.*, 1989) y teleosteos (Brandstätter y Meissl, 1992), describiéndose además un efecto de esta

catecolamina sintetizada por células pineales distintas a los pinalocitos sobre la actividad NAT (Govitrapong *et al.*, 1989).

En la retina se están acumulando una serie de pruebas en favor de que la NA sea un neuromodulador retinal mostrando cambios diarios en su contenido (teleósteos Jaffé *et al.*, 1991; aves Siuciak *et al.*, 1992), que actuaría como un factor regulador del sistema dopamina-MEL de la retina. El origen de la NA está sujeto a debate, entre un origen intrarretinal en células amacrinas adrenérgicas, o un origen simpático (Hadjiconstantinou *et al.*, 1983).

Se ha demostrado que la noradrenalina inhibe la liberación de dopamina a través de receptores $\alpha 2$ (Witkovsky y Dearry, 1992), y que en retina de pollo puede que la noradrenalina tenga un papel regulador de la síntesis de melatonina (Lee *et al.*, 1989).

Los resultados obtenidos por nosotros sobre el control adrenérgico de la síntesis de melatonina en *R. perezii*, aparece un efecto de los fármacos específicos para los receptores β y $\alpha 1$ adrenérgicos, en ambos casos muestran un papel inhibitorio sobre la NAT y la síntesis de melatonina en cultivo. En cuanto a los trabajos realizados en otras especies, los resultados son contradictorios, mientras que en unos aparece un efecto inhibitorio de los agentes adrenérgicos sobre la NAT (Besharse *et al.*, 1984), en otros no se observa efecto alguno (Iuvone y Besharse, 1986c; Nowak y Zurawska, 1989). Estas diferencias quizás se deban a las distintas vías de administración, entre los experimentos de cultivo, y los experimentos *in vivo* (Zawilska e Iuvone, 1989).

De la acción directa de los agonistas β y $\alpha 1$ sobre el fotorreceptor cabría esperarse que estimularan la síntesis de melatonina (análogamente al efecto de estos fármacos sobre la glándula pineal de mamíferos), pero el resultado experimental es el contrario. La hipótesis más probable es que el efecto de estos agentes adrenérgicos sea indirecto, a favor de esta hipótesis están la descripción de receptores β en el epitelio pigmentado de la retina de pollo (Koh y Chader, 1984) y los resultados obtenidos de la utilización conjunta del isoproterenol y sulpirida en copas ópticas de *R. perezii*, el efecto antagónico de la sulpirida indica que los receptores β estarían activando la liberación de dopamina que a su vez inhibe la síntesis de melatonina de los fotorreceptores. En este último experimento, las copas ópticas muestran también una cierta acomodación a la presencia del agonista β , ya que tras seis horas de cultivo, el efecto inhibitorio del isoproterenol se encuentra muy reducido, y por contra, la sulpirida aumenta la melatonina producida cuando se admistra conjuntamente con isoproterenol (ver Fig. 44). Estos resultados indicarían una desensibilización de los receptores

β , característica comunmente presentada por los receptores β -adrenérgicos (Kobilka, 1992) y que tiene lugar en un intervalo de horas (Cooper, et al., 1991).

Por último, conviene mencionar que para asegurar la existencia del hipotético control adrenérgico sobre la síntesis de melatonina en retina de *R. perezi*, es necesario estudiar la evolución diaria de adrenalina y noradrenalina en la retina de esta especie, y completarlo con estudios de lesión neuronales utilizando neurotóxicos específicos contra células dopaminérgicas.

Los resultados obtenidos tras la adición de forskolin, muestran que el efecto inhibitor de la luz sobre la síntesis de melatonina ocular puede estar mediado por una reducción en los niveles de AMPc dentro de las células fotorreceptoras (ver Fig. 36). Esto explicaría los efectos en el mismo sentido que presentan la oscuridad y forskolin, ya que ambos factores incrementarían la cantidad de este segundo mensajero.

Aunque el forskolín es un diterpenoide muy utilizado en estudios sobre el sistema del AMPc debido a su alta capacidad para activar de forma directa la adenilato ciclasa de las eucariotas, se han descrito otra serie de acciones de este compuestos que no implican al AMPc (Laurenza *et al.*, 1989), por lo cual en el estudio de este mensajero intracelular es necesario la realización de experimentos complementarios con el fin de demostrar el efecto del forskolín sobre los niveles de AMPc.

La utilización directa del AMPc en estudio con células intactas se encuentra impedida por la baja capacidad de este nucleótido cíclico de atravesar las membranas biológicas, en su lugar se suelen utilizar compuestos de estructura análoga que han sido modificados con el fin de aumentar su liposolubilidad sin perder sus propiedades bioquímicas, entre los más utilizados está de dibutiril-AMPc que además posee la ventaja de ser más resistente a la degradación enzimática mediante fosfodiesterasas.

El efecto estimulador del análogo de AMPc sobre la actividad NAT y la síntesis de melatonina ha quedado demostrado en la retina de *R. perezi*, así como en otras especies (ver revisión Zawilska y Nowak, 1992). Pero para que estos efectos aparezcan es necesario utilizar concentraciones del orden milimolar (Iuvone y Besharse, 1983; Iuvone *et al.*, 1990; Iuvone, 1986b; Besharse *et al.*, 1984), mientras que las concentraciones endógenas de AMPc son unas mil veces menores (Barrit, 1992). Esta discrepancia en las dosis efectivas posiblemente se deba a que aunque el dibutiril-AMPc puede entrar en las células se necesitan dosis elevadas para conseguir concentraciones fisiológicas dentro de la célula (Hamm, 1990), capaces de activar la PKA (concentraciones de orden micromolar, Binder *et al.*, 1989).

La acción del AMPc sobre la actividad NAT, puede deberse a una activación de la enzima provocada por su fosforilación mediante la PKA, pero este efecto parece no tener relevancia, ya que la activación de la PKA en homogeneizados de retina de *Xenopus* no se traduce en un aumento de la actividad NAT (Iuvone y Besharse, 1986a). Es mucho más probable que el AMPc actúe sobre la expresión génica apareciendo un ritmo diario en la síntesis *de novo* de NAT (Iuvone y Besharse, 1983), y posiblemente de alguna otra enzima de la ruta biosintética de la MEL como la TPH (Thomas e Iuvone, 1991; Ehret *et al.*, 1991). Esto también explicaría los efectos de la actinomicina D y de la cicloheximida observados.

Posiblemente el ritmo diario de la síntesis de NAT sea endógeno, debido a que las copas ópticas de *Xenopus* son refractarias a la adición de análogos de AMPc durante la fase de luz, no observándose ningún efecto (Iuvone y Besharse, 1983).

De los resultados anteriores se puede sugerir que la luz y la oscuridad regulan el ritmo de MEL mediante modificaciones en los niveles de AMPc, pudiendo estar implicadas tanto la síntesis como la degradación de este mensajero intracelular. El IBMX es un inhibidor general de PDE, capaz de inhibir todas las isoformas de esta enzima descritas hasta la fecha (Thompson, 1991). La acción del IBMX parece ser compleja, ya que incluye una inhibición competitiva y no competitiva al mismo tiempo (Barritt, 1992).

La activación de la adenilato ciclasa (mediante forskolín) y la inhibición de las PDE (IBMX) de forma simultánea tiene como consecuencia una estimulación sinérgica en la cantidad de melatonina producida por las copas de *R. perezi*, esto se explica debido a que ambos fármacos actúan a niveles distintos pero sus consecuencias finales son las mismas, incremento en los niveles de AMPc. Este efecto sinérgico también se ha descrito en copas ópticas de *Xenopus* (Iuvone y Besharse, 1986a), glándula pineal de pollo en cultivo (Deguchi, 1979; Riebman y Binkley, 1979; Wainwright y Wainwright, 1984) y en fotorreceptores de la retina aislados (Iuvone *et al.*, 1990).

La luz probablemente no solo actúe deteniendo la síntesis de AMPc, el hecho de que la adición de IBMX a copas *R. perezi* cultivadas en luz provoque por sí sola una estimulación en la síntesis de MEL indicaría una degradación de AMPc regulada directamente por la luz, como ha sido previamente demostrado en la retina (Miki *et al.*, 1973).

Concluimos, pues que la luz como inhibidor de la producción de MEL desarrollaría un efecto doble sobre los niveles intracelulares de AMPc, una reducción de su síntesis mediante la inhibición de la adenilato ciclasa, y una activación de su hidrólisis por medio de las fosfodiesterasas.

El otro gran sistema de nucleótidos cíclicos (GMPc) parece tener una importancia menor sobre la síntesis de MEL, aunque dentro del fotorreceptor cumple la función de mensajero químico del proceso de fotorrecepción. En las copas ópticas de *R. perezi*, la adición del análogo lipófilo de GMPc tiene un ligero efecto estimulador sobre la MEL producida en luz, pero puede que no se deba a un efecto directo, sino más bien por la interferencia con el sistema del AMPc, debido a que el dibutiril-GMPc se une con una afinidad baja al canal de GMPc del segmento externo del fotorreceptor (Kaupp y Koch, 1986; Tanaka *et al.*, 1989). En las copas de *Xenopus* (Besharse *et al.*, 1984) y en las células de retinoblastoma Y79 (Pierce *et al.*, 1989) no tiene ningún efecto, en cambio en los fotorreceptores de pollo aislados, eleva ligeramente la actividad NAT, posiblemente debido a interferencias entre el sistema de fotorrecepción y la adenilato ciclasa, o por el efecto inhibitor del análogo del GMPc sobre la PDE (Iuvone *et al.*, 1990).

Se ha relacionado a la entrada de calcio extracelular en las neuronas como uno de los requerimientos necesarios para la aparición de osciladores circadianos en células nerviosas de invertebrados (Collwell *et al.*, 1992). Esto unido a su implicación en los procesos de inactivación de la NAT en retina de *R. perezi*, indicaría un papel muy relevante de este cation bivalente como mensajero intracelular en los fotorreceptores.

Se han descrito diversos componentes del sistema del fosfatidilinositol en el segmento externo, como la PLC (Choe *et al.*, 1990), el IP₃ (Brown *et al.*, 1987), la PKC (Binder *et al.*, 1989; Ou y Ebadi, 1992), todos ellos relacionados con la regulación de la fotosensibilidad del fotorreceptor. En el cuerpo celular y en el cuerpo sináptico se han localizado otros elementos del sistema del calcio, como canales dependientes de voltaje de tipo L (Gleason *et al.*, 1992), y la calmodulina (Pochet *et al.*, 1991), esto indicaría una asimetría en la distribución del sistema del calcio dentro de la célula fotorreceptora, lo que indicaría también una separación de funciones.

La omisión del calcio en el medio de cultivo fue utilizado en primer lugar con el fin aislar sinápticamente al fotorreceptor del resto de la retina, y poder localizar si la estimulación de la adenilato ciclasa tenían lugar dentro del fotorreceptor, o en otras neuronas que a través de algún neurotransmisor estimulara transinápticamente la actividad NAT en retina de *Xenopus* (Iuvone y Besharse, 1986a). Pero se observó que el calcio es necesario para que se exprese el incremento nocturno de la NAT (Iuvone, 1986b), indicando así un

papel fundamental de este catión. En retina de *R. perezi* se observa también esta dependencia respecto al calcio del medio de cultivo.

Se encuentra establecida la dependencia de la producción de melatonina respecto a la actividad de la adenilato ciclasa, y se conoce también la acción de la dopamina inhibiendo esta ciclasa en luz a través de los receptores D2. En cambio, se desconoce como se logra la estimulación de la producción de AMPc en oscuridad. El calcio extracelular podría llevar a cabo esta función, en oscuridad el fotorreceptor se encuentra parcialmente despolarizado permitiendo la entrada de calcio a través de canales dependiente de voltaje de tipo L, este incremento en el calcio intracelular estimularía la adenilato ciclasa, y por tanto la producción de melatonina. Esta hipótesis ha sido confirmada en los fotorreceptores de pollo aislados (Iuvone *et al.*, 1991; Avendano *et al.*, 1990), utilizando potasio como agente despolarizante.

Existe pues una interacción entre el AMPc y el calcio en los fotorreceptores, este tipo de interconexiones ha sido ampliamente estudiado en las células nerviosas, donde tanto la calmodulina como la calcineurina (proteína fosfatasa dependiente de calcio) juegan un papel central (Armstrong, 1989).

El efecto del calcio sobre la síntesis de melatonina tanto en la glándula pineal como en la retina parece ser muy complicado y posiblemente estén implicados varios procesos antagónicos, ya que la respuesta observada depende de la especie, del órgano y de la dosis utilizada. Por ejemplo, en la glándula pineal de los mamíferos, la entrada moderada de calcio al pinealocito tiene un efecto estimulador sobre el AMPc y la NAT, que corresponde al efecto sinérgico observado en la estimulación de los receptores β y α_1 , en cambio si la entrada de calcio es elevada aunque el AMPc sigue alto debido a la estimulación de la adenilato ciclasa por la calmodulina (Ho *et al.*, 1991), la NAT se reduce (Parfitt *et al.*, 1975; Ho *et al.*, 1992). Este resultado concuerda con lo obtenido en la retina de *R. perezi*, cuando se utiliza potasio como agente despolarizador la NAT y la síntesis de MEL se deprimen. Posiblemente en este caso el calcio actuaría sobre la NAT en un paso posterior a la adenilato ciclasa, sobre su degradación o sobre la expresión génica de la enzima (Ho *et al.*, 1992).

En otras especies el papel del calcio no está tan claro, la adición de EGTA en el cultivo de glándula pineal de pollo no tiene ningún efecto sobre la NAT (Wainwright y Wainwright, 1984), en cambio el potasio estimula la síntesis de melatonina en cultivo de este mismo tejido (Zatz *et al.*, 1988).

Hay que tener en cuenta que el potasio despolariza todas las células de la retina, luego el efecto negativo del potasio puede deberse a la liberación masiva de neurotransmisores de la retina con función inhibidora (dopamina, por ejemplo) que anularían la síntesis de MEL.

VI. CONCLUSIONES

El radioenzimoincubación es un método válido y reproducible para la cuantificación de la NAT en retina de anuros, siendo imprescindible la adición de EGTA en el tampón de homogeneización del tejido para proteger la enzima de su rápida degradación *in vitro*. La actividad AA-NAT ocular de *R. perezii* muestra un ritmo diario en su actividad, apareciendo los valores máximos durante la noche. La exposición a la luz durante la fase oscura del fotociclo reduce los niveles de la actividad NAT hasta valores equivalentes a los basales diurnos.

En la retina de *R. perezii* existe una actividad arilamina N-acetiltransferasa que puede distinguirse de la AA-NAT por una serie de características enzimológicas, como el pH óptimo, la cinética y la especificidad de sustrato. Además, no presenta oscilaciones diarias en su actividad. *In vivo* sólo la AA-NAT es capaz de acetilar serotonina. *In vitro* la contribución de la A-NAT a la acetilación de triptamina en el ensayo resulta despreciable.

La aparición del ritmo ocular de la actividad AA-NAT durante la ontogenia de los anuros coincide temporalmente con el inicio de la función visual. El ritmo adquiere progresivamente el perfil de los adultos, en paralelo a la maduración de una regulación dopaminérgica procedente de la retina interna. Existe una variación interespecífica en el perfil rítmico.

Las variaciones estacionales del fotoperíodo y la temperatura determinan el perfil diario de MEL ocular y actividad AA-NAT en adultos de *R. perezii*. La temperatura regula la amplitud de la oscilación día/noche de MEL, y el fotoperíodo la duración del pico nocturno. La temperatura eleva los niveles de AA-NAT amortiguando las oscilaciones día/noche. No existe un estrecho paralelismo entre AA-NAT y MEL, lo que sugiere que el ritmo de síntesis de MEL no depende exclusivamente de la actividad AA-NAT en la retina.

La aclimatación térmica provoca una compensación parcial de la actividad AA-NAT, modificando la cantidad de enzima pero no sus características cinéticas.

La cinética de la AA-NAT muestra una modulación térmica positiva, que podría indicar un mecanismo de compensación inmediata a bajas concentraciones de sustrato.

Además, la AA-NAT muestra una inhibición por exceso de serotonina dependiente de la temperatura. Este comportamiento cinético podría actuar como un mecanismo de amplificación de la oscilación diaria de MEL, si la enzima funcionase *in vivo* alrededor de su S_{opt} .

La retina mantiene su capacidad de síntesis rítmica de MEL en cultivo estático durante al menos 24 horas, conservando la sensibilidad a la luz. La expresión de los ritmos de MEL y AA-NAT depende de la síntesis de proteínas *de novo*, siendo la tasa de recambio de la AA-NAT más lenta que la descrita en otros vertebrados.

La regulación catecolaminérgica de la síntesis de MEL se realiza fundamentalmente por la dopamina, a través de receptores D2, inhibiendo dicha síntesis. No obstante, no se puede descartar un control adrenérgico mediado por receptores β y $\alpha 1$, aunque éste parece no ser un efecto directo sobre el fotorreceptor, sino regulando la liberación de dopamina.

El AMPc es el mensajero intracelular principal que regula la síntesis de MEL en la retina de *R. perezi*. La luz, como factor inhibidor de la síntesis de MEL, actúa sobre los niveles de AMPc con un efecto doble, reduciendo la actividad adenilato ciclasa y activando las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. Sin embargo, el GMPc actúa de forma marginal sobre la síntesis de MEL, los efectos provocados por el análogo pueden deberse a interferencias en el proceso de fotorrecepción, o a una inhibición de las fosfodiesterasas.

Los niveles de calcio intracelulares regulan la síntesis de MEL mediante un mecanismo múltiple. Es necesario el calcio extracelular para la expresión del ritmo de síntesis de MEL, aunque la entrada masiva de este mensajero, provocada por la despolarización inducida por potasio, activa la degradación de la AA-NAT, reduciendo los niveles de MEL.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandrov Y.Y. (1977). Cells, molecules and temperature. Berlin. Springer-Verlag.
- Alonso-Bedate M., Delgado M.J. y Carballada R. (1988). In vivo effect of melatonin and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) on testicular function in *Rana temporaria*. *J. Pineal Res.* 5:323-332.
- Alonso-Gómez A.L., Tejera M., Alonso-Bedate M. y Delgado M.J. (1990). Response to pinealectomy and blinding in vitellogenic female frog (*Rana perezi*) subjected to high temperature in autumn. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68:94-98.
- Arendt J., Symons A.M. y Laud C. (1981). Pineal function in the sheep evidence for a possible mechanism mediating seasonal reproductive activity. *Experientia* 37:584-586.
- Armstrong D.L. (1989). Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain. *Trend Neurosci.* 12:117-122.
- Arshavsky V.Y., Gray-Keller M.P. y Bownds M.D. (1991). cGMP suppresses GTPase activity of a portion of transducin equimolar to phosphodiesterase in frog rod outer segments. Light-induced cGMP decreases as a putative feedback mechanism of the photoresponse. *J. Biol. Chem.* 266:18530-18537.
- Atkinson D.E. (1969). Limitation of metabolite concentrations and the conservation of solvent capacity in the living cell. *Current topics Cellular Regulation* 1:29-43
- Attanasio A., Rager K. y Gupta D. (1986). Ontogeny of circadian rhythmicity for melatonin, serotonin, and N-acetylserotonin in humans. *J. Pineal Res.* 3:251-256.

- Avendano G., Butler B.J. y Iuvone P.M. (1990). K⁺-evoked depolarization induces serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched retinal cell cultures. *Neurochem. Int.* **17**:117-126.
- Azuma M., Seki T. y Fujishita S. (1988). Formation of visual pigment chromophores during the development of *Xenopus laevis*. *Vision Res.* **28**:959-964.
- Azuma M., Seki T. y Fujishita S. (1990). Changes of egg retinoids during the development of *Xenopus laevis*. *Vision Res.* **30**:1395-1400.
- Baker P.C. (1969). Melatonin levels in developing *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **28**:1387-1393.
- Baker P.C. y Hoff K.M. (1971). Melatonin localization in the eyes of larval *Xenopus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **39A**:879-881.
- Baker P.C. y Hoff K.M. (1978). Daily variation in the eye's 5-HT stores. *Experientia* **35**:780.
- Balemans M.G.M., Bary F.A.M., van Benthem J. y Legerstee W.C. (1981). Seasonal variations in HIOMT activity during the night in the pineal gland of Wistar rats of several ages. *Adv. Biosci.* **29**:207-211.
- Bandwin J. (1971). Adaptation of enzymes to temperature acetylcholinesterases in the central nervous system of fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **40**:181-187.
- Barbadillo L.J. (1987) Guia de Incafo de los anfibios y reptiles de la peninsula ibérica, islas baleares y canarias. Incafo (Madrid). pp. 126-130.

- Barja de Quiroga G. Gil P. y Alonso-Bedate M. (1985). Catalase enzymatic activity and electrophoretic patterns in adult amphibians-a comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**:853-858.
- Barrett R.K. y Underwood H. (1991). Retinally perceived light can entrain the pineal melatonin rhythm in japanese quail. *Brain Res.* **563**:87-93.
- Barritt G.J. (1992). Communication within animal cells. Oxford University Press.
- Bauer P.J. y Drechsler M. (1992). Association of cyclic GMP-gated channels and $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}\text{-K}^+$ exchanges in bovine retinal rod outer segment plasma membranes. *J. Physiol.* **451**:109-131.
- Bernard M., Voisin P., Guerlotté J. Collin J.P. (1991). Molecular an cellular aspects of hydroxyindole-O-methyltransferase expression in the developing chick pineal gland. *Dev. Brain Res.* **59**:75-81.
- Besharse J.C. (1986). Photosensitive membrane turnover: differentiated membrane domains and cell-cell interaction. En "The retina: a model for cell Biology studies" (Eds: Adler R., Farber D.) Academic Press. London. pp. 297-352
- Besharse J.C. (1992). The "ON"-bipolar agonist, L-2-amino-4-phosphonobutyrate, blocks light-evoked cone contraction in *Xenopus* eye cups. *Neurochem. Res.* **17**:75-80.
- Besharse J.C., Dunis D.A. y Iuvone P.M. (1984). Regulation and possible role of serotonin N-acetyltransferase in the retina. *Federation Proc.* **43**:2704-2708.

- Besharse J.C. y Dunis D.A. (1983a). Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activación of rod shedding. *Science* 219:1341-1343.
- Besharse J.C. y Dunis D.A. (1983b). Rod photoreceptor disc shedding in eyecups: relationship to bicarbonate and amino acids. *Exp Eye Res.* 36:567-580.
- Besharse J.C. y Iuvone P.M. (1983). Circadian clock in the *Xenopus laevis* eye controlling retinal N-acetyltransferase. *Nature* 305:133-135.
- Besharse J.C. y Witkovsky P. (1992). Light-evoked contraction of red absorbing cones in the *Xenopus* retina is maximally sensitive to green light. *Visual Neurosci.* 8:243-249.
- Binder B.M., Brewer E. y Bownds M.D. (1989). Stimulation of protein phosphorylations in frog rod outer segments by protein kinase activators. Suppression of light-induced changes in membrane current and cGMP by protein kinase C activators. *J. Biol. Chem.* 264:8857-8864.
- Binkley S. (1981). Pineal biochemistry: comparative aspects and circadian rhythms. En: "The pineal gland" Vol. I: Anatomy and Biochemistry. (Ed. Reiter R.J.) Boca Raton, CRC Press. Cap. 6. pp. 155-172.
- Binkley S. (1983). Rhythms in ocular and pineal N-acetyltransferase: a portrait of an enzyme clock. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A:123-129.
- Binkley S., Hryschshyn M. y Reilly K. (1979). N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland. *Nature* 281:479-481.

- Binkley S., Klein D.C y Weller J.L. (1976). Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: protection of stimulated activity by acetyl-CoA and related compounds. *J. Neurochem.* **24**:1083-1085.
- Binkley S., Riebman J.B. y Reilly K. (1979). Regulation of pineal rhythms in chickens N-acetyltransferase activity in homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* **63C**:291-296.
- Bird A.C., Flannery J.G., y Bok D. (1988). A diurnal rhythm in opsin content of *Rana pipiens* rod inner segments. *Inv. Opth. Vis. Sci.* **29**:1028-1039
- Birks E.K. y Ewing R.D. (1986). Seasonal changes in pineal melatonin content and hydroxyindole-O-methyltransferase activity in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Gen. comp. Endocrinol.* **64**:91-98.
- Bligh J. y Johnson K.G. (1973). Glossary or terms for thermal physiology. *J. Appl. Physiol.* **35**:941-961.
- Blum M., Grant D.M., Demierre A. y Meyer U.A. (1990). Genetic polymorphism of rabbit and human N-acetyltransferase: molecular mechanism. En:"Biotechnology and human genetic predisposition to disease". pp. 61-70.
- Boatright J.H., Hoel M.J. y Iuvone P.M. (1989). Stimulation of endogenous dopamine release and metabolism in amphibian retina by light- and K+-evoked depolarization. *Brain Res.* **482**:164-168.
- Boatright J.H. y Iuvone P.M. (1989a). GABA and the regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in the amphibian retina- I. Effects of GABA agonist and antagonists. *Neurochem. Int.* **15**:541-548.

- Boatright J.H. y Iuvone P.M. (1989b). GABA and the regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in the amphibian retina- II. The role of dopamine. *Neurochem. Int.* **15**:549-554.
- Bogenmann E., Lochrie M.A. y Simon M.I. (1988). Cone cell-specific genes expressed in retinoblastoma. *Science* **240**:76-78.
- Bojkowski C.J. y Arendt J. (1988). Annual changes in 6-sulphatoxymelatonin excretion in man. *Acta Endocr.* **117**:470-476.
- Bonaventure N., Jardon B., Wioland N., Rudolf G. (1987). Physiological effects of muscarinic vs nicotinic ACh antagonist upon ganglion cell activity in the frog retina. *Vision Res.* **27**:2061-2072
- Brainard G.C., Petterborg L.J., Richardson B.A. y Reiter R.J. (1982). Pineal melatonin in syrian hamsters: circadian and seasonal rhythms in animals maintained under laboratory and natural conditions. *Neuroendocrinology* **35**:342-348.
- Brammer M., Binkley S., Enrico J. y Duffy M. (1981). The rise and fall of pineal N-acetyltransferase in vitro: the influence of age. *Dev. Biol.* **86**:256-258.
- Brandon C., Lam D.M.K., Su Y.Y.T. y Wu J.Y. (1980). Immunocytochemical localization of GABA neurons in the rabbit and frog retina. *Brain Res. Bull.* **5 Suppl.** **2**:21-29.
- Brandstätter R. y Meissl H. (1992). Effect of dopamine on the melatonin secretion of the photosensitive pineal organ of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Melatonin and the pineal gland from basic science to clinical application*. Paris. Abstract nº 83.

- Brown J.E., Blazynski C. y, Cohen A.I. (1987). Light induces a rapid and transient increase in inositol-trisphosphate in toad rod outer segments. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **146**:1392-1396.
- Brunken W.J. y Dawson W. (1987). The actions of serotonergic agonists and antagonists on the activity of brisk ganglion cells in the rabbit retina. *J. Neurosci.* **7**:4054-4065.
- Bubenik G.A., Brown G.M. y Grotta L.J. (1976). Differential localization of N-acetylated indoleamines in the CNS and Harderian gland using immunohistology. *Brain Res.* **118**:417-427.
- Burggren W.W. y Just J.J. (1992). Developmental changes in physiological systems. En:"Environmental physiology of the amphibians". (Eds:Feber, M.E. y Burggren W.W.) University of Chicago Press. Chicago. Cap. 16. pp. 467-530.
- Burns J.T., Patyna R. y Ryland S. (1987). A circadian rhythm in the effect of thyroxine in the stimulation of metamorphosis in the African clawed toad, *Xenopus laevis*. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* **18**:293-296.
- Burnside B., Dearry A. (1986). Cell motility in the retina. En"The retina: A model for cell Biology studies". (Eds: Adler B. Farber D.) Academic Press. London. pp. 151-206.
- Cahill G.M. y Besharse J.C. (1989). Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:1098-1102
- Cahill G.M. y Besharse J.C. (1990). Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: limitations by serotonin availability. *J. Neurochem.* **54**:716-719.

- Cardinali D.P. y Wurtzman R.J. (1972). Hydroxyindole-O-methyl transferases in rat pineal, retina and harderian gland. *Endocrinology* **91**:147-252.
- Carlson L.L., Weaver D.R. y Reppert S.M. (1991). Melatonin receptors and signal transduction during development in siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Develop. Brain Res.* **59**:83-88.
- Chabre M., Deterre P. (1989). Molecular mechanism of visual transduction. *Eur. J. Biochem.* **179**:255-266
- Champney T.H., Matthews R.T. (1991). Pineal serotonin is resistant to depletion by serotonergic neurotoxins in rats. *J. Pineal Res.* **11**:163-167.
- Chan A. y Ebadi M. (1980). The kinetics of norepinephrine-induced stimulation of serotonin N-acetyltransferase in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology* **31**:244-251.
- Chan A. y Ebadi M. (1981). Evidence for existence of a serotonin NAT inactivating substance in rat pineal gland. *Endocr. Res. Commun.* **8**:205-227.
- Choe H.G., Ghalayini A.J. y Anderson R.E. (1990). Phosphoinositide metabolism in frog rod outer segments. *Exp. Eye Res.* **51**:167-176.
- Clark V.M. (1986). The cell biology of the retinal pigment epithelium. En "The retina: a model for Cell Biology studies. Parte II" (Eds: Adler, R., Farber, D.) Academic Press (London) pp. 129-168.
- Cleland W.W. (1967). The statistical analysis of enzyme kinetic data. *Adv. Enzymol.* **29**:1-32.

- Cohen A.I. y Blazynski C. (1990). Dopamine and its agonists reduce a light-sensitive pool of cyclic AMP in mouse photoreceptors. *Visual Neurosci.* **4**:43-52.
- Colwell C.S., Khalsa S.B.S. y Block G.D. (1992). Cellular mechanisms of entrainment. *Chronobiol. Intern.* **9**:163-179.
- Cooper J.R., Bloom F.E. y Roth R.H. (1991). Receptors. En: "The biochemical basis of neuropharmacology". Oxford Univ. Press 6ª ed. Cap. 5 pp. 88-110.
- Cribb A.E., Grant D.M., Miller M.A. Spielberg S.P. (1991). Expression of monomorphic arylamine N-acetyltransferase (NAT1) in human leukocytes. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **259**:1241-1246.
- Dahl N.A. (1992). Paracrine control of photomembrane removal. *Neurochem. Res.* **17**:67-73.
- Dahl N.A. y Gordon W.C. (1992). Photomembrane turnover in frog retina: light intensity and spectral correlates. *Exp. Eye Res.* **55**:839-852.
- Darrow J.M., Tamarkin L., Duncan M.J. y Goldman B.D. (1986). Pineal melatonin rhythms in female turkish hamsters: effects of photoperiod and hibernation. *Biol. Reprod.* **35**:74-83.
- Daw N.W. Brunken W.J. Parkinson D. (1989). The function of synaptic transmitters in the retina. *Ann. Rev. Neurosci.* **12**:205-225.
- Dax E.M. y Sugden D. (1988). Age-associated changes in pineal adrenergic receptors and melatonin synthesizing enzymes in the wistar rat. *J. Neurochem.* **50**:468-478.

- Daya S. y Fata M. (1986). A 24 hour profile of ¹⁴C-serotonin metabolism by organ cultures of rat pineal glands. *IRCS Med. Sci.* **14**:1153-1154.
- Dearry A., Edelman J.L., Miller S. y Burnside B. (1990). Dopamine induces light-adaptive retinomotor movements in bullfrog cones via D2 receptors and in retinal pigment epithelium via D1 receptors. *J. Neurochem.* **54**:1367-1378.
- Deguchi T. (1975a). Characteristics of serotonin-acetyl coenzyme A N-acetyltransferase in pineal gland of rat. *J. Neurochem.* **24**:1083-1085.
- Deguchi T. (1975b). Ontogenesis of a biological clock for serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase in pineal gland of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:2814-2818.
- Deguchi T. (1979). Role of adenosine 3',5'-monophosphate in the regulation of circadian oscillation of serotonin N-acetyltransferase activity in cultured chicken pineal gland. *J. Neurochem.* **33**:45-51.
- Deguchi T. (1992). Physiology and molecular biology of arylamine N-acetyltransferases. *Biomed. Res.* **13**:231-242
- Deguchi T. y Axelrod J. (1972). Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. *Anal. Biochem.* **50**:174-179.
- Delgado M.J., Gutiérrez P. y Alonso-Bedate M. (1983). Effects of daily melatonin injections on the photoperiodic gonadal response of the female frog, *Rana ridibunda*". *Comp. Biochem. Physiol.* **76A**:389-398.

- Delgado M.J., Gutiérrez P. y Alonso-Bedate M. (1984). Growth response of prometamorphic *Rana ridibunda* and *Discoglossus pictus* tadpoles to melatonin injections and photoperiod. *Acta Embryol. Morphol. Exper.* 5:23-39.
- Delgado M.J., Gutiérrez P. y Alonso-Bedate M. (1987). Melatonin and photoperiod alter growth and larval development in *Xenopus laevis* tadpoles. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A:417-421.
- Delgado M.J., Vivien-Roëls B., Alonso-Gómez A.L. y Alonso-Bedate M. (1989). Variaciones estacionales de los ritmos diarios de melatonina en anfibios: importancia del fotoperiodo y la temperatura ambiental. En: "Pineal y campos magnéticos". (Ed. Bardasano J.L.) Instituto de Bioelectromagnetismo "Alonso de Santa Cruz". pp. 39-49 .
- Delgado M.J. y Vivien-Roëls B. (1989). Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen. comp. Endocrinol.* 75:46-53.
- Dixon M. y Webb E.C. (1979). Enzyme kinetics. En: "Enzymes" 3ª Ed. Academic Press. New York. Cap.4. pp. 47-206.
- Dotz E. y Meissl H. (1982). The pineal and parietal organs of lower vertebrates. *Experientia* 38: 996-1000.
- Dong C.J. y McReynolds J.S. (1991). The relationship between light, dopamine release and horizontal cell coupling in the mudpuppy retina. *J. Physiol.* 440:291-309.
- Dubocovich M.L. (1983) Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 306:782-784.

- Duellman W.E., Trueb L. (1986) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Inc. New York.
- Duggleby R.G. (1981). A nonlinear regression program for small computers. *Anal. Biochem.* **110**:9-18.
- Duncan M.J., Banister M.J. y Reppert S.M. (1986). Developmental appearance of light-dark entrainment in the rat. *Brain Res.* **369**:326-330.
- Duston J. y Bromage N. (1989). Serum melatonin profiles in rainbow trout maintained under long [16L:8D] and short [8L:16D] photoperiods. *J. Endocrinol. Suppl.* **108**:77.
- Ehinger B. y Rose B. (1988). Diurnal variation in chick retinal 5-hydroxytryptamine. *Exp. Eye Res.* **46**:819-821.
- Ehret M., Pévet P. Maitre M. (1991). Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J. Neurochem.* **57**:1516-1521.
- Eichler V.B. y Moore R.Y. (1975). Studies on hydroxyindole-O-methyltransferase in frog brain and retina: enzymology, regional distribution and environmental control of enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol.* **50C**:89-95.
- Eloranta E., Timisjärvi J., Nieminen M., Ojutkangas V., Leppäluoto J. y Vakkuri O. Seasonal and daily patterns in melatonin secretion in female reindeer and their calves. *Endocrinology* **130**:1645-1652.
- Eskay R.L., Furness, J.F. y Long R.T. (1981). Substance P activity in the bullfrog retina: localization and identification in several vertebrate species. *Science* **212**:1049-1051.

- Eskay R.L., Long R.T., Iuvone P.M. (1980). Evidence that TRH, somatostatin, and substance P are present in neurosecretory elements of vertebrate retina. *Brain Res.* **196**:554-559.
- Fain G.L. y Schröder W.H. (1990). Light-induced calcium release and re-uptake in toad rods. *J. Neurosci.* **10**:2238-2249.
- Fajardo N., Abreu P. y Alonso R. (1992). Determination of kinetic properties of serotonin-N-acetyltransferase in bovine pineal gland using HPLC with fluorimetric detection. *J. Pineal Res.* **13**:80-84.
- Falcón J. y Collin J.P. (1989). Photoreceptors in the pineal of lower vertebrates: functional aspects. *Experientia* **45**:909-913.
- Falcón J., Brun-Marmillon J., Claustrat B. y Collin J.P. (1988). Melatonin production in organ cultured chicken pineal: modulation by adenosine and its analogs. *Pflügers Arch.* **413**:93-95.
- Falcón J., Thibault C., Martin C., Brun-Marmillon J., Claustrat B. y Collin J.P. (1991). Regulation of melatonin production by catecholamines and adenosine in a photoreceptive pineal organ. An *in vitro* study in the pike and the trout. *J. Pineal Res.* **11**:123-134.
- Fernández de Arriba A., Lizcano J.M., Balsa D. y Unzeta M. (1991). Contribution of different amine oxidases to the metabolism of dopamine in bovine retina. *Biochem. Pharmacol.* **42**:2355-2361.
- Fersht A. (1977). Enzyme, structure and mechanism. (Ed. Freeman W.H.). San Francisco. pp.256-258.

- Firth B.T., Kennaway D.J. y Belan I. (1991). Thermoperiodic influences on plasma melatonin rhythms in the lizard *Tiliqua rugosa*: effect of thermophase duration. *Neurosci. Lett.* **121**:139-142.
- Firth B.T., Kennaway D.J. y Rozenblds M.A.M. (1979). Plasma melatonin in the Scincid lizard, *Trachydosaurus rugosus*: diel rhythm, seasonality, and the effect of constant light and constant darkness. *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**:493-500.
- Firth B.T., Thompson M.B., Kennaway D.J. y Belan I. (1989). Thermal sensitivity of reptilian melatonin rhythms: "cold" tuatara vs. "warm" skink. *Amer. J. Physiol.* **256**:R1160-R1163.
- Firth B.T. y Kennaway D.J. (1989). Thermoperiod and photoperiod interact to affect the phase of the plasma melatonin rhythm in the lizard, *Tiliqua rugosa*. *Neurosci. Lett.* **106**:125-130.
- Florant G.L., Rivera M.L., Lawrence A.K. y Tamarkin L. (1984). Plasma melatonin concentrations in hibernating marmots: absence of a plasma melatonin rhythm. *Am. J. Physiol.* **247**:R1062-R1066.
- Florant G.L. y Tamarkin L. (1984). Plasma melatonin rhythms in euthermic marmots (*Marmota flaviventris*). *Biol. Reprod.* **30**:332-337.
- Follet B.K., Foster R.G. y Nicholls T.D. (1985). Photoperiodism in birds. En: "Photoperiodism, melatonin and the pineal" Ciba Foundation Symposium. Pitman, London. Vol. 117, pp. 93-105
- Frank B.D. y Hollyfield J.G. (1987a). Retinal ganglion cell morphology in the frog, *Rana pipiens*. *J. Comp. Neurol.* **266**:413-434.

- Frank B.D. y Hollyfield J.G. (1987b). Retina of the tadpole and frog: delayed dendritic development in a subpopulation of ganglion cells coincident with metamorphosis. *J. Comp. Neurol.* **266**:435-444.
- Fraser S., Cowen P., Frankin M., Franey C. y Arendt J. (1983). Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clin. Chem.* **29**:396-397.
- Frederick J.M., Rayborn M.E. y Hollyfield J.G. (1989). Serotonergic neurons in the retina of *Xenopus laevis*: Selective staining, identification, development, and content. *J. Comp. Neurol.* **281**:516-531.
- Friedhoff A. y Miller J.C. (1977). *In vitro* and *in vivo* studies of extrapineal N-acetyltransferase in rat brain. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **16**:225-244.
- Fritzsich B. (1991). Ontogenetic clues to the phylogeny of the visual system. En "The changing visual system" (Eds: Bagnoli P. y Hodos W.). Plenum Press. New York. pp. 33-49.
- Gábríel R., Straznický C. y Wye-Dvorak J. (1992a). GABA-like immunoreactive neurons in the retina of *Bufo marinus*: evidence for the presence of GABA-containing ganglion cells. *Brain Res.* **571**:175-179.
- Gábríel R., Zhu B. y Straznický C. (1991). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive elements in the distal retina of *Bufo marinus*: a light and electron microscopic study. *Brain Res.* **559**:225-232.
- Gábríel R., Zhu B. y Straznický C. (1992b). Synaptic constacts of tyrosine hydroxylase-immunoreactive elements in the inner plexiform layer of the retina of *Bufo marinus*. *Cell Tissue Res.* **267**:525-534.

- Gaudet S., Palkovits M. y Namboodiri M.A.A. (1991). Regional distribution of arylamine and aryalkylamine N-acetyltransferase activities in the rat brain. *Brain Res.* **539**:355-357.
- Gern W.A. Owens D.W., Ralph C.L. (1978). Plasma melatonin in the trout: Day-night change demonstrated by radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* **34**:453-458.
- Gern W.A., Wechsler E. y Duvall D. (1984). Characterization and non-rhythmicity of retinal hydroxyindole-O-methyltransferase activity in trout (*Salmo gairdneri*) *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**:169-178.
- Gern W.A. y Ralph C.L. (1979). Melatonin synthesis by the retina. *Science* **204**:183-184.
- Gibbs F.P. y Vriend J. (1981). The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* **109**:1796-1798.
- Gil P. y Barja de Quiroga G. (1988). Effect of temperature acclimation on enzymatic activities and thermal sensitivity of catalase, oxygen consumption and concentration of tissue peroxidation products in *Discoglossus pictus* tadpoles. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**:363-373.
- Gläsener G., Schmidt C. y Himstedt W. (1988). Two populations of serotonin-immunoreactive neurons in the frog (*Rana esculenta*) retina. *Neurosci. Lett.* **84**:251-254.
- Gleason E., Mobbs P., Nuccitelli R., Wilson M. (1992). Development of functional calcium channels in cultured avian photoreceptors. *Visual Sci.* **8**:315-327.
- Gosner K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**:183-190.

- Grace M.S., Cahill G.M. y Besharse J.C. (1989). Aryl acylamidase in ocular melatonin metabolism: distribution among vertebrate classes. *Invest. Ophthalm. Visual Sci. Suppl.* **30**:123.
- Grant D.M., Blum M., Beer M. y Meyer U.A. (1991). Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Molec. Pharmacol.* **39**:184-191.
- Graves J.E y Somero G.N. (1982). Electrophoretic and functional enzymic evolution in four species of eastern Pacific barracudas from different thermal environments. *Evolution* **36**:97-106
- Grün G. (1982). The development of the vertebrate retina: a comparative survey. *Advan. Anat. Embriol. Cell Biol.* Vol. 78 pp. 1-83.
- Hadjiconstantinou M., Cohen J. y Neff N. H. (1983). Epinephrine: a potential neurotransmitter in retina. *J. Neurochem.* **41**:1440-1444.
- Hailman J.P. y Jaeger R.G. (1976). A model of phototaxis and its evaluation with anuran amphibians. *Behaviour* **56**:215-249.
- Halberg F. y Reinberg A. (1967) Rhythmes circadiens et rythmes de basse fréquence en physiologie humaine. *J. Physiol. (Paris)* **59**:117-200
- Hamm H. (1990). Regulation by light of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their substrates in frog rod outer segments. *J. Gen. Physiol.* **95**:545-567.
- Hamm H.E., Takahashi J.S. Menaker R.M. (1983). Light-induced decrease of serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin in chicken pineal gland and retina. *Brain Res.* **266**:287-293.
- Hamm H.E. y Menaker R.M. (1980). Retinal rhythms in chicks: circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* **77**:4998-5002.
- Hamm H.E. y Menaker R.M. (1981). Pineal and retinal serotonin NAT activity: modulation by phosphate. *J. Neurochem.* **37**:1567-1572.

- Hazel J.R. y Proser C.L. (1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.* **54**:620-677
- Health A.R., y Basinger S.F. (1983) Simple sugars inhibit rod outer segment disc shedding by the frog retina. *Vision Res.* **23**:1371-1377.
- Heim M.H., Blum M., Beer M. y Meyer U.A. (1991). Acetylation of serotonin in the rabbit pineal gland: an N-acetyltransferase with properties distinct from NAT1 and NAT2 is responsible. *J. Neurochem.* **57**:1095-1099.
- Hewitt A.T. (1986). Extracellular matrix molecules: their importance in the structure and function of the retina. En: "The retina: a model for Cell Biology studies. Parte II" (Eds: Adler, R., Farber, D.) Academic Press (London) pp. 169-214
- Hill R.W. y Wyse G.A. (1992). Relaciones térmicas. En: "Fisiología Animal". 2ªEd. (Ed. Ferrell T.R.). Ediciones Akal. Madrid. Cap. 6. pp. 76-135.
- Hiscock J. y Straznicky C. (1989). Morphological characterization of substance P-like immunoreactive amacrine cells in the anuran retina. *Vision Res.* **29**:293-301.
- Hiscock J. y Straznicky C. (1990). Neuropeptide Y- and substance P-like immunoreactive amacrine cells in the retina of the developing *Xenopus laevis*. *Develop. Brain Res.* **54**:105-113.
- Ho A.K., Cheng J., y Girard M. (1992). Differential effects of intracellular calcium elevating agents on adrenergic-stimulated cyclic nucleotide and melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **70**:1254-1260.
- Ho A.K. y Klein D.C. (1987). Phosphatidylinositol phosphodiesterase (Phospholipase C) activity in the pineal gland: characterization and photoneural regulation. *J. Neurochem.* **48**:1033-1038.
- Hochachka P.W. y Somero G.N. (1973). Strategies of biochemical adaptation. W.B. Saunders. Philadelphia
- Hochachka P.W. y Somero G.N. (1984). Temperatura adaptation. En: "Biochemical adaptation". University Press, Princenton, New Jersey. Cap11 pp. 355-449.
- Hutchison V.H. y Dupré R.K. (1992). Thermoregulation. En: "Environmental Physiology of the amphibians". (Eds:Feber, M.E. y Burggren W.W.) University of Chicago Press. Chicago. Cap. 9. pp. 206-249.

- Iason G.R. y Ebling J.P. (1989). Seasonal variation in the daily pattern of plasma melatonin in a wild mammal: The mountain hare (*Lepus timidus*). *J. Pineal Res.* **6**:157-167.
- Illnerová H. (1992). Resetting of the mammalian circadian clock through lowering of the amplitude: rat pineal N-acetyltransferase rhythm as a model. *Physiol. Res.* **41**:335-344.
- Illnerová H., Hoffmann K. y Vaněček J. (1984). Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian Hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* **38**:226-231.
- Illnerová H., Hoffmann K. y Vaněček J. (1986). Adjustment of rat pineal N-acetyltransferase rhythm to change from long to short photoperiod depends on the direction of the extension of the dark period. *Brain Res.* **362**:403-408.
- Illnerová H. y Vaněček J. (1983). The evening rise in the rat pineal NAT activity under various photoperiods. *Neurosci. Lett.* **36**:279-284.
- Iuvone P.M. (1986a). Neurotransmitters and neuromodulators in the retina: regulation, interactions, and cellular effects. En: "The retina: a model for Cell Biology studies, Parte II" (Eds: Adler, R., Farber, D.) Academic Press (London) pp. 1-72.
- Iuvone P.M. (1986b). Evidence for a D2-dopamine receptor in frog retina that decreases cyclic AMP accumulation and serotonin N-acetyltransferase activity. *Life Sci.* **38**:331-342.
- Iuvone P.M. (1990). Development of melatonin synthesis in chicken retina: regulation of serotonin N-acetyltransferase activity by light, circadian oscillations, and cyclic AMP. *J. Neurochem.* **54**:1562-1568.
- Iuvone P.M., Avendano G., Butler B.J. Adler R. (1990). Cyclic AMP-dependent induction of serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures: characterization and inhibition by dopamine. *J. Neurochem.* **55**:673-682.
- Iuvone P.M., Gan J. y Avendano G. (1991). K⁺-evoked depolarization stimulates cyclic AMP accumulation in photoreceptor-enriched retinal cell cultures: role of calcium influx through dihydropyridine-sensitive calcium channels. *J. Neurochem.* **57**:615-621.
- Iuvone P.M. y Besharse J.C. (1983). Regulation of indoleamine N-acetyltransferase activity in the retina: effect of light and dark, protein synthesis inhibitors and cyclic nucleotide analogs. *Brain Res.* **272**:111-119.

- Iuvone P.M. y Besharse J.C. (1986a). Cyclic AMP stimulates serotonin N-acetyltransferase activity in *Xenopus* retina *in vitro*. *J. Neurochem.* **46**:33-39.
- Iuvone P.M. y Besharse J.C. (1986b). Involvement of calcium in the regulation of serotonin N-acetyltransferase in retina. *J. Neurochem.* **46**:82-88.
- Iuvone P.M. y Besharse J.C. (1986c). Dopamine receptor-mediated inhibition of serotonin N-acetyltransferase activity in retina. *Brain Res.* **369**:169-179.
- Jaffé E.H., Urbina M. y Drujan B.D. (1991). Possible neurotransmitter role of noradrenaline in the teleost retina. *J. Neurosci. Res.* **29**:190-195.
- Janavs J.L., Pierce M.E. y Takahashi J.S. (1991). N-acetyltransferase and protein synthesis modulate melatonin production by Y79 human retinoblastoma cells. *Brain Res.* **540**:138-144.
- Janssens P.M.W. (1988). The evolutionary origin of eukaryotic transmembrane signal transduction. *Comp. Biochem. Physiol.* **90A**:209-223.
- Johnson P. (1990). Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationship and involvement in normal and abnormal cellular metabolism. *Int. J. Biochem.* **22**:811-822.
- Jørgensen C.B. (1992). Growth and reproduction. En: "Environmental physiology of the amphibians". (Eds:Feber, M.E. y Burggren W.W.) University of Chicago Press. Chicago. Cap. 15. pp. 439-466.
- Kamp C.W. y Morgan W.W. (1981). GABA antagonists enhance dopamine turnover in the rat retina *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* **69**:273-279.
- Kaufman C.M., Menaker M. (1991). Ontogeny of the pineal response to norepinephrine. *J. Pineal Res.* **11**:173-178.
- Kaupp U.B. y Koch K.W. (1986). Mechanism of photoreception in vertebrate vision. *Trends In Biochem. Sci.* **11**:43-47.
- Kaupp U.B. y Koch K.W. (1992). Role of cGMP and Ca²⁺ in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**:153-175.
- Kezuka H., Furukawa K., Aida K. y Hanyu I. (1988). Daily cycles in plasma melatonin levels under long or short photoperiod in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **72**:296-302.

- Khoory R. y Schloot W. (1986). Inhibition of day time, but not isoproterenol-stimulated pineal N-acetyltransferase activity by an unidentified pineal compound. *J. Neural Transm.* **66**:281-289.
- Kilbane A.J., Petroff T. y Weber W.W. (1991). Kinetics of acetyl CoA: arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylator human liver. *Drug Metab. Disposit.* **19**:503-507.
- King T.S. y Steinlechner S. (1985). Pineal indolalkylamine synthesis and melabolism: kinetic considerations. *Pineal Res. Rev.* **3**:69-113.
- Kirlin W.G., Ogolla F., Andrews A.F., Trinidad A., Ferguson R.J., Yerokun T., Mpezo M. y Hein D.W. (1991). Acetylator genotype-dependent expression of arylamine N-acetyltransferase in human colon cytosol from non-cancer and colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **51**:549-555.
- Klein D.C., Auerbach C.A., Namboodiri M.A.A. y Wheler G.H.T. (1981). Indole metabolism in the mammalian pineal. En: "The pineal gland". Vol. 1: Anatomy and Biochemistry. (Ed. Reiter R.J.) Cap. 8. pp. 199-228.
- Klein D.C., Berg G.R. y Weller J.L. (1970). Melatonin synthesis: adenosine 3',5'-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. *Science* **168**:979-980
- Klein D.C., Namboodiri M.A.A. y Auerbach D.A. (1981). The melatonin rhythm generating system: developmental aspects. *Life Sci.* **28**:1975-1986.
- Klein D.C. y Namboodiri M.A.A. (1982). Control of the circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity: possible role of protein thiol:disulphide exchange. *Trends Biochem. Sci.* **7**:98-101.
- Klein D.C. y Weller J.L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland. A circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* **169**:1093-1095.
- Klein D.C. y Weller J.L. (1972). Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science* **177**:532-533.
- Kobilka B. (1992). Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**:87-114.
- Koh S.W. y Chader G.J. (1984). Retinal pigment epithelium in culture demonstrates a distinct β -adrenergic receptor. *Exp. Eye Res.* **38**:7-13.

- Korf B., Rollag M.D. y Korf H.W. (1989). Ontogenetic development of S-antigen- and rod-opsin immunoreactions in retinal and pineal photoreceptors of *Xenopus laevis* in relation to the onset of melatonin-dependent color-change mechanisms. *Cell Tissue Res.* **258**:319-329.
- Krause D.N. y Dubocovich M.L. (1991). Melatonin receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **31**:549-568.
- Kumamoto J., Raison J.K. y Lyons J.M. (1971). Temperature 'breaks' in Arrhenius plots: A thermodynamic consequence of a phase change. *J. Theor. Biol.* **31**:47-51.
- Kyritsis A.P., Wiechmann A.F., Bok D. y Chader G.J. (1987). Hydroxyindole-O-methyltransferase in human retinoblastoma cells: effect of cell attachment. *J. Neurochem.* **48**:1612-1616.
- Lakhdar N., Vivien-Roëls B. y Pévet P. (1992). Seasonal variations in pineal 5-methoxytryptophol (5-ML) concentrations and in the daily pattern of pineal 5-ML and melatonin in the desert rodent *Jaculus orientalis*: effect of prolonged illumination during the night. *J. Pineal Res.* **13**:28-35.
- Lambrecht H.G. y Koch K.W. (1991). Phosphorylation of recoverin, the calcium-sensitive activator of photoreceptor guanylyl cyclase. *FEBS Lett.* **294**:207-209.
- Land M.F. y Fernald R.D. (1992). The evolution of eyes. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**:1-29.
- Laurenza A., Sutkowski E.M. y Seamon K.B. (1989). Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action?. *TIPS* **10**:443-447.
- Lee P.P.N., Allen A.E. y Pang S.F. (1990). Cold stress during scotophase elicited differential responses in quail pineal, retinal, and serum melatonin levels. *Acta Endocrinologica* **122**:535-539.
- Lee P.P.N., Shiu S.Y.W., Allen A.E. y Pang S.F. (1989). Cold exposure or norepinephrine injections altered melatonin levels in the quail retina. *Neurosci. Lett.* **100**:130-134.
- Lehninger, A.L. (1984). Enzimas. En:"Principios de bioquímica". Ediciones Omega. Barcelona. Cap. 9. pp. 207-248.
- Leyva H., Addiego L. y Stabenfeldt, G. (1984). The effect of different photoperiod on plasma concentrations of melatonin, prolactin and cortisol in the domestic cat. *Endocrinology* **115**:1729-1736.

- Liebman P.A., Parker K.R. y Dratz E.A. (1987). The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment. *Ann. Rev. Physiol.* **49**:765-791.
- Liebman P.A. y Entire G. (1968). Visual pigments of frog and tadpole (*Rana pipiens*). *Vision Res.* **8**:761-775.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Mahapatra M.S., Mahata S.K. y Maiti B.R. (1986). Circadian rhythms in serotonin, norepinephrine and epinephrine contents of the pineal-paraphysial complex of the soft-shelled turtle (*Lissemys punctata punctata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**:246-249.
- Makita Y., Okuno S. y Fugisawa H. (1990). Involvement of activator protein in the activation of tryptophan hydroxylase by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **268**:185-188.
- Mangum C.P. y Towle D.W. (1977). Physiological adaptation to unstable environments. *Amer. Sci.* **65**:67-75.
- Manns M. y Fritzsich B. (1991). The eye in the brain: retinoic acid effects morphogenesis of the eye and pathway selection of axons but not the differentiation of the retina in *Xenopus laevis*. *Neurosci. Lett.* **127**:150-154.
- Marc R.E. (1986). The development of retina networks. En "The retina: a model for cell biology studies" (Eds: Adler R. y Farber D.) Academic Press. London. pp. 17-65.
- Martin R.J., Jahagirdar A.P. y Downer, R.G.H. (1989). Partial characterization of N-acetyltransferase activity from cerebral ganglia and malpighian tubules of *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **19**:351-359.
- Mattano S.S., Land S., King C.M. y Weber W.W. (1989). Purification and biochemical characterization of hepatic arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylator mice: identity with arylhydroxamic acid N,O-acyltransferase and N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase. *Mol. Pharmacol.* **35**:599-609.
- McLennan I.S. y Lees G.J. (1978). Diurnal changes in the kinetic properties of tryptophan hydroxylase from rat brain. *J. Neurochem.* **31**:557-559.
- Menaker M. y Wisner S. (1983). Temperature-compensated circadian clock in the pineal of *Anolis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:6119-6121.

- Mendiola P. y De Costa J. (1990). The effects of pH and temperature on the kinetic properties of skeletal muscle lactate dehydrogenase from anuran amphibians. *J. Comp. Physiol. B*, **160**:105-111.
- Midgley A.R., Niswender G.D. y Rebar R.W. (1969). Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Acta Endocrinol. Suppl.* **142**:163-180.
- Miki N., Keirns J., Marcus F., Freeman J. y Bitensky, M.W. (1973). Regulation of cyclic nucleotide concentration in photoreceptors: an ATP dependent stimulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3820-3824.
- Miller L., Stier M. y Lovenberg W. (1980). Evidence for the presence of N-acetyl transferase in rat retina. *Comp. Biochem. Physiol.* **66C**:213-216.
- Miller R.F. y Schwartz E.A. (1983). Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina. *J. Physiol. (London)* **334**:325-349
- Miodoński A.J. y Bär T. (1987). The superficial vascular hyaloid system in the eye of the frogs, *Rana temporaria* and *Rana esculenta*. Scanning electron-microscopic study of vascular corrosion casts. *Cell Tissue Res.* **250**:465-473.
- Mondragon R. y Frixione E. (1989). Retinomotor movements in the frog retinal pigment epithelium: dependence of pigment migration on Na⁺ and Ca⁺⁺. *Exp. Eye Res.* **48**:589-603.
- Morgan I.G. (1992). What do amacrine cell do? En: "Progress in retinal research Vol. 11" (Eds: Osborne N.N. y Chader G.J.) Pergamon press. Oxford. Cap. 8. pp. 193-214.
- Morgan P.J., Lawson W. y Davidson G. (1991). Interaction of forskolin and melatonin on cyclic AMP generation in pars tuberalis cells of ovine pituitary. *J. Neuroendocrinol.* **3**:497-501.
- Morton D.J. (1982). Some properties of acetyl-CoA:arylamine N-acetyltransferase (E.C. 2.3.1.5.) from rat pineal gland. *South African J. Sci.* **78**:451-452.
- Morton D.J. (1986a). Mechanism of catalysis of bovine hydroxyindole-O-methyltransferase (E.C. 2.1.1.4) with various hydroxy substrates. *S. Afr. J. Sci.* **82**:272-273.
- Morton D.J. (1986b). Probable mechanism of catalysis of acetyl coenzyme A:arylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.5) from rat pineal gland. *South African J. Sci.* **82**:200-202.

- Morton D.J. (1987a). Effects of various cations on the activity of pineal gland N-acetyltransferase (EC 2.3.1.5) and hydroxyindole-O-methyltransferase (EC 2.1.1.4) in vitro. *J. Pineal Res.* 4:161-167.
- Morton D.J. (1987b). Hydroxyindole-O-methyltransferase catalyses production of methoxyindoles in rat pineal gland dependent on the concentration of hydroxy precursors and their affinity for the enzyme. *J. Endocr.* 115:455-458.
- Morton D.J. (1989). Possible mechanisms of inhibition and activation of rat N-acetyltransferase (EC 2.3.1.5) by cations. *J. Neural Transm.* 75:51-64.
- Morton D.J. y Forbes H.J. (1988). Pineal gland N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*): seasonal variation linked to photoperiod. *Neurosci. Lett.* 94:333-337.
- Morton D.J. y Kock N. (1990). Some properties of pineal gland hydroxyindole-O-methyltransferase from black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *J. Pineal Res.* 8:35-40.
- Namboodiri M.A.A., Brownstein M.J., Weller J., Voisin P. y Klein D.C. (1987). Multiple forms of arylalkylamine N-acetyltransferases in the rat pineal gland: purification of one molecular form. *J. Pineal Res.* 4:235-246.
- Namboodiri M.A.A., Dubbels R. y Klein D.C. (1987a). Arylalkylamine N-acetyltransferase from mammalian pineal gland. *Methods in Enzymology* 142:583-590.
- Namboodiri M.A.A., Nakai C. y Klein D.C. (1979). Effects of selected treatments on stability and activity of pineal serotonin N-acetyltransferase. *J. Neurochem.* 33:807-810.
- Namboodiri M.A.A., Weller J.L. y Klein D.C. (1980). Evidence on inactivation of pineal indoleamine N-acetyltransferase by protein thiol-disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 255:6032-6035
- Nawy S. y Jahr C.E. cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter. *Neuron* 7:677-683
- Neer E.J. y Clapham D.E. (1988). Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 333:129-134.
- Nguyen-Legros J. y Savy C. (1988). Dopamine innervation of the vertebrate retina: morphological studies. En: "Dopaminergic mechanisms in vision". pp. 1-17.
- Nieuwkoop P.D. y Faber J. (1967). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2ª Ed. North-holland published Company. Amsterdam.

- Nilsson S.E.G. (1964). Receptor cell outer segment development and ultrastructure of the disk membranes in the retina of the tadpole (*Rana pipiens*). *J. Ultrastr. Res.* **11**:581-620.
- Nilsson S.E.G. y Crescitelli F. (1970). A correlation of ultrastructure and function in the developing retina of the frog tadpole. *J. Ultrastr. Res.* **30**: 87-102.
- Nowak J.Z. (1988). Melatonin inhibits [³H]-dopamine release from the rabbit retina evoked by light, potassium, and electrical stimulation. *Med. Sci. Res.* **16**:1073-1075.
- Nowak J.Z. (1990). Control of melatonin formation in vertebrate retina. *Adv. Pineal Res.* **4**:81-90.
- Nowak J.Z., Sek B. y Zurawska E. (1990). Activation of dopamine D-2 receptors in hen retina decreases forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation and serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity. *Neurochem. Int.* **16**:73-80.
- Nowak J.Z., Zurawska E. (1989). Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity in hen retina and pineal gland: *in vivo* pharmacological induction at noon and antagonism of the light-evoked suppression at night. *Neurochem. Int.* **15**:567-573.
- Nowak J.Z., Zurawska E. y Zawilska J. (1988). Light-mediated regulation of serotonin synthesis and serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity in the rabbit retina. *Neurosci. Res. Commun.* **3**:47-54.
- Nowak J.Z., Zurawska E. y Zawilska J. (1989). Melatonin and its generating system in vertebrate retina: circadian rhythm, effect of environmental lighting, and interaction with dopamine. *Neurochem. Int.* **14**:397-406.
- O'Connor P., Dorison S.J., Wattling K.J. y Dowling J.E. (1986). Factors affecting release of ³H-dopamine from superfused carp retina. *J. Neurosci.* **6**:1857-1865.
- Ogden T.E., Mascetti G.G. y Pierantoni R. (1985). The outer horizontal cell of the frog: morphology, receptor input, and function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**:643-656.
- Ogolla F., Ferguson R.J., Kirilin W.G., Trinidad A., Andrews A.F., Mpezo M. y Hein D.W. (1990). Acetylase genotype-dependent expression of arylamine N-acetyltransferase and N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase in syrian inbred hamster intestine and colon. Identity with the hepatic acetylation polymorphism. *Drug Metabol. Disposition* **18**:680-685.
- Ohsako S. y Deguchi T. (1990). Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferase from human liver. *J. Biol. Chem.* **265**:4630-4634.

- Ohtomi M., Ichikawa T. y Deguchi T. (1990). Arylamine N-acetyltransferase from the chicken kidney: characterization of the enzyme and localization of the mRNA by in situ hybridization. *Biomed. Res.* **11**:263-267.
- Ohtomi M., Sasaki M. y Deguchi T. (1989). Two arylamine N-acetyltransferases from chicken pineal gland as identified by cDNA cloning. *Eur. J. Biochem.* **185**:253-261.
- Ohtomi M. y Deguchi T. (1990). Arylamine N-acetyltransferase activity in the chicken brain: regional distribution and diurnal variation. *Biomed. Res.* **11**:405-408.
- Okajima T.I.L., Pepperberg D.R., Ripps H., Wiggert B. y Chader, G.J. (1990). Interphotoreceptor retinoid-binding protein promotes rhodopsin regeneration in toad photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6907-6911.
- Olcese J. y De Vlaming V.L. (1979). Characteristics of monoamine oxidase activity in the hypothalamus of *Carassius auratus* as assayed by a fluorometric technique. *Comp. Biochem. Physiol.* **62C**:213-215.
- Olcese J. y Møller M. (1989). Characterization of serotonin N-acetyltransferase activity in the retina of the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Neurosci. Lett.* **102**:235-240.
- Osborne N.N. y Nesselhut T. (1983). Adrenaline: Occurrence in the bovine retina. *Neurosci. Lett.* **39**:33-36.
- Ostwald T.J. y Steinberg R.H. (1980). Localization of frog retinal pigment epithelium Na,K-ATPase. *Exp. Eye Res.* **31**:351-60.
- Oswald R.E., Schmidt D.E. y Freeman J.A. (1979). Assessment of acetylcholine as an optic nerve neurotransmitter in *Bufo marinus*. *Neuroscience* **4**:1129-1136.
- Ou C.Z. y Ebadi M. (1992). Pineal and retinal protein kinase C isoenzymes: Cooperative activation by calcium and zinc metallothionein. *J. Pineal Res.* **13**:17-26.
- Palczewski K. y Benovic J.L. (1991). G-protein coupled receptor kinases. *Trends Biochem. Sci.* **16**:387-391.
- Pang S.F., Cheng K.M., Allen A.E., Tsang C.W., Wong C.O. y Nichols C.R. (1989). Inherited changes in concentrations of retinal and serum melatonin in the chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**:427-436.
- Pang S.F., Chow P.H., Wong T.M. y Tso E.C.F. (1983). Diurnal variations of melatonin and N-acetylserotonin in the tissues of quails (*Coturnix sp.*), pigeons (*Columba livia*), and chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**:464-470.

- Pang S.F., Shiu S.Y.W. y Tse S.F. (1985). Effect of photic manipulation on the level of melatonin in the retina of frogs (*Rana tigrina regulosa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**:464-470.
- Pang S.F., Tsang C.W., Hong G.X., Yip P.C.Y., Tang P.L. y Brown G.M. (1990). Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging. *J. Pineal Res.* **8**:179-192.
- Pang S.F., Woo N.Y.S. Tang P.L. y Allen A.E. (1987). Differential effects of bilateral enucleation on serum melatonin: evidence for an endocrine retina in the fish and the hypothesis of a sensori-hormonal transducer. *Chin. J. Physiol. Sci.* **3**:341-349.
- Pang S.F. y Allen A.E. (1986). Extra-pineal melatonin in retina: its regulation and physiological function. *Pineal Res. Rev.* **4**:55-59.
- Pang S.F. y Yew, D.T. (1979). Pigment aggregation by melatonin in the retinal-pigment epithelium and choroid of guinea pig, *Cavia porcellus*. *Experientia* **45**:231-233.
- Pang S.F., Yu H.S., Suen H.C. y Brown G.M. (1980). Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J. Endocrinol.* **87**:89-93.
- Pang S.F., Yu H.S. y Tang P.L. (1981). A diurnal rhythm of N-acetyl-serotonin in the retina of rats. *Neurosci. Lett.* **21**:197-200.
- Pang S.F., Yu H.S. y Tang P.L. (1982). Regulation of melatonin in the retina of guinea pigs. Effects of environmental lighting. *J. Exp. Zool.* **222**:11-16.
- Parfitt A., Weller J.L. y Klein D.C. (1975). Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Mol. Pharmacol.* **11**:241-255.
- Patón D., Juarranz A., Sequeros E. Pérez-Campo R., López-Torres M. y Barja de Quiroga G. (1991). Seasonal age and sex structure of *Rana perezi* assessed by skeletochronology. *J. Herpetol.* **25**:389-394
- Pautler E.L. y Hall F.L. (1987). Movement of melatonin across the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* **45**:351-355.
- Pérez-Campo R., López-Torres M. y Barja de Quiroga G. (1990). Thermal acclimation, hydroperoxide detoxifying enzymes and oxidative stress in the lung and liver of *Rana perezi*. *J. Therm. Biol.* **15**:193-199.

- Perlman J.I., Nodes B.R. y Pepperberg D.R. (1982). Utilization of retinoids in the bullfrog retina. *J. Gen. Physiol.* **80**:885-913.
- Pévet P., Vivien-Roëls B., Masson-Pévet M., Steinlechner S., Skene D. y Canguilhem B. (1989). Melatonin, serotonin, 5-hydroxyindole-3-acetic acid and N-acetyltransferase in the pineal of the european hamster (*Cricetus cricetus*) kept under natural environmental conditions: lack of a day/night rhythm in melatonin formation in spring and early sum. *J. Pineal Res.* **6**:233-242.
- Pierce M.E., Barker D., Harrington J. y Takahashi J.S. (1989). Cyclic AMP-dependent mealtonin production in Y79 human retinoblastoma cells. *J. Neurochem.* **53**:307-310.
- Pierce M.E. y Besharse J.C. (1987). Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity. *Brain Res.* **405**:400-404.
- Pino R.M., Essner E. y Pino L.C. (1982). Localization and chemical composition of anionic sites in Bruch's membrane of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **30**:245-252.
- Pochet R., Pasteels B., Seto-Ohshima A., Bastianelli E., Kitajima S. y, Van Eldik L.J. (1991). Calmodulin and calbindin localization in retina from six vertebrate species. *J. Comp. Neurol.* **314**:750-762.
- Pomeranz B. (1972). Metamorphosis of frog vision: changes in glanglion cell physiology and anatomy. *Exp. Neurol.* **34**:381-199.
- Pratt B.L. y Takahashi J.S. (1987). Alpha-2 adrenergic regulation of melatonin release in chick pineal cell cultures. *J. Neurosci.* **7**:3665-3674.
- Pugh E.N. (1987). The nature and identity of the internal excitational transmitter of vertebrate phototransduction. *Ann. Rev. Physiol.* **49**:715-741.
- Pugh E.N. y Lamb T.D. (1990). Cyclic GMP and calcium: the internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors. *Vision Res.* **30**:1923-1948.
- Qu Z.I., Fertel r., Neff N.H. and Hadjiconstantinou M. (1989) Pharmacological characterization of rat retinal dopamine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**:621-625.
- Ravault J.P., Martinet L., Bonnefond C., Claustrat B. y Brun J. (1986). Diurnal variations of plasma melatonin concentrations in pregnant or Pseudopregnant mink (*Mustela vison*) maintained under different photoperiods. *J. Pineal Res.* **3**:365-373.

- Rawding R.S. y Hutchison V.H. (1992). Influence of temperature and photoperiod on plasma melatonin in the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *Gen. comp. Endocrinol.* **88**:364-374.
- Rayborn M.E., Bridges C.D., Landers R.A. y Hollyfield J.G. (1984). Synthesis, secretion, localization and immunoreactivity of interstitial retinol-binding protein in *Xenopus laevis*. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci. Suppl.* **25**:275.
- Rayborn M.E., Sarthy P.V., Lam D.M.K. y Hollyfield J.G. (1981). The emergence, localization and maturation of neurotransmitter systems during development of the retina in *Xenopus laevis*. II Glycine. *J. Comp. Neurol.* **195**:585-593.
- Redburn D.A. y Churchill, L. (1987). An indoleamine system in photoreceptor cell terminals of the Long-Evans rat retina. *J. Neurosci.* **7**:319-329.
- Redburn D.A. y Mitchell C.K. (1989) Darkness stimulates rapid synthesis and release of melatonin in rat retina. *Vis. Neurosci.* **3**: 391-403.
- Reeves P.T., Kinnear B.F., Minchin R.F. y Ilett K.F. (1991). Immunological evidence for N-acetyltransferase isozymes in the rabbit. *Molec. Pharmacol.* **39**:42-48.
- Reh T.A. (1986). Regulation of tyrosine hydroxylase-containing amacrine cell number in larval frog retina. *Develop. Biol.* **114**:463-469.
- Reiter R.J. (1984). Pineal indoles: production, secretion and actions: En:"Neuroendocrine Perspectives" (Eds: Muller R.M. y McLeod R.M.) Elsevier. Amsterdam. Vol. 3. pp.347-377.
- Reiter R.J. (1991). Pineal melatonin; cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **12**:151-180.
- Reiter R.J., King T.S., Steinlechner S., Steger R.W. y Richardson B.A. (1990). Tryptophan administration inhibits nocturnal N-Acetyltransferase activity and melatonin content in the rat pineal gland. Evidence that serotonin modulates melatonin production via a receptor-mediated mechanism. *Neuroendocrinology* **52**:291-296.
- Reiter R.J., Petterborg L., Philo R.C. (1979). Refractoriness in the antigonadotrophic effects of melatonin in male hamsters and its interruption by exposure of the animals to long photoperiods. *Life Sci.* **25**:1571-1576.
- Reppert S.M. Sagar S. M. (1983). Characterization of day-night variation of retinal melatonin content in chick. *Invest. Ophthalm. visual. Sci.* **24**:294-300.

- Reuss S., Spies C., Schröder H. y Vollrath L. (1990). The aged pineal gland: reduction in pinealocyte number and adrenergic innervation in male rats. *Exp. Gerontol.* **25**:183-188.
- Reuter T.E., White R.H. y Wald G. (1971). Rhodopsin and porphyropsin fields in the adult bullfrog retina. *J. Gen. Physiol.* **58**:351-371.
- Riebman J.B. y Binkley S. (1979). Regulation of pineal glands of chickens: organ culture. *Comp. Biochem. Physiol.* **63C**:93-98.
- Rodieck, R.W. (1973). Visual pigments: bleaching and regeneration. En:"The vertebrate retina. Principles of structure and function". (Eds: Kennedy, D. y Park, R.B) W.H. Freeman and Company. San Francisco. Cap. VIII. pp. 199-237.
- Rodríguez-Cabello J., Agapito M.T., García-Herrero I. y Recio J.M. (1989). Effects of EGTA and calmodulin, neutral thiol proteinases and protein kinase C inhibitors on loss of chicken pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *J. Comp. Physiol. B.* **159**: 583-588.
- Rodríguez-Cabello J., Arpa F., Agapito M.T., García-Herrero I. y Recio J.M. (1990a). Improved method for the measurement of chicken and rat pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *J. Pineal Res.* **9**:103-112.
- Rodríguez-Cabello J., Arpa F., Agapito M.T. y Recio J.M. (1990b). Opposite effects of EGTA and neutral surfactants on the loss of chicken pineal serotonin N-acetyltransferase. *J. Pineal Res.* **9**:243-249.
- Röhlich P., Szél A. y Papermaster D.S. (1989). Immunochemical reactivity of *Xenopus laevis* retinal rods and cones with several monoclonal antibodies to visual pigments. *J. Comp. Neurol.* **290**:105-117.
- Rome L.C., Stevens E.D. y John-Alder H.B. (1992). The influence of temperature and thermal acclimation on physiological function. En:"Environmental Physiology of the amphibians". (Eds:Feber, M.E. y Burggren W.W.) University of Chicago Press. Chicago. Cap. 8. pp. 183-205.
- Rudeen P.K., Creighton J.A., Bylund D.B., Petterborg L.J. y Paredes S. (1990). Effects of light and an alpha-2-adrenergic agonist on serotonin N-acetyltransferase activity in chick pineal gland. *J. Neural. Transm.* **82**:119-129.
- Santana C., Guerrero J.M., Reiter R.J. y Menendez-Pelaez A. (1989). Role of postsynaptic α -adrenergic stimulation of melatonin production in the syrian hamster pineal gland in organ culture. *J. Pineal Res.* **7**:13-22.

- Sarthy P.V., Rayborn M.E., Hollyfield J.G., y Lam D.M.K. (1981). The emergence, localization and maturation of neurotransmitter systems during the development of the retina in *Xenopus laevis*. III. Dopamine. *J. Comp. Neurol.* **195**:595-602.
- Sawada M. y Nagatsu T. (1988). Tryptophan hydroxylase activity in brain slices. *Int. J. Biochem.* **20**:1033-1038.
- Schiller P.H. (1992). The ON and OFF channels of the visual system. *Trends Neurosci.* **15**:86-92.
- Schnetkamp P.P.M., Basu D.K., Li X.B. y Szerencsei R.T. (1991). Regulation of intracellular free Ca^{2+} concentration in the outer segments of bovine retinal rods by Na-Ca-K exchange measured with fluo-3. II. Thermodynamic competence of transmembrane Na^{+} and K^{+} gradients and inactivation of Na^{+} -dependent Ca^{2+} extrusion *J. Biol. Chem.* **266**:22983-22990.
- Schwartz E.A. (1982). Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina. *J. Physiol. (London)* **323**:211-227.
- Shibuya H., Toru M., y Watanabe S. (1978). A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res.* **138**:364-368.
- Siuciak J.A., Gamache P.H. y Dubocovich, M.L. (1992). Monoamines and their precursors and metabolites in the chicken brain, pineal, and retina: regional distribution and Day/Night variations. *J. Neurochem.* **58**:722-729.
- Skene D.J., Vivien-Roëls B., Sparks D.L., Hunsaker J.C., Pévet P., Ravid D., Swaab D.F. (1990). Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain Res.* **528**:170-174.
- Skene D.J., Vivien-Roëls B. y Pévet, P. (1991). Day and nighttime concentrations of 5-methoxytryptophol and melatonin in the retina and pineal gland from different classes of vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**:405-411.
- Slaughter M.M. y Miller R.F. (1981). 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science* **219**:1230-1232.
- Slaughter M.M. y Miller R.F. (1983a). The role of excitatory aminoacid transmitters in the mudpuppy retina: an analysis with kainic acid and N-methylaspartate. *J. Neurosci.* **3**:1701-1711.
- Slaughter M.M. y Miller R.F. (1983b). Bipolar cells in the mudpuppy retina use an excitatory amino acid neurotransmitter. *Nature* **303**:537-538.

- Smiley J.F. y Basinger S.F. (1990). Glycine stimulates calcium-independent release of ^3H -GABA from isolated retinas of *Xenopus laevis*. *Visual Neurosci.* 4:337-348.
- Smiley J.F. y Yazulla S. (1990). Glycinergic contacts in the outer plexiform layer of the *Xenopus laevis* retina characterized by antibodies to glycine, GABA, and glycine receptors. *J. Comp. Neurol.* 299:375-388.
- Smith T.J. (1990). Phylogenetic distribution and function of arylalkylamine N-acetyltransferase. *Bioessays* 12:30-33.
- Sokal R.R. y Rohlf F.J. (1979). *Biometria. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.* Ediciones Blume. Madrid. pp. 331-378.
- Somero G.N. (1978). Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 9:1-29.
- Steinlechner S., Buchberger A. y Heldmaier G. (1987). Circadian rhythms of pineal N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, in response to seasonal changes of natural photoperiod. *J. Comp. Physiol. A* 160:593-597.
- Steinlechner S., Champney T.H., Houston M.L. y Reiter R.J. (1984). Simultaneous determination of N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin content in the pineal gland of the syrian hamster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175:93-97.
- Stieglitz A., Steinlechner S., Ruf T. y Heldmaier G. (1991). Cold prevents the light induced inactivation of pineal N-acetyltransferase in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J. comp. Physiol. A* 168:599-603.
- Stokkan K.A., Nonaka K.O., Lerchl A., Vaughan M.K. y Reiter R.J. (1991). Low temperature stimulates pineal activity in syrian hamsters. *J. Pineal Res.* 10:43-48.
- Stone S., Witkovsky P. y Schütte M. (1990). A chromatic horizontal cell in the *Xenopus* retina: intracellular staining and synaptic pharmacology. *J. Neurophysiol.* 64:1683-1694.
- Strange P.G. (1988) The structure and mechanism of neurotransmitter receptor. *Biochem. J.* 249:309-325.
- Straznický C., Toth P. y Nguyen V.S. (1990). Morphological classification and retinal distribution of large ganglion cells in the retina of *Bufo marinus*. *Exp. Brain Res.* 79:345-356.
- Straznický C. y Hiscock J. (1984). Post-metamorphic retinal growth in *Xenopus*. *Anat. Embryol.* 169:103-109.

- Sugden D. (1990). 5-Hydroxytryptamine amplifies β -adrenergic stimulation of N-acetyltransferase activity in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* **55**:1655-1658.
- Sugden D., Ceña V., Klein D.C. (1987). Hydroxyindole-O-methyltransferase. *Methods Enzymol.* **142**:590-596.
- Sugden D., Namboodiri M.A.A., Weller J.L. y Klein D.C. (1983). Melatonin synthesizing enzymes: serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase. En: "Methods in biogenic amine Research". (Eds: Parvez S., Nagatsu T., Nagatsu I., Parvez H.). Elsevier Science Publisiers. Cap. 25 pp. 567-572.
- Sugden D., Namboodiri M.A.A., Weller J.L. y Klein D.C. (1983). Melatonin synthesizing enzymes: serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase. En: "Methods in biogenic amine Research". (Eds: Parvez S., Nagatsu T., Nagatsu I. y Parvez H.). Elsevier Science Publisiers. Cap. 25. pp. 567-572.
- Sugden D. y Klein D.C. (1983). Adrenergic stimulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyl-transferase. *Brain Res.* **265**:348-351.
- Takahashi J.S. y Menaker M. (1984). Multiple redundant circadian oscillators within the isolated avian pineal gland. *J. Comp. Physiol. A* **154**:435-440.
- Takemoto D.J. y Cunnick J.M. (1990). Visual transduction in rod outer segments. *Cell. Signalling* **2**:99-104.
- Tanaka J.C., Eccleston J.F. y Furman R.E. (1989). Photoreceptor channel activation by nucleotide derivatives. *Biochemistry* **29**:2776-2784.
- Tang P.L. y Pang S.F. (1988). The ontogeny of pineal and serum melatonin in male rats at mid-light and mid-dark. *J. Neural Transm.* **72**:43-53.
- Taylor A.C. y Kollros J. (1946). Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* **94**:7-23.
- Thomas K.B. y Iuvone P.M. (1991). Circadian rhythm of tryptophan hydroxylase activity in chicken retina. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**:511-52
- Thomas K.B., Zawilska J. y Iuvone P.M. (1990). Arylalkylamine (serotonin) N-acetyltransferase assay using High-performance liquid chromatography with fluorescence or electrochemical detection of N-acetyltryptamine. *Anal. Biochem.* **184**:228-234.
- Thompson W.J. (1991). Cyclic nucleotide phosphodiesaterases: pharmacology, biochemistry and function. *Pharmac. Ther.* **51**:13-33.

- Torres G. y Lytle L.D. (1990). Light affects neonatal rat pineal gland N-acetyltransferase activity by an extra-retinal mechanism. *J. Neural. Transm.* **80**:67-77.
- Tóth P. y Straznický C. (1989a). Biplexiform ganglion cells in the retina of *Xenopus laevis*. *Brain Res.* **499**:378-382.
- Tóth P. y Straznický C. (1989b). Dendritic morphology of identified retinal ganglion cells in *Xenopus laevis*: a comparison between the results of horseradish peroxidase and cobaltic-lysine retrograde labelling. *Arch. Histol. Cytol.* **52**:87-93.
- Tsukamoto Y. (1987). Morphometrical features of rod outer segments in relation to visual acuity and sensitivity in the retina of *Rana catesbeiana*. *Zool. Sci.* **4**:233-242.
- Tunner H.G. y Heppich-Tunner S. (1991). Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog. *Naturwissenschaften* **78**:32-34.
- Uchiyama H., Reh T.A. y Stell W.K. (1988). Immunocytochemical and morphological evidence for a retinopetal projection in anuran amphibians. *J. Comp. Neurol.* **274**:48-59.
- Underwood H. (1985). Pineal melatonin rhythms in the lizard *Anolis carolinensis*: effects of light and temperature cycles. *J. Comp. Physiol. A* **157**:57-65.
- Underwood H. y Siopes T. (1985). Melatonin rhythms in quail: regulation by photoperiod and circadian pacemakers. *J. Pineal Res.* **2**:133-143.
- Underwood H., Binkley S., Siopes T. y Mosher K. (1984). Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies and blood of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**:70-81.
- Underwood H. y Calaban M. (1987). Pineal melatonin rhythms in the lizard *Anolis carolinensis*. I. Response to light and temperature cycles. *J. Biol. Rhythms* **2**:179-193.
- Urueña G. y Hall T.R. (1982). Characteristics of monoamine oxidase activity in brain and other organs of the adult bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comp. Biochem. Physiol.* **71C**:95-100.
- van Camp G., Ravault J.P., Falcón J., Collin J.P. y Voisin P. (1991). Regulation of melatonin release and N-acetyltransferase activity in ovine pineal cells. *J. Neuroendocrinol.* **3**:477-481.
- Vaněček J., Jansky L., Illnerová H. y Hoffmann K. (1984). Pineal melatonin in hibernating and aroused golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* **77**:759-762.

- Vaněček J. y Illnerová H. (1980). Some characteristics of the night N-acetyltransferase in the rat pineal gland. *J. Neurochem.* **35**:1455-1457.
- Vivien-Roëls B. (1985). Interactions between photoperiod, temperature, pineal and seasonal reproduction in non-mammalian vertebrates. En: *The Pineal Gland. Current state of pineal research.* (Eds. B. Mess, Cs. Rúzsás, L. Tima y P. Pévet). Elsevier. pp. 187-209.
- Vivien-Roëls B., Arendt J., y Bradtke J. (1979). Circadian and circannual fluctuations of pineal indoleamines (serotonin and melatonin) in *Testudo hermanni* Gmelin (Reptilia, Chelonia). *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**:197-210.
- Vivien-Roëls B., Pévet P., Dubois M.P., Arendt J. y Brown G.M. (1981). Immunohistochemical evidence for the presence of melatonin in the pineal gland, the retina and the Harderian gland. *Cell. Tissue Res.* **217**:105-115.
- Vivien-Roëls B., Pévet P. y Claustrat B. (1988). Pineal and circulating melatonin rhythms in the box turtle, *Terrapene carolina triunguis*: effect of photoperiod, light pulse and environmental temperature. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**:163-173.
- Voaden M.J., Marshall J. y Murani N. (1974). The uptake of [³H]γ-aminobutyric acid and [³H]glycine by isolated retina of the frog. *Brain Res.* **67**:115-132.
- Voigt T. y Wassle H. (1987). Dopaminergic innervation of A II amacrine cells in mammalian retina. *J. Neurosci.* **7**:4115-4128.
- Voisin P., Namboodiri M.A.A. y Klein D.C. (1984). Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J. Biol. Chem.* **259**:10913-10918.
- Voisin P., van Camp G. y Collin J.P. (1990). N-acetylation of serotonin is correlated with α₂- but not with β-adrenergic regulation of cyclic AMP levels in cultured chick pineal cells. *J. Neurochem.* **54**:1953-1960.
- Vollrath L. y Welker H.A. (1988). Atypical 24-hour rhythms of serotonin N-acetyltransferase activity in the rat pineal gland. *Chronobiol. Int.* **5**:115-120.
- Wainwright S.D. (1979). Developmental of hydroxyndole-O-methyltransferase activity in the retina of chick embryo and young chick. *J. Neurochem.* **32**:1099-1101.
- Wainwright S.D. y Wainwright L.K. (1979). Chick pineal serotonin acetyltransferase: a diurnal cycle maintained in vitro and its regulation by light. *Can. J. Biochem.* **57**:700-709.

- Wainwright S.D. y Wainwright L.K. (1984). Relationship between cycles in level of serotonin N-acetyltransferase activity and cyclic GMP content of cultured chick pineal glands. *J. Neurochem.* **43**:358-363.
- Walsh P.J. y Somero, G.N. (1982). Interactions among pyruvate concentration, pH, and K_M of pyruvate in determining in vivo Q_{10} values of the lactate dehydrogenase reaction. *Can. J. Zool.* **60**:1293-1299.
- Webb S.M., Champney T.H., Steger R.W., Vaughan M.K. y Reiter R.J. (1986) Cysteamine effects on somatostatin, catecholamines, pineal NAT and melatonin in rats. *Brain Res. Bull.* **16**:315-320.
- Weissbach H., Redfield B.G. y Axelrod J. (1960). Biosynthesis of melatonina; enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim. Biophys. Acta* **43**:352-353
- Wiechmann A.F. (1986). Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Exp. Eye Res.* **42**:507-527.
- Wiechmann A.F., Bok D. y Horwitz J. (1985). Localization of hydroxyindole-O-methyltransferase in the mammalian pineal gland and retina. *Invest. Ophthalm. Visual Sci.* **26**:253-265.
- Wiechmann A.F., Hollyfield J.G. (1989). HIOMT-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. *Exp. Eye Res.* **49**:1079-1095.
- Wiechmann A.F. y Wirsig-Wiechman C.R. (1991). Localization and quantification of high-affinity melatonin binding sites in *Rana pipiens* retina. *J. Pineal Res.* **10**:174-179.
- Wilkinson G.N. (1961). Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* **80**:324-332.
- Witkovsky P., Stone S., Besharse J.C. (1988a). The effects of dopamine and related ligands on photoreceptor to horizontal cell transfer in the *Xenopus* retina. *Biomed. Res. Suppl.* **9**:93-107.
- Witkovsky P., Stone S. y Besharse J.C. (1988b). Dopamine modifies the balance of rod and cone inputs to horizontal cells of the *Xenopus* retina. *Brain Res.* **449**:332-336.
- Witkovsky P. y Dearry A. (1992). Functional roles of dopamine in the vertebrate retina. En "Progress in retinal Research" (Eds: Osborne N.N. y Chader G.J.). Vol. 11 Cap. 10 pp. 247-292
- Witkovsky P. y Schütte M. (1991). The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas. *Visual Neurosci.* **7**:113-124.

- Witkovsky P. y Shi W.P. (1990). Slow light and dark adaptation of horizontal cells in the *Xenopus* retina: a role for endogenous dopamine. *Visual Neurosci.* 5:405-413.
- Wright M.L., Cykowski L.J., Mayrand S.M., Blanchard L.S., Kraszewska A.A., Gonzales T. y Patnaude M. (1991). Influence of melatonin on the rate of *Rana pipiens* tadpole metamorphosis *in vivo* and regression of Thyroxine-Treated tail tips *in vitro*. *Develop. Growth Differ.* 33:243-249.
- Wright M.L., Jorey S.T., Blanchard L.S. y Basso C.A. (1988). Effect of a light pulse during the dark on photoperiodic regulation of the rate of thyroxine-induced, spontaneous, and prolactin-inhibited metamorphosis in *Rana pipiens* tadpoles. *J. exp. Zool.* 247:99-108.
- Wu S.M. (1991). Signal transmission and adaptation-induced modulation of photoreceptor synapses in the retina. *Prog. Retinal Res.* 10:27-44.
- Yamada T., Brecha N., Rosenquist G. y Basinger S. (1981). Cholecystokinin-like immunoreactivity in frog retina: localization, characterization and biosynthesis. *Peptides* 2 (Suppl. 2), 93-97.
- Yamada T., y Basinger S. (1982). Biosynthesis of somatostatin-like immunoreactivity by frog retinas *in vitro*. *J. Neurochem.* 39:1539-1546.
- Yamazaki A. (1992). The GTP-binding protein-dependent activation and deactivation of cyclic GMP phosphodiesterase in rod photoreceptors. *Adv. Second Messen. Phosphoprot. Res.* 25:135-145.
- Yang C.Y., Lin Z.S. y Yazulla, S. (1992). Localization of GABA_A receptor subtypes in the tiger salamander retina. *Visual Neurosci.* 8:57-64.
- Yang X.L. y Wu S.M. (1991). Coexistence and function of glutamate receptor subtypes in the horizontal cells of the tiger salamander retina. *Visual Neurosci.* 7:377-382.
- Yu H.S., Pang S.F., Tang P.L. y Brown G.M. (1981). Persistence of circadian rhythms of melatonin and N-acetylserotonin in the serum of rats after pinealectomy. *Neuroendocrinology* 32:262-265.
- Yuwiler A., Klein D.C., Buda M., Weller J.L. (1977). Adrenergic control of pineal N-acetyltransferase activity: developmental aspects. *Am. J. Physiol.* 233:E141-146
- Zachmann A., Knijff S.C.M., Bolliet V. Ali M.A. (1991). Effects of temperature cycles and photoperiod on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of a teleost (*Catostomus commersoni*) *in vitro*. *Neuroendocrinol. Lett.* 12:325-330.

- Zatz M., Mullen D.A. y Moskal J.R. (1988). Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: effects of light, dark, and potassium on the melatonin rhythm. *Brain Res.* **438**:199-215.
- Zawilska J. y Iuvone P.M. (1990). Alpha-2 adrenergic activity of bromocriptine and quinpirole in chicken pineal gland. Effects on melatonin synthesis and [³H]Rauwolscine binding. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* **255**:1047-1052.
- Zawilska J.B. y Iuvone P.M. (1989) Catecholamine receptors regulating serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content of chicken retina and pineal gland: D₂-dopamine receptors in retina and alpha-₂ adrenergic receptors in pineal gland. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**:86-92.
- Zawilska J.B. y Nowak J.Z. (1992). Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem. Int.* **20**:23-36.
- Zeman M. Gwinner E. y Somogyiová E. (1992). Development of melatonin rhythm in the pineal gland and eyes of chick embryo. *Experientia* **48**:765-768.
- Zeman M. y Illnerová H. (1988). Rapid adjustment of the pineal N-acetyltransferase rhythm to change from long to short photoperiod in the japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Pineal Res.* **5**:565-571.
- Zemdegs I.Z., McMillen I.C., Walker D.W., Thorburn G.D. y Nowak R. (1988). Diurnal rhythms in plasma melatonin concentration in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Endocrinology* **123**:284-289.
- Zhang Y. y Straznický C. (1991). The morphology and distribution of photoreceptors in the retina of *Bufo marinus*. *Anat. Embryol.* **183**:97-104.
- Zhu B., Hiscock J. y Straznický C. (1990). The changing distribution of neurons in the inner nuclear layer from metamorphosis to adult: a morphometric analysis of the anuran retina. *Anat. Embryol.* **181**:585-594.
- Zhu B. y Straznický C. (1990a). Dendritic morphology and retinal distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive amacrine cells in *Bufo marinus*. *Anat. Embryol.* **181**:365-371.
- Zhu B. y Straznický C. (1990b). Morphology and distribution of serotonin-like immunoreactive amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*. *Visual Neurosci.* **5**:371-378.
- Zisapel N., Egozi Y., Laudon M. (1985). Circadian variations in the inhibition of dopamine release from adult and newborn rat hypothalamus by melatonin. *Neuroendocrinology* **40**:102-108.

Los resultados correspondientes a la descripción del método de valoración de la actividad NAT y los trabajos correspondientes al efecto de la temperatura sobre cinética de la NAT y la aclimatación térmica han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

J. Neurochem. 58: 587-592 (1992)

Neurosci. Lett. 142:187-190 (1992)

Neurosci. Lett. (en prensa) (1993)