

Tesis de Posgrado

Estudio de la participación de la melatonina en la fisiología de la retina de Hámster Dorado

Faillace, María Paula

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Faillace, María Paula. (1996). Estudio de la participación de la melatonina en la fisiología de la retina de Hámster Dorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2854_Faillace.pdf

Cita tipo Chicago:

Faillace, María Paula. "Estudio de la participación de la melatonina en la fisiología de la retina de Hámster Dorado". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2854_Faillace.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA
MELATONINA EN LA FISIOLÓGÍA DE LA
RETINA DE HÁMSTER DORADO**

Trabajo de Tesis presentado para optar al título de Doctor de
la Universidad de Buenos Aires

AUTORA:
MARÍA PAULA FAILLACE

DIRECTORA:
DRA. RUTH E. ROSENSTEIN

CO-DIRECTOR:
DR. DANIEL P. CARDINALI

LUGAR DE TRABAJO:
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA. FACULTAD DE MEDICINA.
UBA

1996

PALABRAS CLAVES: RETINA - HAMSTER DORADO - MELATONINA -
REGULACIÓN FÓTICA - ROL FISIOLÓGICO

#295
42

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**PARTICIPATION OF MELATONIN IN THE
PHYSIOLOGY OF THE GOLDEN HAMSTER
RETINA**

Ph. D. Dissertation

AUTHOR:
MARIA PAULA FAILLACE

DIRECTOR:
DR. RUTH E. ROSENSTEIN

CO-DIRECTOR:
DR. DANIEL P. CARDINALI

WORK ADDRESS:
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY. SCHOOL OF MEDICINE.
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1996

KEY-WORDS: RETINA - MELATONIN - GOLDEN HAMSTER - PHOTIC
REGULATION - PHYSIOLOGICAL ROLE

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel P. Cardinali, quien me permitió ingresar a su laboratorio, formar parte de uno de sus grupos de trabajo y me brindó su capacidad y experiencia científica, así como su colaboración y sentido crítico en toda oportunidad en que fue requerido.

A la Dra. Ruth E. Rosenstein, quien me formó científicamente tanto en el marco teórico como experimental, dirigió y compartió cada momento de la realización de este trabajo de tesis, siendo su principal generadora y aportando su gran capacidad e indiscutible sentido crítico.

A María Inés, por compartir cada uno de los experimentos de este trabajo y enseñarme muchas más cosas de las que se imagina.

A todos los compañeros del laboratorio, por los buenos y malos momentos que pasamos juntos: Bea, Guille, Marcelo, Fabián, Valeria, Diego, Paola, Ruth, Inés, Rosalía, Salvador, Nacho, Lidia, Kalpa, Rodolfo, Graciela, Javier, Adriana, Leonardo, Jorgito, Sandra, Alexis, Felipe, Marta, María Luisa, Irene.

A mis compañeros y amigos de la Facultad: Alejandra, Adriana, Manuel, Adrián, Pato, Marina, Sandra, Guillermo, Diana, Gabriela, Mariana, Mariel, Andrea, Yvette.

A Rubén Dezi, por los pasos iniciales en la fisiología.

A la gente de los laboratorios vecinos con los que compartí docencia, materias, congresos o salidas: Edgard, Martín, Dany, Mariana, Faby, Guille, Gustavo, Luis, Kuei, Roxana, Pablo, Gaby, Haydée, Eleonora, Marcelo, Darío y a todos los otros Medinas, Uchiteles y chicas del 5^{to}.

A mi querida familia: Mamá, Papá, María Martha, Ale, Rodo, Paty,
Claudia y Marcelo.

A la nueva generación: Agus, Jopi y Bianca.

A mis primos y tíos (por el idioma de infancia).

A "la amiga" Liliana.

A mis amigas Karina y Chachi.

A Haydée, con el mejor de los recuerdos.

A Rudy que me soportó durante la confección de la Tesis (además).

A los amigos de antes y de ahora.

A los que amablemente leyeron y criticaron (en el buen sentido) este trabajo de tesis.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina (Universidad de Buenos Aires) donde realicé mi trabajo científico y docente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas otorgadas, que permitieron mi subsistencia durante la realización de este trabajo de Tesis.

A la Fundación Antorchas y a la Fundación Roemmers, por el otorgamiento de subsidios que permitieron el desarrollo de este trabajo.

A Papá y Mamá

A Rudy

A María Martha, Rodo y Ale.

ÍNDICE

RESUMEN	15
SUMMARY	17
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	23
I. LA RETINA	25
I.1. Anatomía de la retina	25
I.2. Mecanismo de Fototransducción	29
I.3. Mecanismos regulatorios de la Fototransducción	33
I.4. Procesado de la información fótica	36
II. EL GABA EN LA RETINA	41
III. LA MELATONINA	44
III.1. Biosíntesis y metabolismo de la melatonina	45
III.2. La melatonina en la retina de vertebrados	47
III.3. Regulación de la melatonina retiniana	51
III.4. Reloj circadiano intraocular	57
III.5. Funciones de la melatonina en la retina	59
III.6. Mecanismo de acción de la melatonina	63
III.6.a. Mecanismos intracelulares involucrados en la respuesta a la melatonina.	68
IV. OBJETIVOS	73
MATERIALES Y MÉTODOS	75
Animales y tejidos	77
Cirugía	77

Determinación del contenido de melatonina	78
Determinación de la síntesis <i>in vitro</i> de melatonina	79
Determinación del contenido de AMPc y GMPc	79
RIA de AMPc	81
RIA de GMPc	81
Determinación de las actividades guanilato ciclasa y fosfodiesterasa	82
Ensayo de la actividad de guanilato ciclasa	82
Ensayo de la actividad de fosfodiesterasa	83
Determinación de la actividad de óxido nítrico sintetasa	83
Determinación del "turnover" de GABA	84
Determinación de la captación de [³ H]-glutamato	85
Determinación de la liberación de [³ H]-glutamato	85
Determinación de la captación de [⁴⁵ Ca ²⁺]	86
Ensayo de la unión específica de 2-[¹²⁵ I]melatonina	87
Análisis estadístico	88
RESULTADOS	89
I. BIOSÍNTESIS DE MELATONINA EN LA RETINA DEL HÁMSTER DORADO.	91
I.1.a. Variaciones diarias en el contenido de melatonina retiniana.	91
I.1 b. Variaciones diarias en el contenido de AMPc retiniano.	92
I.2. Determinación del origen del contenido de melatonina en la retina.	93
I.2.a. Efecto de la pinealectomía sobre el contenido de melatonina retiniana. Estudio <i>ex vivo</i> .	94
I. 2.b. Producción de melatonina retiniana. Estudio <i>in vitro</i> .	95
I. 3. Efectos del estímulo fótico sobre el contenido de melatonina y AMPc.	96
I. 3. a. Efecto de la luz durante la noche.	96
I. 3. b. Efecto de la oscuridad durante el día.	97
I. 4. Efecto de la oscuridad constante sobre los niveles de melatonina retiniana.	99

I. 5. Efecto del GABA sobre la producción <i>in vitro</i> de melatonina retiniana.	101
I. 5.a. Efecto del GABA en condiciones de luz.	101
I. 5.b. Efectos de antagonistas gabaérgicos en oscuridad.	103
I. 6. Variación diaria en el "turnover de GABA".	104
I. 7. Mecanismo de acción del GABA en la inducción de la síntesis de melatonina.	105
I. 7.a. Efecto del GABA sobre el contenido acumulado <i>in vitro</i> de AMPc.	105
I. 7.b. Efecto del GABA sobre el contenido acumulado <i>in vitro</i> de GMPc.	106
I. 8.a. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la producción <i>in vitro</i> de melatonina.	107
I. 8.b. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la producción <i>in vitro</i> de melatonina en función del tiempo de incubación.	108
I. 9.a. Variaciones diarias en los niveles de GMPc retinianos.	109
I. 9.b. Efecto de la señal fótica sobre los niveles retinianos de GMPc durante la noche.	110
II. EFECTOS DE LA MELATONINA EN LA RETINA DEL HÁMSTER DORADO.	111
II. 1. Efectos de la melatonina sobre el sistema de GMPc retiniano.	111
II. 1.a. Efecto de la melatonina sobre el contenido acumulado <i>in vitro</i> de GMPc.	112
II. 1.b. Efecto de la melatonina sobre la síntesis de GMPc retiniano.	113
II. 1.c. Análisis cinético de la actividad guanilato ciclasa. Efecto de la melatonina.	114
II. 1.d. Variación diaria de la actividad de guanilato ciclasa retiniana.	116
II. 1.e. Análisis cinético de la actividad de guanilato ciclasa. Diferencias horarias.	117
II. 1.f. Efecto de la melatonina sobre la actividad de óxido nítrico sintetasa retiniana.	118

II. 1.g. Efecto de la melatonina sobre la degradación de GMPc retiniano.	119
II. 1.h. Efecto de la melatonina y el IBMX sobre la actividad de fosfodiesterasa.	121
II. 1.i. Variación diaria de la actividad fosfodiesterasa retiniana.	122
II. 1.j. Efectos de la señal fótica sobre las actividades de guanilato ciclasa y fosfodiesterasa retinianas.	123
II. 2. Efectos <i>in vitro</i> de la melatonina sobre la transmisión glutamatérgica retiniana.	124
II. 2.a. Efecto de la melatonina sobre la recaptación de [³ H]-glutamato.	124
II. 2.b. Efecto de la melatonina sobre la liberación de [³ H]-glutamato.	126
II. 3.a. Efecto de la melatonina sobre la captación de [⁴⁵ Ca ²⁺]	129
II. 3.b. Efecto de la melatonina sobre la captación de [⁴⁵ Ca ²⁺] en función del horario.	130
II. 4. Efectos de análogos de GMPc sobre la transmisión glutamatérgica retiniana.	132
II. 4.a. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la captación de [³ H]-glutamato.	132
II. 4.b. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la liberación de [³ H]-glutamato.	133
II. 4.c. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la captación de [⁴⁵ Ca ²⁺].	134
II. 5. Estudio de la unión específica de 2-[¹²⁵ I]melatonina a membranas de retina.	135
II. 5.a. Análisis de Scatchard de la unión específica de 2-[¹²⁵ I]melatonina.	135
II. 5.b. Curso temporal de asociación y disociación de la unión específica de 2-[¹²⁵ I]melatonina.	136
II. 5.c. Caracterización farmacológica del sitio de unión a 2-[¹²⁵ I]melatonina.	138
II. 5.d. Efecto de los nucleótidos de guanina y adenina sobre la unión específica de 2-[¹²⁵ I]melatonina.	139

II. 6. Efecto de la melatonina sobre el contenido acumulado <i>in vitro</i> de AMPc retiniano.	140
II. 7.a. Variación diaria de la unión específica de 2-[¹²⁵ I]melatonina en la retina.	141
II. 7.b. Análisis de Scatchard de la unión de 2-[¹²⁵ I]melatonina a las 12.00 y 24.00 h.	142
DISCUSIÓN	145
I. BIOSÍNTESIS DE MELATONINA EN LA RETINA.	147
Esquema de la regulación de la síntesis de melatonina	161
II. EFECTOS DE LA MELATONINA EN LA RETINA.	163
Esquema de los efectos de la melatonina retiniana	181
III. CONSIDERACIONES FINALES.	183
CONCLUSIONES GENERALES	187
BIBLIOGRAFÍA	191

RESUMEN

La melatonina caracterizada originalmente en la glándula pineal fue más tarde identificada en la retina de diversas especies, así como las enzimas involucradas en su síntesis, la serotonina-N-acetiltransferasa (NAT) y la hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT). El hámster dorado ha sido considerado frecuentemente el modelo clásico para el estudio de la melatonina pineal, sin embargo, la melatonina retiniana en esta especie ha recibido relativamente poca atención. El objetivo de este trabajo de tesis consistió en examinar la biosíntesis del metoxiindol en la retina del hámster, así como elucidar algunos de los mecanismos involucrados en la regulación de su síntesis y su posible rol fisiológico a nivel local.

En este sentido, se describe por primera vez la presencia de un ritmo en el contenido retiniano de melatonina en el hámster dorado, con valores máximos en la segunda mitad de la noche. La síntesis de melatonina en la retina del hámster es independiente de la actividad pineal. Asimismo, se demuestra la capacidad de las retinas aisladas de sintetizar melatonina. La síntesis de melatonina es regulada directamente por la señal fótica ambiental, sin indicación de la existencia de un ritmo de naturaleza endógena en los experimentos realizados en este trabajo. El GABA, postulado como un neurotransmisor retiniano regulador de procesos asociados a oscuridad, estimula la producción *in vitro* de melatonina retiniana, probablemente a través de receptores de tipo A, en tanto que antagonistas específicos del receptor GABA_A suprimen el incremento *in vitro* de melatonina en oscuridad. El "turnover" de GABA es máximo en la fase de oscuridad y precede al aumento en el contenido de melatonina. En conjunto, estas evidencias sugieren que el GABA actúa como intermediario entre la señal de oscuridad y la inducción de la síntesis del metoxiindol.

El AMPc ha sido postulado como la señal intracelular involucrada en la inducción génica de la NAT retiniana. La existencia de una correlación temporal entre el ritmo en el contenido de AMPc y el de melatonina (ambos regulados de manera análoga por la señal fótica ambiental) avala resultados previos. Sin embargo, en este trabajo se postula adicionalmente que el GMPc participa en la regulación de la síntesis de melatonina retiniana, tanto por sus efectos *in vitro*, como por la correlación temporal entre las variaciones diarias de ambas moléculas. Considerando que el GABA estimula la acumulación de GMPc, pero inhibe la de AMPc, se sugiere que el efecto gabaérgico sobre la síntesis de

melatonina podría estar mediado por el incremento en los niveles de GMPc retinianos.

Por otra parte, se demuestra que la melatonina estimula la producción de GMPc, a través de una acción dual sobre la síntesis y degradación, ambos efectos tendientes al incremento en los niveles del nucleótido cíclico. La activación de la enzima de síntesis, así como la inhibición de la enzima de degradación podrían ocurrir a través de la disminución de los niveles de calcio citoplasmático. En este sentido, la melatonina inhibe en forma inmediata (luego de 10 seg) la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en fracciones sinaptosomales crudas.

La melatonina incrementa la captación de ^3H -glutamato, a través de un mecanismo independiente del calcio extracelular, así como la liberación de ^3H -glutamato, por un mecanismo dependiente del catión. La exposición más prolongada a melatonina (durante 20 min) estimula la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por fracciones crudas sinaptosomales. Considerando que análogos permeables del GMPc provocan efectos similares a los de la melatonina sobre estos parámetros, el metoxiindol podría actuar a través del incremento en el contenido del nucleótido.

En este trabajo de tesis, se describe también la presencia de receptores específicos, de alta afinidad, con un perfil farmacológico compatible con el descrito para receptores de melatonina de tipo ML-1. Los resultados sugieren además que estos receptores podrían estar acoplados con una proteína G inhibitoria. De este modo, la melatonina disminuye significativamente los niveles retinianos de AMPc, quien a su vez podría actuar como un segundo mensajero del metoxiindol y/o regular negativamente su propia síntesis.

En todos los casos, los efectos de la melatonina fueron dependientes del horario, mostrando una alta correlación con la variación diaria en la concentración de receptores al metoxiindol. La densidad máxima se observó a la medianoche, coincidiendo con el horario de máxima sensibilidad. La variación diaria en la concentración de sitios receptores podría deberse a mecanismos de "up y down-regulation" inducidos por el ligando endógeno.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten postular la participación de la melatonina retiniana en los mecanismos de transducción y procesado de la información fótica como una señal "senso-parácrina", es decir una molécula sintetizada y liberada por los fotorreceptores en respuesta a un estímulo sensorial (la oscuridad) y que actúa localmente modulando diversos aspectos de la fisiología retiniana.

SUMMARY

Melatonin was initially characterized in the pineal gland and later identified in the retina of several species, along with its synthesizing enzymes serotonin N-acetyltransferase (NAT) and hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT). Although the Golden hamster is one of the most widely used models in the investigation of pineal melatonin physiology, retinal melatonin in this species has received relatively little attention. The aim of this work was to examine the biosynthesis of melatonin in the hamster retina, as well as to elucidate the mechanisms involved in the regulation of its synthesis. Additionally, some aspects of the physiological role of retinal melatonin were studied.

A daily rhythm in hamster retinal melatonin levels, which peaks late in the night, as well as the ability of the hamster retina to regulate melatonin synthesis in isolated conditions, were found. Melatonin synthesis was independent on pineal activity. and was directly regulated by photic stimuli. In fact, a circadian rhythm was absent in the *ex vivo* experiments performed under free running conditions. GABA, a retinal transmitter that mediates dark-related processes, stimulated melatonin synthesis *in vitro*, probably acting through a GABA_A receptor. Moreover, the dark-induced increase in melatonin production was blocked by a specific GABA_A antagonist receptor (bicuculline). Retinal GABA turnover was maximal at night and preceded the increase of melatonin levels by about 4 hours. These results indicate that GABA could be the intercellular message linking darkness with melatonin biosynthesis.

Cyclic AMP has been postulated as the intracellular messenger involved in the genomic induction of retinal NAT. A temporal correlation between melatonin and cAMP content (mainly influenced by the photic stimulus), which supports previous studies, was observed. A significant increase of melatonin synthesis stimulated by cGMP analogs, and a temporal relationship between rhythms in cGMP levels and melatonin content were also described. Considering that GABA stimulates cGMP and decreases cAMP accumulation, GABA effects on melatonin synthesis could be mediated by an increase in cGMP levels.

A dual effect of melatonin on cGMP biosynthesis was described, i.e. by increasing its synthesis and by inhibiting its degradation, both resulting in an

increase of cGMP levels. This effect could occur by rapid (about 10 sec) melatonin inhibition of calcium uptake, since calcium could inhibit retinal guanylate cyclase and stimulate retinal phosphodiesterase activities.

Melatonin significantly increased ^3H -glutamate uptake, this effect persisting in a Ca^{2+} -free medium. On the other hand, melatonin increased ^3H -glutamate release through an effect that was Ca^{2+} sensitive. Melatonin significantly increased $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by a crude synaptosomal retinal fraction, after a 20 min incubation. Taking into account that melatonin affects the cGMP system and that ^3H -glutamate uptake and release and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake were stimulated by cGMP analogs, these results suggest that melatonin could increase ^3H -glutamate release by increasing cGMP levels.

The presence of specific high-affinity receptors, showing a pharmacological profile consistent with a ML-1-like site, was also demonstrated. In addition, an equipotent decrease in the total specific binding of 2-[^{125}I]-melatonin caused by GTP and GDP suggested that these binding sites could be G inhibitory protein-coupled receptors. Likewise, melatonin significantly decreased cAMP accumulation. This cyclic nucleotide might act as a second messenger for melatonin action, and/or regulate melatonin biosynthesis by a negative feed-back mechanism.

In all cases, melatonin effects occurred in a time-dependent manner, showing a high correlation with daily variations in 2-[^{125}I]-melatonin specific binding sites density found in hamster retina. Maximal density was observed at 24.00 h in coincidence with the maximal sensitivity window for the melatonin effects. Daily variations in the density of melatonin binding sites is probably regulated through up- and down-regulation mechanisms, induced by melatonin on its own binding sites.

Collectively, the foregoing results suggest that in the hamster retina, melatonin could participate in the photic information transduction or processing mechanisms, as a "sensory-paracrine" signal. In fact, melatonin is released by photoreceptor cells in response to a sensorial stimulus (darkness), and acts locally by modulating several aspects of retinal physiology.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
5'-AMP	5'-Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
B _{máx}	Concentración máxima de sitios de unión
8-Br-GMPc	8-bromoguanosina monofosfato cíclico
°C	Grados centígrados
CACA	Ácido cis-4-aminocrotónico
Ci	Curie
cm	Centímetro
cpm	Cuentas por minuto
dibutiril-GMPc	2'-O-dibutirilguanosina monofosfato cíclico
Dopamina	3,4-dihidroxifeniletilamina
dpm	Desintegraciones por minuto
EDTA	Ácido etiléndiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenglicol tetracético
EP	Epitelio pigmentario
ES	Error estándar
FAD	Flavín adenina dinucleótido
fmol	Femtomo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA-T	GABA-transaminasa
GAD	Glutámico descarboxilasa
GC	Guanilato ciclasa
GCAP	Proteína activadora de la guanilato ciclasa
GDP	Guanosina difosfato
Gi	Proteína G inhibitoria
GMP	Guanosina monofosfato
5'-GMP	5'-guanosina monofosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
Gs	Proteína G excitatoria

GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
HIOMT	Hidroxiindol-O-metiltransferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
5-HT (serotonina)	5-hidroxitriptamina
i. p.	Intraperitoneal
IBMX	Metil isobutil xantina.
IC ₅₀	Concentración de inhibidor necesaria para reducir la unión específica máxima en un 50%
K _d	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
K _i	Constante de inhibición
K _m	Constante de Michaelis-Menten
M	Molar
mCi	Milicurie
Melatonina	N-acetil-5-metoxitriptamina
MEM	Medio esencial mínimo
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
3-MPA	Ácido 3-mercaptopropiónico
MSH	Hormona melanocito estimulante
N°	Número
NADPH	α -Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida
NAS (N-acetilserotonina)	N-acetil-5-hidroxitriptamina
NAT	Serotonina-N-acetiltransferasa
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NO	Óxido nítrico
Noradrenalina (NA)	3,4-dihidroxifeniletanolamina

NSQ	Núcleos supraquiasmáticos
NOS	Óxido nítrico sintetasa
P	Subunidad de la fosfodiesterasa
PDE	Fosfodiesterasa
pg	Picogramo
PKC	Proteína quinasa C
pM	Picomolar
pmol	Picomol
PMSF	Fluoruro fenilmetilsulfonilo
prot.	Proteína
Px	Pinealectomía
Rd	Rodopsina
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
seg.	Segundos
Sham	Operación simulada
SNC	Sistema nervioso central
T	Transducina
TACA	Ácido trans-4-aminocrotónico
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
V _{máx}	Velocidad máxima
Vol.	Volumen

INTRODUCCIÓN

Prácticamente la tercera parte del nivel más elevado de organización del cerebro humano, la corteza cerebral, está dedicada al procesado visual. Desde nuestros ojos, emergen 2 millones de fibras que conforman el nervio óptico, en tanto que el nervio auditivo, instrumental en el proceso de audición, incluye apenas 30.000 fibras. La visión valida todos los otros sentidos; cuando oímos, olemos, tocamos algo, usualmente y en forma espontánea tendemos a observarlo. Una prueba curiosa de la importancia de este sentido en nuestra vida, es cómo la visión trasciende a nuestro lenguaje cotidiano: "*ver para creer*" dice el escéptico, "*previsión*" nos recomiendan los economistas. Probablemente por estas razones, la visión es el sentido más profundamente estudiado por los investigadores, sin embargo, los mecanismos de procesado de información visual a nivel retiniano en particular o a cualquier otro nivel de la vía visual, están aún muy alejados de la comprensión de *cómo vemos*. El objetivo de este trabajo de tesis ha sido contribuir a la elucidación de algunos de los complejos mecanismos a nivel retiniano, esenciales para comunicarnos eficientemente con el mundo exterior.

I. LA RETINA

I. 1. ANATOMÍA DE LA RETINA

La arquitectura funcional y la complejidad del circuito sináptico de la retina de mamíferos difiere entre las distintas especies, pero esencialmente sigue un principio común de organización, que permite a la retina codificar e interpretar la señal visual (Kolb y Nelson, 1984). La retina codifica el mundo visual, transformando los estímulos luminosos en impulsos nerviosos que son enviados al cerebro. En la corteza, las señales son interpretadas y configuran la percepción visual: una sensación subjetiva de la forma, el color, la profundidad, el movimiento de los objetos y el espacio que nos rodea.

La retina es una lámina fina de tejido nervioso situada en el fondo del ojo, de aproximadamente un cuarto de milímetro, que constituye una prolongación del sistema nervioso central (Figura A). Está constituida por tres capas de cuerpos neuronales separadas por dos capas formadas por las sinapsis entre los axones y dendritas de estas células. Esencialmente la retina

está constituida por cinco tipos celulares (Dowling, 1979), que se conectan a través de sinapsis: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, ganglionares, horizontales y amácrinas. A pesar de la existencia de estos cinco tipos de células retinianas, desde un punto de vista funcional, la retina posee en realidad muchos más elementos celulares, dado que cada tipo presenta a su vez varios subtipos con características propias.

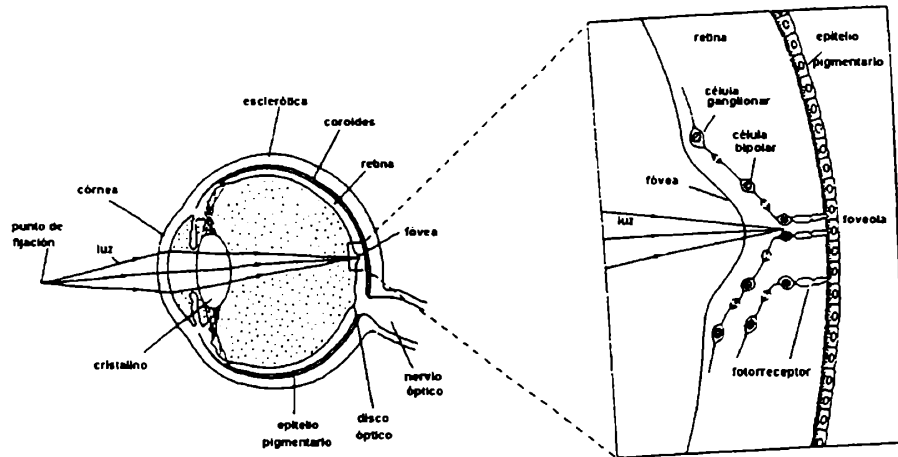


Figura A. Localización de la retina en un corte sagital de ojo humano (izquierda). A la derecha se muestra un detalle de la retina en la zona de la fovea.

En la mayoría de las especies, los bastones son mucho más numerosos que los conos, aunque la cantidad de ambos tipos celulares varía marcadamente sobre la superficie de la retina. En el centro de la retina, donde la agudeza visual es máxima, se observan sólo conos, más densamente distribuidos que en el resto de la superficie de la retina. Esta área de aproximadamente medio milímetro de espesor se denomina fovea. Los fotorreceptores se encuentran en la capa de la retina más cercana al fondo del globo ocular, más alejada de la córnea y de la entrada de la luz. Por consiguiente, ésta debe atravesar las otras capas retinianas antes de alcanzar la capa de fotorreceptores, salvo en la fovea, donde la luz incide directamente. La posición de la retina, por lo tanto, se encuentra invertida respecto de la entrada de la luz. A través de esta disposición los fotorreceptores se

encuentran en contacto con una capa de células que contienen un pigmento de color negro llamado melanina (Hubel, 1988). Esta última capa celular se denomina epitelio pigmentario (EP) y posee tres funciones fundamentales: 1) aporta vitamina A para el proceso de fototransducción (Davson, 1990), 2) la melanina del EP protege al fotorreceptor de la incidencia de niveles excesivos de iluminación (Carr y Siegle, 1979) y 3) a través de un mecanismo de fagocitosis, las células del EP participan activamente en el recambio de los discos de membrana de los fotorreceptores, que posibilita la restauración de los niveles del fotopigmento (Bok, 1985).

Desde el fondo hacia el centro del globo ocular, los 5 tipos celulares descriptos se disponen de la siguiente manera: los somas de los fotorreceptores se localizan en la capa denominada nuclear externa, con los segmentos externos (lado apical de la célula) dirigidos hacia el EP y los terminales sinápticos hacia el centro del globo ocular. Los terminales de los fotorreceptores hacen sinapsis con las prolongaciones neuríticas de las células horizontales y bipolares en la capa plexiforme externa. Los somas de las células horizontales, bipolares y amácrinas se encuentran ubicadas en la parte media, entre la capa de fotorreceptores y las células ganglionares, en el área denominada capa nuclear interna. Las células bipolares son más numerosas y dominan la capa media de la retina. Las sinapsis establecidas entre las proyecciones neuríticas de las células bipolares, amácrinas y ganglionares se localizan en la capa plexiforme interna. Por último, en la capa retiniana más cercana al centro del globo ocular se dispone la capa de células ganglionares, cuyos axones proyectan fuera del ojo, a través del disco óptico, para formar el nervio óptico (Figura B).

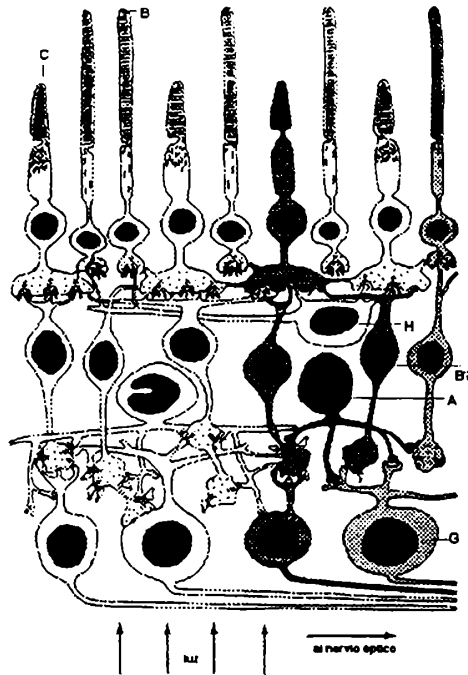


Figura B. Los 5 tipos celulares principales que conforman la retina. Se disponen en 3 capas nucleares (nuclear externa: conos (C) y bastones (B); nuclear interna: horizontales (H), amácrinas (A) y bipolares (Bi); capa de ganglionares (G)) y dos capas donde se localizan las conexiones entre estos tipos celulares (capas plexiformes interna y externa).

Las células bipolares reciben "input" directo de los fotorreceptores, y hacen sinapsis con las células ganglionares directamente. Las células horizontales conectan los fotorreceptores con las células bipolares, a través de proyecciones que se extienden paralelas a las capas retinianas. Las células amácrinas establecen conexiones sinápticas, paralelas a la superficie retiniana, entre neuronas bipolares y ganglionares. En base a las conexiones anatómicas y funcionales entre los distintos tipos celulares retinianos, se postula que la información fluye a través de la retina siguiendo dos vías: un camino directo desde los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las ganglionares; y uno indirecto, en el que las células horizontales se interponen entre los fotorreceptores y las células bipolares, y las células amácrinas entre las bipolares y las ganglionares. La vía directa de transmisión de información es altamente específica, puesto que uno o pocos fotorreceptores se conectan con una célula bipolar y una o pocas de éstas con las células ganglionares. La vía indirecta, en cambio, es más difusa, conectando un mayor número de células a través de sus proyecciones

laterales. Este plan general de conexiones retinianas, fundamentalmente a nivel de las vías directas, varía dramáticamente entre las zonas localizadas cerca o dentro de la fovea y las zonas periféricas de la superficie retiniana. En la fovea o las zonas adyacentes sólo un fotorreceptor se conecta con una célula bipolar y ésta a su vez con una sola célula ganglionar. Al alejarse progresivamente de la fovea hacia la periferia, un número cada vez mayor de fotorreceptores convergen sobre una única célula bipolar y varias de éstas sobre una ganglionar. El alto grado de convergencia en la periferia junto con la alta especificidad en la zona central retiniana, permiten comprender la relación existente entre el número de fotorreceptores y la cantidad de fibras en el nervio óptico (125:1), sin pérdida de la agudeza visual (Hubel, 1988).

I. 2. MECANISMO DE FOTOTRANSDUCCIÓN

La principal función diferenciada de la retina es el mecanismo de fototransducción.

La visión se inicia con la transformación de los paquetes de energía electromagnética, fotones, en señales nerviosas susceptibles de ser interpretadas por el cerebro. Los ojos de la mayoría de los vertebrados poseen los dos tipos de fotorreceptores, bastones y conos. Los primeros intervienen en la visión con luz escasa, ya que son capaces de responder a unos pocos fotones y pierden su capacidad de emitir señales al aumentar la intensidad lumínica ambiental (a un nivel de pleno día), debido a su rápida saturación. Los conos en cambio, permanecen activos durante la visión diurna a plena luz. Los conos no son capaces de dar respuesta en luz muy tenue, ya que necesitan cientos de fotones para ser estimulados. Por lo tanto, son menos sensibles que los bastones y presentan umbrales elevados de saturación. La señal interpretada por los conos es más rica en detalles y permite la percepción del color.

El fotorreceptor está formado por un segmento externo, donde se produce la absorción de la luz y la traducción de ésta en una señal eléctrica (mecanismo de fototransducción). El terminal sináptico se localiza en el extremo opuesto, donde se produce la liberación del neurotransmisor, por intermedio del cual la señal alcanza los otros tipos celulares. Entre el segmento externo y el terminal se encuentra el segmento interno, donde

ocurren la mayoría de los procesos metabólicos celulares. Las diferencias morfológicas entre los conos y los bastones se representan en la figura C.

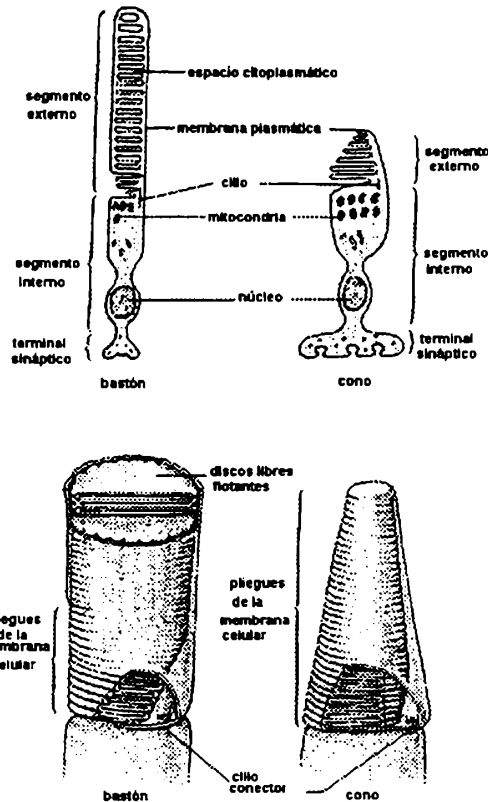


Figura C. Representación esquemática de los conos y bastones.

Ambos tipos de segmentos externos poseen una gran extensión de membrana, formando una pila ordenada de discos de membrana, donde se encuentran altas concentraciones de un pigmento fotosensible, la rodopsina en el caso de los bastones y tres tipos distintos de conopsinas (en la retina humana) en las tres clases de conos. Uno de estos tipos de conopsina absorbe máximamente a longitudes de onda cortas (azul), otro a longitudes medias (verde) y el tercero a longitudes largas (rojo) del espectro visible. La diferencia en las bandas de absorción de los conos es la base, al menos en una primera etapa, de la percepción del color.

¿Cómo se origina la señal eléctrica a partir de la absorción de la luz en un bastón o en un cono?

Sorprendentemente, en oscuridad completa, el fotorreceptor se encuentra despolarizado. Este fenómeno se debe a una elevada conductancia a los iones sodio en el segmento externo que fluyen desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula, originando lo que se denomina la "corriente oscura", una corriente eléctrica entrante que provoca la despolarización del fotorreceptor. El circuito de corriente es completado por un flujo saliente de iones potasio en el segmento interno y en el terminal, cuyas membranas presentan alta permeabilidad a este catión. En presencia de luz, el fotorreceptor se hiperpolariza, es decir, incrementa la magnitud de la diferencia de potencial transmembrana. Esta hiperpolarización es provocada por el bloqueo del influjo de sodio y por consiguiente de la corriente oscura. El potencial de membrana de un fotorreceptor en reposo (en completa oscuridad) es de aproximadamente unos -40 mV. Un pulso de luz provoca una hiperpolarización que aumenta con la intensidad del estímulo. La respuesta máxima corresponde a un cambio en 30 mV, alcanzando el potencial transmembrana un valor de -70 mV, cercano al potencial de equilibrio del potasio.

En 1975, Fettiplace y Baylor demostraron que la hiperpolarización del fotorreceptor es necesaria y suficiente para transmitir información a otros tipos celulares. La hiperpolarización del fotorreceptor mediante estímulos eléctricos induce cambios en la frecuencia de disparo de una célula ganglionar, de manera similar a la modificación provocada por la aplicación de un estímulo luminoso sobre ese fotorreceptor (Schnapf y Baylor, 1987).

En condiciones de oscuridad, el glutamato es liberado de manera tónica por el terminal sináptico del fotorreceptor. El cambio de potencial transmembrana generado por la luz en el segmento externo se propaga hacia el terminal, donde se traduce en un fenómeno químico: la inhibición de la liberación del transmisor. A nivel postsináptico, el decremento o inhibición de la liberación de glutamato provoca cambios en la conductancia de la membrana de las células conectadas con los fotorreceptores: las bipolares y las horizontales (Nicholls, 1992).

El pigmento visual de los bastones, la rodopsina, está compuesto por dos moléculas: una proteína llamada opsina y un cromóforo, formado por el

aldehído 11-cis de la vitamina A, denominado retinal. La absorción de un fotón produce la isomerización del retinal que pasa a una configuración 11-trans. La proteína sufre rápidos cambios conformacionales con varios intermediarios. Uno de ellos, conocido como metarrodopsina II, es el estado activo del pigmento (Matthews et al., 1963; Nathans y Hogness, 1984). Una vez que la rodopsina ha sido estimulada, el 11-trans retinal se separa de la opsina y en estas condiciones ya no responde a la luz. Este proceso se denomina "blanqueo" del fotorreceptor (Dowling, 1987).

¿Cuál es la secuencia de eventos que causa la hiperpolarización del fotorreceptor?

Mediante el uso de registros de "patch clamp" y de técnicas moleculares, varios autores demostraron que el compuesto guanosina monofosfato cíclico (GMPc) es el segundo mensajero involucrado en la transmisión de la señal luminosa, desde la membrana de los discos hasta la superficie interna de la membrana plasmática del segmento externo de los bastones (Fesenko et al, 1985; Stryer, 1987; Yau y Baylor, 1989). En condiciones de oscuridad, el nucleótido cíclico mantiene abiertos canales catiónicos (de sodio, calcio y magnesio) en la membrana plasmática del segmento externo. El flujo de iones por estos canales genera la corriente oscura, que como ya se mencionó, es producida en un 80 % por el influjo de sodio y en un 15 % por calcio, a favor de sus gradientes electroquímicos (el 5% restante es debido al magnesio) (Yau y Baylor, 1989). Al incidir sobre el fotorreceptor, la luz induce la caída abrupta de los niveles de GMPc, el consecuente cierre de los canales y la interrupción de la corriente oscura que causa la hiperpolarización del fotorreceptor (Baylor, 1987; Yau y Baylor, 1989). Luego de la transformación de la rodopsina a su estado conformacional activado (la metarrodopsina II), se activa una proteína G particular de la membrana de los discos de los fotorreceptores, denominada transducina (Matthews et al., 1963; Stryer y Bourne, 1986). Esta proteína es activada intercambiando GDP por GTP. La subunidad α de la transducina, separándose de las subunidades β - γ , produce la activación de una fosfodiesterasa específica de GMPc, que cataliza la transformación de éste en 5'-guanosina monofosfato (5'-GMP). Consecuentemente, los niveles del nucleótido disminuyen, se cierran los canales catiónicos dependientes de GMPc y el

fotorreceptor se hiperpolariza. La secuencia de eventos iniciados por la luz a nivel del fotorreceptor se esquematiza en la figura D.

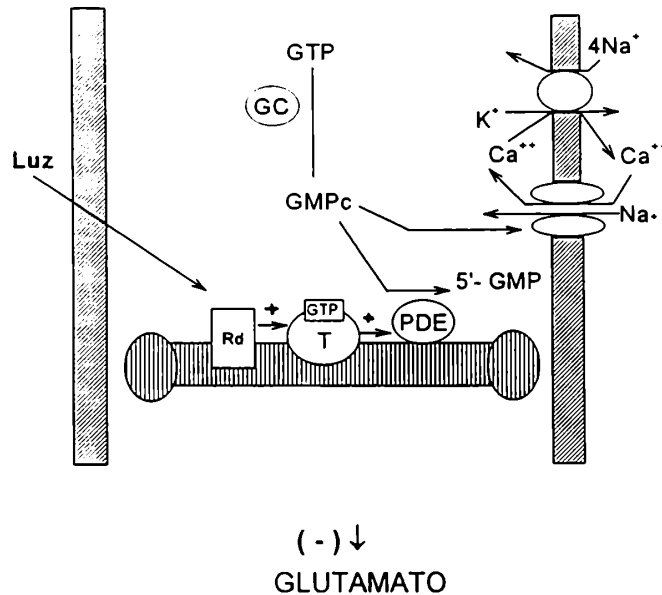


Figura D. Mecanismo de fototransducción, en el segmento externo de un bastón de la retina de vertebrados. La luz causa la disminución en los niveles de GMPC, la hiperpolarización del fotorreceptor y la inhibición de la liberación de glutamato en el terminal.

Esta secuencia de eventos permite una gran amplificación de la respuesta a la luz. Una sola molécula de metarrodopsina II puede activar a cientos de subunidades α de la proteína G y cada una de éstas, a su vez, activa a fosfodiesterasas que hidrolizan miles de moléculas de GMPC. De esta manera, la fotoactivación de una sola molécula de rodopsina puede provocar la hidrólisis de 100.000 moléculas de GMP cíclico por segundo (Baylor y Fuortes, 1970; Kandel, 1991).

I. 3. MECANISMOS REGULATORIOS DE LA FOTOTRANSDUCCIÓN

Los fotorreceptores responden a incrementos en la intensidad de luz y se adaptan o desensibilizan frente a la iluminación constante. La activación por la luz de los fotorreceptores de los vertebrados, involucra la secuencia de eventos ya mencionada, cada uno de los cuales es susceptible de ser regulado por mecanismos de inactivación. La hidrólisis de la rodopsina inducida por la

luz genera una lenta desensibilización del fotorreceptor dada la menor disponibilidad de pigmento.

Existe un segundo mecanismo de inactivación mucho más rápido, que involucra la fosforilación de la metarrodopsina II, catalizado por una rodopsina quinasa que actúa antes de que se produzca su hidrólisis. La fosforilación de la metarrodopsina II reduce su capacidad para estimular a la transducina y aumenta su afinidad por una proteína llamada arrestina. La unión de la arrestina a la metarrodopsina II inhibe su acción estimuladora sobre más moléculas de transducina (Gurevich y Benovic, 1993; Ohguro et al., 1994). Se ha descrito que la rodopsina es también sustrato de la proteína quinasa C (PKC) (Newton y Williams, 1993). En experimentos *in vitro* se observó que concentraciones elevadas (aunque fisiológicas) de Ca^{2+} inhiben el mecanismo de fosforilación de la rodopsina, es decir impiden su inactivación, en presencia de una proteína que une Ca^{2+} conocida como S-modulina o recoverina (Kawamura et al., 1993).

Un tercer mecanismo de inactivación del proceso de fototransducción es debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α de la transducina ($T\alpha$). Esta subunidad se "auto-inactiva" hidrolizando el GTP unido y, por consiguiente, perdiendo la capacidad de activar más moléculas de fosfodiesterasa (Noel et al., 1994). Adicionalmente, se describió la existencia de una proteína llamada fosducina que interactúa con las subunidades β - γ de la transducina, impidiendo que se unan a la $T\alpha$ (Lee et al., 1992). Esto provoca una menor disponibilidad de transducina trimérica, que es la forma activable por la metarrodopsina II.

La fosfodiesterasa específica de GMPc es un tetrámero formado por dos subunidades catalíticas ($P\alpha$ y $P\beta$) y dos subunidades inhibitorias iguales ($P\gamma$) (Koutalos y Yau, 1993). Esta enzima es inhibida cuando las subunidades $P\gamma$ se reasocian con las subunidades catalíticas. Las subunidades $P\alpha$ y $P\beta$ son activas en estado libre, mientras que las subunidades $P\gamma$ permanecen unidas a la $T\alpha$ de la transducina. Cuando la $T\alpha$ hidroliza el GTP unido, se inactiva y deja libres las subunidades $P\gamma$ de la fosfodiesterasa, las que a su vez se reasocian con las subunidades catalíticas inactivándolas (Clerc y Bennett, 1992). Sin embargo la inactivación de la PDE ocurre aún en ausencia de la hidrólisis de GTP. Se ha sugerido que tal mecanismo podría ocurrir a través de

la fosforilación de la subunidad P_{γ} , que disminuye su afinidad por la T_{α} y aumenta su afinidad por las subunidades catalíticas (Erickson et al, 1992).

Múltiples evidencias señalan que el calcio intracelular está involucrado en el proceso de recuperación de la repuesta del fotorreceptor al estímulo fótico y en el mecanismo de adaptación a la luz (Yau, 1991). Algunos mecanismos de inactivación se basan en una disminución del calcio intracelular que ocurre como respuesta a la luz. Los niveles de calcio citoplasmático en el segmento externo son regulados por la entrada de Ca^{2+} a través de los canales catiónicos activables por GMPc y su eflujo a través de un intercambiador de $Na^{+}/Ca^{2+}-K^{+}$, además de un proceso de "buffering" intracelular de Ca^{2+} que incluiría a varias proteínas intracelulares que se unen al catión (Kaupp y Koch, 1992). La hidrólisis de GMPc inducida por la luz, reduce el influjo sin modificar el eflujo de calcio (Lagnado et al., 1992).

El efecto del calcio es mediado, al menos, por tres mecanismos. Uno de ellos ocurre a través de la modulación de la afinidad del canal por el GMPc, a través de un mecanismo dependiente de calmodulina, que disminuye la afinidad del canal por el nucleótido (Hsu y Molday, 1993). Por otra parte, el decremento en los niveles de calcio intracelular induce la resíntesis del nucleótido cíclico, a través de la activación de la guanilato ciclasa (Koch y Stryer, 1988; Gorczyca et al., 1994a). Se ha sugerido que este efecto está mediado por proteínas denominadas GCAP (proteína activadora de la guanilato ciclasa), que estimulan la actividad de la guanilato ciclasa de la membrana del fotorreceptor en condiciones de bajo calcio intracelular (Gorczyca et al., 1994b). Se han identificado al menos dos proteínas aparentemente distintas con pesos moleculares de 20 y 24 kDa con función de GCAP (Gorczyca et al., 1994a; MacFarland, 1995). La consecuente síntesis de GMPc por la guanilato ciclasa restaura, al menos parcialmente, los niveles del nucleótido, causando la reapertura de canales. La entrada de calcio genera una disminución en la actividad de la guanilato ciclasa y un retorno a un estado intermedio entre el estado inicial (fotorreceptor más despolarizado) y el estado de hiperpolarización del fotorreceptor, inmediatamente después de la aplicación del estímulo luminoso. La retroalimentación por calcio de la guanilato ciclasa permitiría el mantenimiento de niveles constantes de GMPc en la oscuridad y la recuperación de los niveles del nucleótido cíclico, siguiendo al estímulo fótico. Consecuentemente, el potencial de membrana del

fotorreceptor retorna a un estado menos hiperpolarizado, permitiendo que siga respondiendo a niveles continuos o más elevados de iluminación ambiental (Koch y Stryer, 1988).

Un tercer mecanismo regulatorio vinculado al calcio ocurre a través de un efecto estimulador sobre la fosfodiesterasa específica de GMPc (Kawamura y Murakami, 1991; Kawamura et al., 1992). Se ha sugerido, sin embargo, que el efecto estimulador del calcio sobre la fosfodiesterasa podría ser una consecuencia del retraso generado por el catión en la inactivación de la metarrodopsina II, a través de la S-modulina, como se describió previamente (Lagnado y Baylor, 1992; Kawamura, 1993). Es decir que la disminución en los niveles de calcio intracelular resultaría en una más rápida inactivación de la metarrodopsina II y, en consecuencia, en una más rápida inhibición de la fosfodiesterasa activada por la luz.

I. 4. PROCESADO DE LA INFORMACIÓN FÓTICA

Los circuitos de neuronas que conforman la retina efectúan análisis complejos de la imagen visual, acentuando ciertas características y mitigando otras (procesado visual) (Masland, 1987). Los primeros indicios sobre el proceso de codificación de la información fótica en la retina de los mamíferos datan de 1952. Los experimentos iniciales fueron realizados por Stephen W. Kuffler, quien observó cambios en la actividad eléctrica de células ganglionares en respuesta a estímulos luminosos. Al registrar eléctricamente células ganglionares individuales, observó una descarga continua de potenciales de acción aún en ausencia de estímulo. Estas células, en presencia del estímulo luminoso, modifican su patrón de descarga, incrementando o disminuyendo la frecuencia de disparo. Kuffler observó que cada célula ganglionar respondía máximamente al estímulo ubicado en un área precisa del campo visual (o de la superficie de la retina), que se denominó "campo receptivo". El campo receptivo de las células retinianas se define como el área de la retina sobre la que la aplicación del estímulo fótico modifica la actividad de la célula en cuestión. Por definición, la iluminación que incide en un área fuera del campo receptivo de una célula en particular no produce ningún efecto sobre la actividad de esa célula (Kuffler, 1953). Los "campos receptivos" de las células ganglionares presentan la característica de ser

concéntricos, con un centro y una periferia antagónicos. Las células pueden dividirse a su vez en dos poblaciones distintas, las que se excitan ("on-center") y las que se inhiben ("off-center") al estimular el centro de su campo receptivo. Algunos tipos de células ganglionares dan mejor respuesta a manchas circulares de luz, bordes en movimiento o cambios bruscos en la intensidad de iluminación, y otros tipos, a manchas de luz de un determinado color que se hallan sobre un fondo de color contrastante. De este modo, todas estas clases celulares apoyan una regla común en el procesado visual: el sistema está diseñado para responder a diferencias de iluminación (luces y sombras), de color entre objetos, o entre un objeto y su medio circundante. Es decir, interpreta contrastes más que intensidades o longitudes de onda absolutas. Todas las células ganglionares comparten la característica de no responder o responder pobremente a la iluminación difusa del campo visual (Kuffler, 1953).

Las células bipolares como ya se describió, ocupan una posición "estratégica" de manera que todas las señales originadas en los fotorreceptores deben pasar a través de ellas para llegar a las células ganglionares. Esto significa que forman parte tanto de la vía directa como indirecta; en contraste, las células horizontales forman parte únicamente de esta última. Cada célula bipolar recibe el "input" desde conos o bastones. Las células bipolares y las horizontales presentan solamente respuestas graduadas, despolarizantes o hiperpolarizantes, en respuesta a la iluminación de los fotorreceptores. Algunas de las células bipolares responden a la iluminación despolarizándose, mientras que otras dan respuestas hiperpolarizantes. Esta diferencia en la respuesta al estímulo luminoso está determinada por las características de los receptores postsinápticos en cada tipo de célula bipolar, ya que los fotorreceptores siempre se hiperpolarizan en respuesta a la luz y liberan exclusivamente glutamato como neurotransmisor, liberado tónicamente en oscuridad (Miller y Schwartz, 1983; Sarthy et al., 1986; Daw et al., 1989). Estas diferencias funcionales determinan la existencia de bipolares de tipo "on-center" y "off-center". El tipo de sinapsis que presentan las células bipolares con los fotorreceptores es excitatoria para las "off-center" (ya que se despolarizan en ausencia de luz, al igual que los fotorreceptores) e inhibitoria para las "on-center" (se despolarizan en presencia de luz, en tanto que los fotorreceptores se hiperpolarizan) (Baylor y Fettiplace, 1977).

Los fotorreceptores transmiten información a las células horizontales a través de sinapsis excitatorias, ya que son despolarizadas cuando el fotorreceptor libera glutamato. Se ha postulado que las células horizontales en oscuridad liberan GABA tónicamente, hiperpolarizando los terminales de los fotorreceptores adyacentes (Marc et al., 1978; Ehinger y Dowling, 1987). Cuando la luz hiperpolariza a un fotorreceptor, la célula horizontal que recibe su "input" también se hiperpolariza y el terminal del fotorreceptor que recibe el "input" desde la célula horizontal, se libera de la inhibición.

En resumen: las células bipolares presentan campos receptivos con antagonismo centro-periferia de tipo "on-center" y "off-center". El centro del campo receptivo de una célula bipolar está formado por uno o varios fotorreceptores que ocupan un área retiniana relativamente pequeña y se conectan directamente con esa célula bipolar. Si estas conexiones son inhibitorias se trata de una célula bipolar "on-center", que se despolariza cuando la luz incide en el centro de su campo receptivo. Si las conexiones son excitatorias se trata de una bipolar "off", y en ese caso la luz en el centro de su campo receptivo provoca su hiperpolarización. La misma célula bipolar, recibe a su vez "input" fótico por una vía indirecta, a través de células horizontales inhibitorias, desde fotorreceptores localizados en la periferia de su campo receptivo (Figura E).

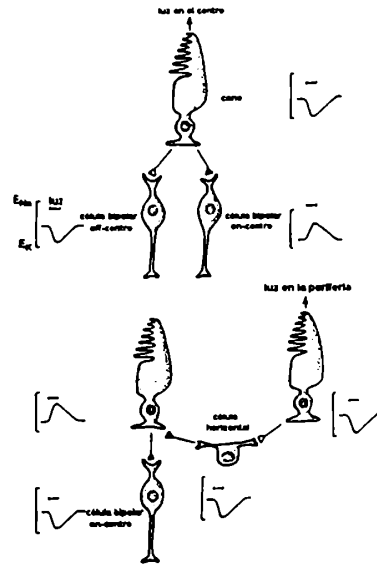


Figura E. Las respuestas de las células bipolares son determinadas por el "input" fótico desde los fotorreceptores directamente y desde las células horizontales.

El mecanismo por el cual la periferia del campo receptivo de una célula bipolar, ejerce su efecto antagónico sobre el centro del mismo se conoce como mecanismo de inhibición lateral y se establece a través de las sinapsis inhibitorias de las células horizontales sobre los fotorreceptores que hacen sinapsis sobre esta célula bipolar. El efecto de iluminar el centro del campo receptivo de una célula bipolar "on-center" es estimulatorio (se despolariza y libera más neurotransmisor) y si se ilumina la periferia, el efecto es inhibitorio sobre la actividad de esta célula. Para una célula bipolar off-center, ocurre el mecanismo inverso.

Las sinapsis entre las células bipolares y las ganglionares son probablemente excitatorias, conectando por lo tanto, bipolares "on-center" con ganglionares "on-center" y bipolares "off-center" con ganglionares "off-center" (Baylor y Fettiplace, 1977). Presumiblemente, el neurotransmisor de las células bipolares es también el glutamato (Nawy y Jahr, 1990; Massey, 1991; Barnstable, 1993).

Las células amácrinas presentan una amplia variedad de formas y utilizan una gran variedad de neurotransmisores entre ellos glicina, dopamina, indolaminas, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y acetilcolina (Masland, 1988). Existen evidencias que indican que estos transmisores regulan principalmente la sensibilidad visual y contribuyen al antagonismo centro-periferia. Adicionalmente, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), liberado por estas células, tendría un rol trófico en el desarrollo del ojo (Stone et al., 1988). Las células amácrinas como las ganglionares, pueden disparar potenciales de acción.

Se han descrito vías separadas de transmisión de la información para los conos y los bastones (Kolb y Famiglietti, 1974; Sterling et al, 1988; Müller, 1989). Los conos y los bastones contactan distintos tipos de células bipolares. Las bipolares específicas de los conos (tipo "on y off ") y las bipolares específicas de los bastones que son siempre de tipo "on". Por consiguiente, la luz sobre el bastón genera la despolarización de la célula bipolar a la que se conecta. Estas células bipolares hacen sinapsis, en la capa plexiforme interna, con una célula amácrina particular de tipo A II, también específica de la vía de los bastones. Tanto la vía de los conos, más directamente, como la de los bastones, a través de este tipo de células amácrinas, convergen en las mismas células ganglionares. La activación de la vía de los bastones provoca la estimulación de las células ganglionares de tipo "on-center" y la inhibición de las "off-center".

La función principal de la retina, convertir las señales luminosas en una serie de impulsos nerviosos, requiere una maquinaria muy compleja. La retina, a través de algunos de los mecanismos ya descritos, posee la extraordinaria capacidad de modificar sus niveles de sensibilidad a la intensidad luminosa. Estos ajustes permiten a la mayoría de los mamíferos ver adecuadamente tanto a la luz del sol como a la de las estrellas. La retina es también capaz de transmitir información sobre las distintas longitudes de onda del espectro de luz, permitiendo así la percepción del color, además de la forma, la profundidad y el movimiento (Masland, 1987).

II. EL GABA EN LA RETINA

El ácido gamma-aminobutírico, es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC). El GABA fue el primer compuesto que satisfizo todos los criterios para ser establecido como un neurotransmisor en la retina de vertebrados (Bolz et al., 1985; Massey y Redburn, 1987; Dowling 1987).

El GABA juega un rol fundamental en el procesado de información visual en la retina, a través de elementos celulares laterales inhibitorios como las células horizontales y amácrinas, que modulan el flujo vertical de información visual desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares. Recientemente se ha comenzado a comprender el circuito sináptico detallado y los mecanismos receptores gabaérgicos en la retina. Las neuronas gabaérgicas representan aproximadamente la mitad de las neuronas inhibitorias y tres cuartas partes de las sinapsis inhibitorias de la retina de vertebrados. Un ejemplo de estos circuitos laterales son las células horizontales que interactúan con conos, bastones y células bipolares de una manera no completamente elucidada. Se ha descrito que las células horizontales de algunos vertebrados son gabaérgicas. Este tipo celular se ha estudiado más detalladamente en la retina de vertebrados inferiores tales como peces, anfibios y reptiles (Wu, 1991). En mamíferos existen al menos dos tipos de células horizontales. Las evidencias que indican la presencia de inmunorreactividad para GABA y la enzima de síntesis, ácido glutámico descarboxilasa (GAD), en estos tipos celulares son controvertidas (Brandon et al., 1979; Bolz et al., 1985; Osborne et al., 1986; Agardh et al., 1987). En células horizontales de mamíferos se ha descrito inmunomarcación esporádica para GABA, que parece depender de la localización de las células horizontales en la retina (Mosinger y Yazulla, 1987; Grunert y Wässle, 1990). Recientemente, en la retina de hámster dorado, se describió inmunorreactividad para GABA en la zona más externa de la capa nuclear interna retiniana, en células con una morfología compatible con las horizontales, aunque la mayor señal positiva se encontró en las células amácrinas. Existen convincentes evidencias que indican que en la retina de gato y conejo, aproximadamente un 25-40 % de las células amácrinas son gabaérgicas, (Freed et al, 1983, Mosinger y Yazulla, 1985).

Una tercera clase de circuito modulador, es el constituido por las células interplexiformes (un tipo particular de célula amácrina) (Dowling y Ehinger, 1978; Wulle y Schnitzer, 1989), que establecen circuitos de retroalimentación negativa sobre las dendritas de las células bipolares en la capa plexiforme externa (Pourcho y Goebel, 1983). En mamíferos existen al menos dos tipos de células interplexiformes gabaérgicas (Nakamura et al., 1980; Wässle y Chun, 1989). En células amácrinas se ha descrito la co-localización de GABA, con otros neurotransmisores como acetilcolina, dopamina y posiblemente indolaminas (Massey et al., 1991; Wässle y Chun, 1988; Kosaka et al., 1987). Se ha postulado que las células horizontales y amácrinas gabaérgicas, constituyen los principales componentes de la periferia de los campos receptivos de las células bipolares y ganglionares retinianas (O' Hare y Owen, 1990; Slaughter y Pan, 1992).

El GABA ejerce su acción a través de receptores de membrana específicos. Los receptores gabaérgicos de los vertebrados se clasifican en tres grupos: 1) los receptores GABA_A, de tipo ionotrópico, que poseen un canal de Cl⁻ formando parte de la molécula receptora. La respuesta gabaérgica de tipo A es agonizada por muscimol y antagonizada por bicuculina. Este tipo de receptor es un complejo supramolecular formado por 5 subunidades proteicas (2 α , β , γ , δ) (Olsen y Tobin, 1990) y es susceptible de modulación por una variedad de ligandos. Por ejemplo, las benzodiazepinas se unen específicamente a la subunidad γ y los barbitúricos a las subunidades α y β (Bowery et al., 1984; Olsen y Venter, 1986; Stephenson, 1988; Bormann y Feigenspan, 1995). 2) Los receptores GABA_B, acoplados a una proteína G y a un sistema de segundos mensajeros, regulan canales de Ca²⁺ y/o K⁺ (Bowery et al., 1984; Bormann, 1988; Bormann y Feigenspan, 1995). El baclofen (Hill y Bowery, 1981) es un agonista específico de este tipo de receptores, mientras que el saclofen, 2-hidroxisaclofen y el faclofen (Kerr et al., 1987, 1989), entre otros, son antagonistas específicos. 3) Los receptores GABA_C al igual que los GABA_A regulan canales de Cl⁻ acoplados al receptor y están formados por subunidades proteicas de tipo ρ (Bormann y Feigenspan, 1995; Djamgoz, 1995). Estos canales, como los de los receptores de tipo GABA_A, son bloqueables por picrotoxina, aunque son insensibles tanto a bicuculina como a baclofen. Los agonistas específicos de los receptores GABA_C son los ácidos

trans- y cis-4-aminocrotónico (TACA y CACA) (Djamgoz, 1995). Sin embargo el TACA es también considerado un agonista GABA_A (Johnston et al., 1975).

Existen varias evidencias, obtenidas a partir de estudios electrofisiológicos y farmacológicos, que indican que los receptores gabaérgicos en los fotorreceptores de vertebrados inferiores, son principalmente de tipo GABA_A (Lam et al., 1978; Murakami et al., 1982a, 1982b; Tachibana y Kaneko, 1984; Kaneko y Tachibana, 1986; Wu, 1991). Algunas de las subunidades proteicas que forman parte del receptor gabaérgico tipo A se han identificado en los fotorreceptores de retina de pez, pollo, gato y rata (Yazulla et al., 1989; Djamgoz, 1995). Adicionalmente, se ha descrito la presencia de receptores GABA_A en las células amácrinas y bipolares de la retina de rata (Feigenspan et al., 1993).

Los receptores gabaérgicos descritos en las células horizontales podrían actuar como autorreceptores. Los datos disponibles indican que los receptores, localizados en este tipo celular en la retina de peces, son principalmente, aunque no exclusivamente, de tipo GABA_C (Quian y Dowling, 1993; Djamgoz, 1995). Asimismo, este tipo de receptor se ha localizado en células bipolares de retina de rata y salamandra (Feigenspan et al., 1993; Quian y Dowling, 1993). Sin embargo, algunos autores sugieren que es inapropiado llamar GABA_C a este tipo de receptores, ya que existirían, al menos en células bipolares de peces, dos tipos distintos de receptores, con características farmacológicas de tipo C, uno acoplado a canales de calcio a través de un mecanismo dependiente de GTP, y otro acoplado a un canal de cloruro; por consiguiente, estos receptores insensibles a baclofen y bicuculina representarían dos subtipos de la familia de receptores B y A respectivamente. Los mismos autores proponen que la resistencia a bicuculina o a baclofén y la sensibilidad a CACA, resulta insuficiente como criterio farmacológico confiable en el cual basar la caracterización de receptores gabaérgicos en la familia de receptores GABA_C (Matthews et al., 1994).

En mamíferos, el baclofen carece de efecto sobre las células bipolares y en las células ganglionares sólo se han descrito conductancias características de los canales asociados a los receptores de tipo GABA_A (Lipton, 1989; Yeh et al., 1990). En la retina de peces y anfibios, sin embargo, se ha descrito la presencia de receptores de tipo GABA_B, que modulan la liberación de transmisor desde los fotorreceptores (Eliasof y Werblin, 1989; O'

Hare y Owen, 1990) e inducirían el cierre de canales de calcio en las células bipolares (Maguire et al., 1989), además de abrir canales de potasio en células amácrinas y ganglionares (Slaughter y Bai, 1989).

III. LA MELATONINA

En 1958 Lerner y colaboradores aislaron una sustancia con la capacidad de aclarar el color de la piel de renacuajos, ranas, sapos y peces. (McCord y Allen, 1917; Kitay y Altschule, 1954). Más tarde, se elucidó la estructura química de esta sustancia: N-acetil-5-metoxitriptamina, y se la denominó melatonina (Lerner et al., 1959; Lerner y Case, 1959) (Figura F).

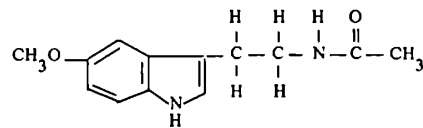


Figura F. Estructura química de la melatonina.

La melatonina es una hormona secretada primariamente por la glándula pineal a la circulación general en la mayoría de las especies estudiadas. Ha sido involucrada en el control del medio interno de los organismos a través de diversos efectos fisiológicos. Participa en el control de la reproducción y comportamiento estacional, el metabolismo, la inmunidad, la termorregulación, la presión sanguínea y posiblemente en el proceso de envejecimiento. Más recientemente, la melatonina se ha asociado con fisiopatologías relacionadas con el cáncer, la epilepsia, los desórdenes afectivos estacionales y patologías oculares (Yu y Reiter, 1993).

En los vertebrados inferiores, la glándula pineal es directamente un órgano fotorreceptor que traduce el estímulo luminoso en un impulso nervioso. En las aves, la glándula pineal es un fototransductor, ya que responde en forma directa a los cambios de luz, modificando la secreción de melatonina. En los mamíferos, la pineal es un órgano neuroendócrino. La información fótica es transmitida hacia la glándula a través del sistema nervioso simpático cuyo

neurotransmisor postganglionar es la noradrenalina. La liberación de noradrenalina desde el terminal simpático se traduce en la secreción pineal de melatonina (Taylor y Wilson, 1970; Moore y Klein, 1974). Se ha establecido que la actividad biosintética y secretoria de la glándula pineal responde primariamente a estímulos luminosos (regulación de tipo neural) y secundariamente a estímulos hormonales provenientes de los tejidos periféricos (regulación de tipo hormonal) (Moore y Klein, 1974; Alonso et al., 1993).

III. 1. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA MELATONINA

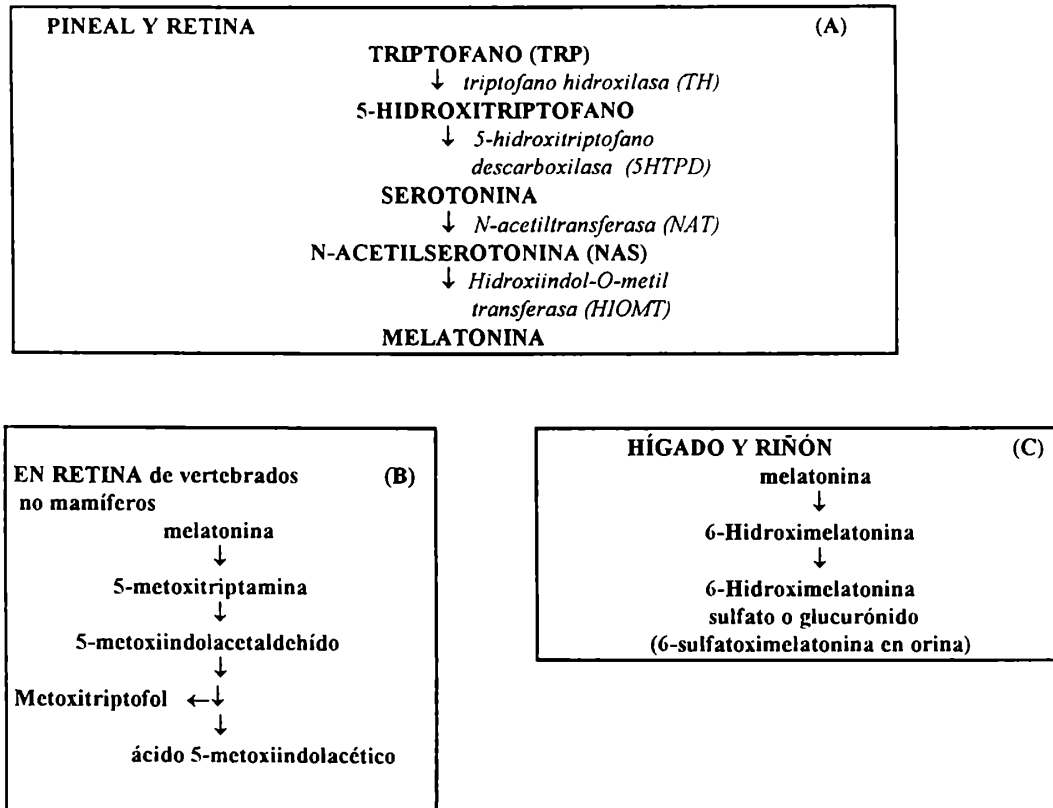
La biosíntesis de melatonina se inicia por la conversión de triptofano en 5-hidroxitriptofano catalizada por la enzima triptofano hidroxilasa. Este a su vez, es transformado en serotonina (5-HT) por acción de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. La 5-HT principalmente en la glándula pineal, pero también en otros tejidos como la retina, es una molécula precursora de la síntesis de compuestos indólicos, biológicamente activos, como la melatonina (Sudgen, 1989; Nowak et al., 1989). La 5-HT es convertida en melatonina, a través de dos reacciones catalizadas enzimáticamente. En una primera etapa, es acetilada a N-acetilserotonina por la acción de la enzima serotonina N-acetiltransferasa (NAT). Subsecuentemente, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), transfiere el grupo metilo de la S-adenosilmetionina a la posición 5-hidroxi de la N-acetilserotonina, dando como resultado final la síntesis de melatonina (Ebadi, 1984) (figura G). Además de la glándula pineal, se ha descrito síntesis de melatonina en una variedad de tejidos tales como la retina, la glándula harderiana, la glándula lacrimal, el cerebro y el intestino de mamíferos (Pang et al., 1992).

En la inducción de la síntesis de melatonina en la glándula pineal, la noradrenalina, a través de receptores β -adrenérgicos, provoca un incremento en los niveles de AMPc que induce la expresión génica de la NAT (Binkley, 1983; Klein, 1985). Existen fuertes evidencias que sugieren que el AMPc es el principal factor estimulador involucrado en este proceso de inducción génica, también en la retina de diversas especies (Iuvone y Besharse, 1986a; Nowak y Zawilska, 1994). En este sentido, el AMPc y sus análogos, son estimuladores sobre la actividad de la NAT en condiciones de luz, en la retina de *Xenopus*,

pollo, rata y conejo (Iuvone y Besharse, 1983; Iuvone y Besharse, 1986a; Zawilska et al., 1991; Zawilska y Nowak, 1992) así como en fotorreceptores de pollo en cultivo (Iuvone et al., 1990).

El 84 % de la melatonina circulante es metabolizada periféricamente en el hígado, a través de la hidroxilación en posición 6 para dar 6-hidroximelatonina, que luego es conjugada con ácido sulfúrico o glucurónico y excretada en la orina o en las heces. El 1% de la melatonina permanece inalterada y el 15 % como un metabolito no indólico, la N-acetil-5-metoxiquinurenamina. En el sistema nervioso central (SNC) el metabolismo de la melatonina involucra la ruptura del anillo indólico, formándose N-formil-5-metoxiquinurenamina y N-acetil-5-metoxiquinurenamina, compuestos con comprobada acción biológica (Yu y Reiter, 1993). En la retina de *Xenopus* se demostró que la melatonina es desacetilada a 5-metoxitriptamina (Grace et al., 1989) en lugar de ser metabolizada a 6-hidroximelatonina (Kopin et al., 1960), como se observa en la figura G. Esta parece ser una vía común de metabolización en la retina de vertebrados no mamíferos incluyendo a las aves, aunque no ha sido demostrada en mamíferos (Grace et al., 1991).

Figura G. Biosíntesis (A) y metabolismo (B y C) de la melatonina.



III. 2. LA MELATONINA EN LA RETINA DE VERTEBRADOS

Desde que se aisló e identificó la melatonina en extractos de pineal bovina, la glándula pineal fue considerada como el único sitio de origen del indol (Axelrod, 1974). Por su alta lipofiliidad (Pardridge y Mietus, 1980) la melatonina secretada por la glándula pineal puede acceder fácilmente al ojo por vía sistémica (Bubenik et al., 1978; Cassone et al., 1986). Por consiguiente, la concentración ocular de melatonina podría depender de la secreción de la glándula pineal. Sin embargo, múltiples pruebas experimentales demuestran que la melatonina es sintetizada localmente en la retina (Quay, 1965; Cardinali y Rosner, 1971a; Gern y Ralph, 1979; Pang y Allen, 1986). En este sentido, se demostró la presencia de 5-hidroxitriptofano

en la retina de pollo sugiriendo la presencia de la enzima que cataliza su síntesis (la triptofano hidroxilasa) en este tejido, aunque su actividad inicialmente no había sido detectada. (Parkinson and Rando, 1981). En la retina de *Xenopus*, se demostró la conversión de 5-hidroxitriptofano en serotonina, catalizada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Baker, 1966). Asimismo, se describió la presencia de serotonina en la retina de diversas especies (Quay,1965; Suzuki et al.,1977; Osborne, 1980; Parkinson y Rando, 1981; Osborne et al., 1982). Mediante métodos químicos, inmunohistológicos y autorradiográficos, se demostró la presencia de serotonina localizada en las células amácrinas y sus procesos en la capa plexiforme interna de la retina de vertebrados inferiores (Hauschild y Laties, 1973). También se describió la actividad de la NAT en la retina de pollo, gorrión, rata y hámster (Binkley et al., 1979) y en los años 80 se confirmó la presencia de esta actividad enzimática en la retina de otras especies de vertebrados (Miller et al., 1980; Nowak et al., 1989). En retinas de aves y mamíferos se demostró la presencia del producto de esta enzima, la N-acetilserotonina (NAS), compuesto precursor de la melatonina (Pang et al.,1977; 1981a; 1981b; 1983). En 1965 se demostró por primera vez una alta actividad de la HIOMT en retina de anfibios, que fue corroborado posteriormente en la retina de un mayor número de especies, con excepción de los mamíferos (Axelrod et al.,1965; Baker et al, 1965; Quay, 1965). En la década del 70 quedó definitivamente demostrada la presencia de esta enzima en la retina de mamíferos (Cardinali y Rosner 1971b; Cardinali et al., 1972, 1974; Pévet et al., 1978; Cremer-Bartels, 1979). Otra evidencia a favor de la síntesis local de melatonina en la retina, se obtuvo mediante la localización inmunohistoquímica de HIOMT en los fotorreceptores bovinos, de rata y de humanos (Wiechmann y Hollyfield, 1989). La hipótesis fue adicionalmente avalada por experimentos que demostraron la biosíntesis *in vitro* de melatonina en retinas de rata, a partir de precursores marcados (Cardinali y Rosner, 1971a). Posteriormente se demostró la síntesis *in vitro* de melatonina en la retina de otras especies de mamíferos (Pévet et al., 1978, 1980, 1981). Estas evidencias establecen firmemente la existencia de un sistema completo de enzimas y precursores para la síntesis de melatonina en la retina de vertebrados (Nowak et al., 1989).

La primera confirmación de la presencia de melatonina en la retina, se obtuvo a partir de las mediciones en los ojos laterales de las larvas de *Xenopus* (Baker y Hoff, 1971). Posteriormente se detectó la presencia de melatonina en la retina de pollo, mediante un bioensayo utilizando melanóforos de renacuajo (Mull y Ralph, 1972). Adicionalmente, en estudios utilizando cromatografía líquida de alta presión, se determinó la presencia de melatonina en la retina bovina (Hall et al., 1985). Contenidos cuantificables del metoxiindol fueron detectados más tarde en la retina de peces, anfibios, aves y mamíferos (Pang et al., 1977, 1980, 1982b, 1983, 1985; Gern et al., 1978a; Hamm y Menaker, 1980; Reiter et al., 1981, 1983; Yu et al., 1981a; Underwood et al., 1984).

La melatonina retiniana fue localizada mediante el desarrollo de un antisuero anti-melatonina y anti-N-acetilserotonina, en la capa nuclear externa de la retina de rata donde se localizan los somas de los fotorreceptores (Bubenik et al., 1974). En estudios posteriores, con el desarrollo de un antisuero más específico para melatonina y otro para ambos compuestos indólicos, se determinó la presencia de concentraciones comparables de melatonina y N-acetilserotonina en la capa de fotorreceptores de la retina de rata (Pang et al., 1977). Mediante el uso de distintos tipos de antisueros de melatonina, se determinó su presencia en la capa de fotorreceptores de la retina de hámster, ratón, codorniz, reptiles y peces (Bubenik et al., 1976a, 1978, Grotta y Brown, 1974; Vivien-Roels y Dubois, 1980; Vivien-Roels et al., 1981). Más recientemente, Mennenga y colaboradores (1991) avalaron los estudios previos, localizando melatonina inmunohistológicamente en la capa nuclear externa de la retina de rata. Utilizando un método *in vitro* que consiste en la lisis selectiva de las capas de células ganglionares y de la nuclear interna, tanto de la glía como la parte neural, Cahill y Besharse (1992) observaron biosíntesis de melatonina sensible a la luz, en la capa nuclear externa de la retina de *Xenopus*. En otros estudios *in vitro* se halló una alta correlación entre el número de fotorreceptores y actividad de la NAT, en un sistema de cultivo de células retinianas de pollo (Iuvone et al., 1990). En conjunto, estas evidencias sugieren que los fotorreceptores son el sitio más probable para la síntesis de melatonina retiniana.

La ablación pineal no posee ningún efecto significativo sobre el contenido de melatonina retiniana en aves (Mull, 1975; Reppert y Sagar, 1983;

Underwood et al., 1984). De la misma manera, no se observaron cambios en la actividad de la NAT retiniana luego de la pinealectomía (Hamm y Menaker, 1980). En contraste, en retinas de ratas pinealectomizadas, se observaron niveles incrementados de melatonina retiniana, un mes después de la remoción pineal (Yu et al., 1981; Reiter et al., 1983). Esta observación se correlaciona con el incremento en la actividad de la HIOMT retiniana en rata, luego de la pinealectomía (Nagle et al., 1973).

Aunque no existen evidencias directas de la secreción de melatonina retiniana al torrente sanguíneo, en retinas de cobayo se ha descrito la liberación del metoxiindol al medio de incubación (Yu et al., 1982), así como la presencia de N-acetilserotonina en el medio de incubación de retinas de rata (Chow et al., 1980). Estos resultados fueron corroborados por otros autores quienes demostraron que la [³H]-serotonina es convertida en [³H]-melatonina y liberada al medio de cultivo en retinas de rata (Redburn y Mitchell, 1989). En conjunto, las evidencias establecen que la retina de algunos vertebrados posee los mecanismos necesarios para sintetizar y secretar melatonina al espacio extracelular retiniano, regulando sus niveles *in situ* y posiblemente en otros tejidos oculares (Yu, 1993).

Con el objeto de examinar si la melatonina de origen retiniano contribuye a los niveles plasmáticos del metoxiindol, Pang y colaboradores observaron que la enucleación bilateral en pollos no reduce los niveles plasmáticos de melatonina después de varias semanas (Pang et al., 1974) y que estos niveles se incrementan ligeramente un día después de la cirugía en ratas (Tang y Pang, 1982). Experimentos realizados por varios investigadores corroboran que los niveles plasmáticos de melatonina en diversas especies son de origen exclusivamente pineal (Pang et al., 1985). Por consiguiente, estos resultados indican que la retina no contribuye significativamente a los niveles de melatonina circulante. Sin embargo, en vertebrados inferiores se ha descrito que la pinealectomía reduce sólo parcialmente los niveles circulantes de melatonina (Gern et al., 1978b; Roth et al., 1980; Ralph, 1980; Karn, 1983). De manera similar, se observaron niveles plasmáticos detectables de melatonina en ratón, rata, oveja y codorniz, pocas semanas después de la ablación pineal (Yu et al., 1981; Underwood et al., 1984; Reiter et al., 1983) sugiriendo que la melatonina es secretada por algún tejido extrapineal (Ralph, 1980).

III. 3. REGULACIÓN DE LA MELATONINA RETINIANA

Las enzimas NAT y HIOMT pineales responden rápidamente a cambios en la luz ambiental con máxima actividad durante la fase de oscuridad, en todas las especies examinadas incluyendo al hombre. La melatonina retiniana en algunas especies, al igual que la melatonina pineal (Klein, 1985; Reiter, 1989), exhibe un ritmo diario con niveles máximos en el período de oscuridad. El primer estudio fue realizado por Mull (1975), quien demostró que en la retina de pollos adaptados a un ciclo de luz:oscuridad (12:12), los niveles de melatonina son altos en la fase de oscuridad y bajos durante el día. Más tarde, varios autores describieron variaciones diarias en el contenido de melatonina con valores máximos durante la etapa de oscuridad en la retina de diversas especies de aves y mamíferos (Bubenick et al., 1978; Pang et al., 1980, 1982, 1983; Hamm and Menaker, 1980; Chow et al., 1980; Binkley, 1983; Underwood et al., 1984; Grotta et al., 1982). Estos resultados son compatibles con las oscilaciones durante el ciclo de 24 horas de la N-acetilserotonina, observadas en la retina de varias especies (Pang et al., 1981b, 1983). En este sentido, se ha demostrado actividad rítmica de la NAT en la retina de ratas, pollos, gorriones y ranas (Binkley et al., 1979; Hamm y Menaker, 1980; Besharse et al., 1984). La actividad retiniana de la NAT en el período de oscuridad es usualmente tres veces más elevada que la observada en la fase de luz.

En la retina de vertebrados se ha descrito la existencia de variaciones diarias de la actividad de la enzima HIOMT. En la rata y en la rana, esta enzima presenta variaciones diarias significativas con valores máximos en la última etapa del período de luz (Nagle et al., 1972; Eichler y Moore, 1975), desfasada con respecto al ritmo diario de melatonina (Wainwright, 1979; Kazula et al., 1993). En la retina del hámster dorado no se observaron variaciones diarias significativas de la HIOMT (Pévet et al., 1980). Estos resultados, junto con muchas otras pruebas experimentales, sugieren que la enzima regulatoria en la biosíntesis de melatonina en la retina, así como en la glándula pineal, es la NAT. Sin embargo, se ha postulado que el ritmo en la biosíntesis de melatonina en la retina, a diferencia de la melatonina de origen pineal, podría estar regulado por 2 ritmos circadianos paralelos a la variación diaria en los niveles de melatonina. Uno de ellos es el ritmo en la actividad de la triptofano hidroxilasa y otro en la actividad de la NAT, mientras que la

enzima HIOMT no parece tener un rol regulatorio clave (Hamm y Menaker, 1980; Iuvone y Besharse, 1983; Wainwright, 1979; Thomas e Iuvone, 1991; Zawilska y Nowak, 1992; Kazula et al., 1993).

Al igual que en la glándula pineal, la iluminación ambiental es uno de los factores más importantes en la regulación de la síntesis de melatonina retiniana. Ratas expuestas a iluminación continua no presentaron variaciones diarias de la actividad de la HIOMT (Cardinali et al., 1972); en cambio, en oscuridad constante se observaron variaciones diarias significativas en la actividad de esta enzima (Nagle et al., 1972). La actividad de la HIOMT retiniana en ratas adaptadas a oscuridad es más alta que la de las adaptadas a luz (Cremer-Bartels, 1979). Por otra parte, el ritmo diario de actividad de la NAT persiste en la retina de pollos expuestos a oscuridad continua, con una actividad enzimática más elevada durante la "noche subjetiva" (período en el que el animal se comporta como si fuera de noche) (Hamm y Menaker, 1980; Binkley et al., 1980). En estudios realizados en retina de rana, el ritmo en la actividad de la NAT persiste hasta tres días en oscuridad constante (Iuvone y Besharse, 1983). En todos los estudios realizados, el ritmo de actividad de la NAT desaparece en condiciones de luz continua. En pollos pinealectomizados, mantenidos en oscuridad constante, el ritmo retiniano de actividad de la NAT persiste, aunque la actividad de esta enzima durante el "día subjetivo" (período en el que el animal se comporta como si fuera de día) fue más elevada que durante la fase diurna de los animales adaptados al fotoperíodo normal (Hamm y Menaker, 1980). En cobayos expuestos a un período prolongado de oscuridad, los niveles de melatonina en la retina aumentan significativamente; en cambio, cuando los animales son expuestos a un período prolongado de luz, el contenido retiniano de melatonina disminuye (Pang et al., 1982). Estos resultados fueron corroborados en la retina de rana. Los niveles normalmente bajos de melatonina en la retina de estos anfibios en condiciones de luz, aumentaron significativamente luego de 6 horas de exposición a la oscuridad. Asimismo, los altos niveles observados en oscuridad, disminuyeron significativamente luego de la exposición a dos horas de luz (Pang et al., 1985).

Los resultados mencionados se obtuvieron en experimentos *in vivo* en los que no puede descartarse la influencia de un mecanismo de control desde el sistema nervioso central. Sin embargo, en experimentos *in vitro*, se observó

que la síntesis y liberación de N-acetilserotonina y melatonina son directamente regulados por la iluminación ambiental, siendo incrementadas por la oscuridad y reducidas por la luz (Yu et al., 1982, Redburn y Mitchell, 1989). Adicionalmente, se observaron cambios en la actividad de la NAT en retinas de rana *in vitro*, en respuesta a la luz y a la oscuridad (Iuvone y Besharse, 1983). En la retina de *Xenopus* se ha demostrado que no es necesaria la presencia de las capas internas retinianas para responder a la señal fótica en la síntesis de melatonina (Eichler y Moore, 1975). Recientemente, se han descrito ritmos oculares de melatonina en palomas, que persisten en condiciones de luz tenue constante, con valores elevados durante la noche subjetiva y valores bajos en el día subjetivo. Adicionalmente, la exposición de las aves a 2 horas de luz en la mitad de la noche suprime agudamente los niveles nocturnos del metoxiindol (Adachi et al., 1995).

En el caso de confirmarse que la síntesis de melatonina ocurre en el fotorreceptor, el conjunto de resultados previamente mencionados podría sugerir que la hiperpolarización del fotorreceptor por la luz provoca una disminución en la síntesis de melatonina; en contraste, la despolarización del fotorreceptor inducida por oscuridad podría provocar un incremento en la síntesis del compuesto indólico (Yu et al., 1982; Pang y Yew, 1979).

La regulación de la biosíntesis de melatonina ha sido extensivamente estudiada en la retina de *Xenopus*, que al igual que en la retina de mamíferos, es sensible a la luz y la oscuridad; se ha postulado sin embargo que podría existir un oscilador circadiano endógeno en la retina de esta especie regulando paralelamente este proceso (Cahill et al., 1991).

En la glándula pineal, como ya se mencionara, el estímulo luminoso provoca la inhibición de la liberación de noradrenalina de los terminales simpáticos inhibiendo la producción de melatonina. En oscuridad, en cambio, la noradrenalina activa receptores β -adrenérgicos que estimulan la síntesis y secreción de melatonina por los pinealocitos (Axelrod, 1974; Reiter, 1991). La noradrenalina estimula la secreción de N-acetilserotonina en la retina de cobayo en cultivo (Yu et al., 1982; Chow et al., 1980). En retinas de rana, en contraste, la síntesis de melatonina no es afectada por noradrenalina. El isoproterenol, agonista β -adrenérgico, no estimula la liberación de melatonina en ojos de *Xenopus* (Cahill y Besharse, 1991).

Existen múltiples evidencias que señalan a la dopamina retiniana como una señal trascendente en la regulación de la biosíntesis de melatonina (Iuvone, 1988). En este sentido, se describió un efecto inhibitorio de la dopamina sobre la actividad de la NAT en cultivos de retina de rana (Iuvone y Besharse, 1986). El efecto de la dopamina es bloqueado por antagonistas dopaminérgicos sugiriendo que su acción es mediada por receptores específicos. Se ha descrito que el tratamiento de ratas y conejos *in vivo*, con un agonista dopaminérgico, inhibe la actividad de la NAT retiniana (Nowak et al., 1989). Los antagonistas dopaminérgicos revierten el efecto inhibitorio de la luz sobre la actividad de la NAT. Por consiguiente, se ha sugerido que la dopamina es un mediador del efecto inhibitorio de la luz sobre la síntesis de melatonina en la retina (Iuvone, 1988). Un estudio más reciente en cultivos de ojos de *Xenopus* señala la participación de un receptor dopaminérgico de tipo D₂ en este efecto inhibitorio (Cahill y Besharse, 1991). La activación de receptores dopaminérgicos D-2 y D-4 suprimen el incremento nocturno de la actividad de la NAT y del contenido de melatonina en retina de *Xenopus*, (Iuvone y Besharse, 1986b; Zawilska e Iuvone, 1989) y de pollo (Zawilska y Nowak, 1994a, b), a través de un mecanismo que involucra la inhibición de la adenilato ciclasa y la consecuente disminución en los niveles de AMPc (Zawilska y Nowak, 1995). El bloqueo de receptores dopaminérgicos con espiperona o la inhibición de la síntesis de dopamina, incrementa la actividad de la NAT en presencia de luz (Kazula et al., 1993). En la retina de muchos vertebrados, la síntesis y liberación de dopamina son estimuladas por la luz y exhiben un ritmo diario, con valores diurnos elevados, opuesto al ritmo descrito para la melatonina retiniana (Besharse et al., 1988; Boatright et al., 1987, 1989, 1994; Dearry y Burnside, 1989; Gibson, 1990).

En forma paralela al bien establecido rol inhibitorio de la dopamina sobre la síntesis de melatonina, existen algunas evidencias que sugieren la participación del sistema gabaérgico en este proceso. Un bloqueante del canal de Cl⁻ del receptor gabaérgico de tipo A, la picrotoxina, inhibe el incremento de la actividad de la NAT inducido por la oscuridad en ojos de *Xenopus*, en tanto que agonistas gabaérgicos aumentan su actividad durante la fase de luz (Boatright e Iuvone, 1989a, b). Se ha sugerido que el efecto gabaérgico podría estar mediado por la inhibición de la liberación de dopamina, a través de receptores específicos localizados en las células amácrinas o interplexiformes

dopaminérgicas (Yazulla, 1986; Kamp y Morgan, 1980). Evidencias más recientes indican que la administración sistémica o intraocular de muscimol, agonista gabaérgico del receptor GABA_A, incrementa los niveles retinianos de melatonina y la actividad de la NAT en pollos adaptados a la luz. Estos efectos fueron inhibidos específicamente por antagonistas del receptor GABA_A (Kazula et al., 1993). Además, inhibidores de la recaptación y de la degradación gabaérgica incrementan la actividad de la NAT retiniana en animales adaptados a la luz. La administración de los bloqueantes gabaérgicos picrotoxina y bicuculina disminuye significativamente el incremento nocturno en la actividad retiniana de la NAT en pollos. Diversas evidencias indican que la síntesis y secreción de dopamina estimulada por la luz es significativamente inhibida por GABA (Kamp y Morgan, 1981; Boatright e Iuvone, 1989b, 1990; Boatright et al., 1994). El incremento en la actividad de la NAT inducido por muscimol es inhibido por la administración de agonistas dopaminérgicos. Los efectos del muscimol y los antagonistas dopaminérgicos no son aditivos. Asimismo, la disminución de la actividad de la NAT por antagonistas gabaérgicos en oscuridad es revertida por la aplicación de un antagonista dopaminérgico (Kazula et al., 1993). En la retina de *Xenopus*, estudios *in vitro* indican que la biosíntesis de melatonina es regulada por agonistas y antagonistas gabaérgicos (Boatright e Iuvone, 1989a). Estos efectos podrían involucrar la modulación de la liberación de dopamina (Boatright e Iuvone, 1989b, 1990).

Si bien el rol de la dopamina ha sido claramente demostrado, no parece ser ésta la única responsable del efecto supresor de la luz sobre la producción de melatonina retiniana, dado que la estimulación máxima con antagonistas dopaminérgicos y agonistas gabaérgicos no reproduce el incremento de los niveles de melatonina inducido por la oscuridad. Esta observación sugiere que existen factores adicionales que regulan la producción de melatonina en la retina. Estudios en ojos de *Xenopus* sugieren que el incremento retiniano de la actividad de la NAT en oscuridad, es mediado por un proceso dependiente de calcio (Iuvone y Besharse, 1986a, 1986c). Aunque se desconoce el mecanismo de acción del calcio, se ha postulado que este ion afecta la síntesis de melatonina a través de su efecto sobre la síntesis de AMPc (Zawilska et al., 1992).

Los fotorreceptores contienen canales de calcio activables por voltaje (Fain et al., 1980; Corey et al., 1984), que se encuentran abiertos en condiciones de oscuridad. Se ha postulado que el influjo de calcio por estos canales en el terminal del fotorreceptor está involucrado en la regulación de la actividad de la NAT. En este sentido, estudios en cultivos de fotorreceptores de retina de pollo, indican que la despolarización por potasio incrementa la acumulación de AMPc y la actividad de la NAT, efecto mediado por el influjo de calcio a través de canales de tipo L dependientes de voltaje (Avendano et al., 1990; Iuvone et al., 1991). En el mismo sistema, la síntesis de AMPc y el incremento en la actividad de la NAT, inducidos por alto potasio, son incrementados por inhibidores de la fosfodiesterasa y bloqueados por inhibidores de la adenilato ciclasa (Iuvone et al., 1991). Una evidencia adicional indica que la administración de inhibidores de los canales de calcio voltaje dependientes tipo L decrece la actividad de la NAT estimulada por la oscuridad, pero no la estimulada por análogos del AMPc en retinas de pollo (Zawilska et al., 1992). De esta manera, la acción de la luz sobre el potencial de membrana acoplada a su acción sobre la dopamina, podrían combinarse para mediar la supresión de la melatonina retiniana inducida por la luz (Kazula et al., 1993).

Por otra parte, se ha descrito que la síntesis de melatonina retiniana es sensible a la temperatura. En vertebrados superiores, los niveles de melatonina retiniana fueron significativamente incrementado luego de exponer animales durante 30 ó 90 minutos a temperaturas bajas (Shiu y Pang, 1985). Se demostró que el ritmo de actividad de la HIOMT en retina de rana, no es modificado por el fotoperíodo si se mantiene constante la temperatura (Eichler y Moore, 1975).

Adicionalmente, la disponibilidad de serotonina parece ser un factor limitante en la biosíntesis de melatonina retiniana, al menos en el modelo de "copa ocular" de *Xenopus* (Cahill y Besharse, 1990). Teniendo en cuenta que la adición de 100 mM de serotonina y no de triptofano al medio de perfusión, incrementa 70 veces la liberación de melatonina, los autores concluyen que el paso limitante en el camino biosintético de la melatonina en este modelo, es la 5-hidroxilación del triptofano (Cahill y Besharse, 1990).

Por otra parte, la castración en ratas macho (Pang y Allen, 1986; Reiter et al., 1983) provoca una disminución de los niveles de melatonina retiniana.

Luego de la orquidectomía, la actividad de la HIOMT fue reducida y el efecto de la castración fue revertido por la administración de testosterona (Nagle et al., 1974). Sin embargo, los niveles de melatonina en retina de rata no son significativamente diferentes entre machos y hembras (Bubenik et al., 1978). En hembras, el daño inducido por la luz en la retina, fue menos severo en animales ovariectomizados, y se ha sugerido que este efecto es mediado por la disminución de melatonina retiniana (Bubenik y Purtil, 1980).

En los animales añosos se ha observado una pérdida de la ritmicidad de la melatonina retiniana que se ha relacionado con la mayor susceptibilidad al daño inducido por la luz en ratas viejas (Pulido y Clifford, 1986).

III. 4. RELOJ CIRCADIANO INTRAOCULAR

Los relojes y calendarios internos permiten a los organismos medir el transcurso del tiempo, para poder así organizar su fisiología en ritmos diarios o estacionales, sincronizados con el tiempo externo prevaleciente, mediante el uso de claves tales como la iluminación ambiental. El sistema circadiano en mamíferos posee tres componentes principales: la retina y sus proyecciones específicas al núcleo supraquiasmático hipotalámico (NSQ) y al núcleo intergeniculado talámico; el NSQ y sus proyecciones al hipotálamo, tálamo y cerebro basal-anterior; y el núcleo intergeniculado y sus proyecciones al NSQ (Moore, 1993).

Los ritmos de aproximadamente 24 h en mamíferos, son generados por osciladores circadianos endógenos en el NSQ y son sincronizados con los ciclos diarios de luz-oscuridad a través de fotorreceptores especializados en la retina. En mamíferos, el NSQ posee el rol de "marcapasos maestro" en el control de un amplio espectro de ritmos comportamentales y fisiológicos, incluyendo locomoción, sueño-vigilia, termorregulación, función cardiovascular, y muchos procesos endócrinos (Cassone et al., 1993). Los osciladores endógenos expresan ritmos a pesar de que el organismo se encuentre expuesto a un medio ambiente constante, es decir en condiciones de "libre curso", con una frecuencia endógena natural cercana a las 24 horas. En presencia de señales periódicas exógenas (sincronizador o "zeitgeber"), generalmente el ciclo de luz-oscuridad, los ritmos circadianos se sincronizan

exactamente a 24 horas. Entre los ritmos regulados por el NSQ se encuentra la regulación de la síntesis y secreción de melatonina pineal (Klein, 1979).

La existencia de un marcapasos distinto del NSQ en mamíferos, ha sido objeto de gran controversia (Rusak, 1989). En varias especies de vertebrados existen evidencias que indican la regulación local de los ritmos oculares. Otras evidencias a favor del control local de los ritmos oculares se basan en que manipulaciones endócrinas en la rata, gangliectomía cervical superior, oclusión monocular o transección del nervio óptico (La Vail y Ward, 1978; Tamai et al., 1978; Goldman et al., 1980; Terstein et al., 1980) no suprimen el ritmo de recambio de los discos de membrana en los fotorreceptores, aunque la posible existencia de eferencias centrales que regulen este proceso rítmico ocular no puede ser descartada. Teirstein y colaboradores (1980) no lograron inducir un cambio de fase del ritmo de recambio de los discos de membrana de los fotorreceptores, en animales con transección del nervio óptico. Estos resultados sugieren la posibilidad de una vía eferente de control desde el SNC que podría regular la sincronización de este ritmo a distintos ciclos de luz-oscuridad.

En experimentos realizados en codorniz, se demostró que el ritmo en el contenido de melatonina retiniana es sincronizable por la luz en forma independiente en cada ojo, sugiriendo la presencia de marcapasos en ambos ojos. En esta especie, el ritmo retiniano de melatonina persiste luego de seccionar el nervio óptico (Underwood et al., 1984; Underwood y Siopes, 1985; Underwood et al., 1988). En ojos de *Xenopus* mantenidos *in vitro*, los ritmos retinianos en la actividad de la NAT y en los niveles de melatonina persisten durante 3 días en oscuridad constante y la ritmicidad puede ser sincronizada mediante la reversión del ciclo de luz-oscuridad (Basinger et al., 1976; Besharse e Iuvone, 1983). En ratas, con lesión bilateral de los núcleos supraquiasmáticos, expuestas a condiciones de oscuridad constante, el ritmo de recambio de los discos de membrana de los fotorreceptores fue indistinguible del de las ratas controles (Remé et al., 1991). Estas evidencias plantean dudas sobre la participación del NSQ en la generación de los ritmos oculares y hacen factible la hipótesis de la existencia de un marcapasos retiniano.

Se ha descrito que los pinealocitos, así como los fotorreceptores retinianos de las aves responden directamente a la luz y la oscuridad en la

regulación de la biosíntesis de melatonina; la presencia de un marcapasos circadiano endógeno parece estar asociada a la señal fótica en la regulación de este proceso.

Durante la redacción de este trabajo de tesis, Tosini y Menaker (1996) demostraron que la retina de hámster dorado *in vitro*, posee la capacidad de mantener el ritmo ocular de melatonina, aún en condiciones ambientales constantes.

III. 5. FUNCIONES DE LA MELATONINA EN LA RETINA

Los ojos de los vertebrados poseen importantes mecanismos de adaptación en respuesta a las variaciones de la iluminación ambiental. En particular, los ojos de los vertebrados inferiores presentan movimientos de los núcleos y los segmentos externos de las células fotorreceptoras en presencia de luz o de oscuridad. La importancia adaptativa de estos cambios fotomecánicos es la de incrementar la sensibilidad visual en condiciones de luz tenue u oscuridad o bien mejorar la agudeza visual, disminuyendo la sensibilidad del fotorreceptor en condiciones de luz (Pang et al., 1978). Los fotorreceptores de los vertebrados inferiores presentan movimientos retinomotores que no han sido observados en mamíferos. En peces y ranas, los cambios en la iluminación ambiental provocan la elongación de los conos en oscuridad y la contracción en luz, mientras que los bastones presentan movimientos opuestos. Se han descrito cambios circadianos en los movimientos retinomotores en varias especies (Welsh y Osborne, 1937; Burnside y Nagle, 1983). La melatonina induce la contracción de los conos en la retina de rana (Quay y McLeod, 1968). Se ha postulado que los sistemas intrarretinianos de melatonina, GABA y dopamina, interactuarían antagónicamente para regular los movimientos retinomotores en vertebrados inferiores (Pierce y Besharse, 1986).

Los segmentos externos de los bastones son renovados activamente. En la base del segmento externo del fotorreceptor se sintetizan continuamente nuevos discos de membrana que contienen fotopigmentos (Young, 1967, 1978). Las células del epitelio pigmentario fagocitan los discos del extremo apical del fotorreceptor a través de sus microvellosidades (La Vail, 1976; Bok y

Young, 1979). La tasa de recambio ("turnover") de los discos de membrana presenta un ritmo diario con valores máximos 0.5 a 2.5 horas inmediatamente después del encendido de la luz (La Vail, 1976). En los conos, el proceso de renovación de los discos es similar al de los bastones. El ritmo de recambio de los discos en los conos es bifásico con picos a las 2 ó 3 horas y a las 5 ó 6 horas luego del apagado de la luz (Young, 1977, 1978; Steimberg et al., 1977; Long et al., 1986). Besharse y Dunis (1983) observaron en retina de rana, que la melatonina *in vitro* estimula el recambio de los discos de membrana inducido por la luz. Otros autores describieron en retina de rata, un incremento en el turnover de los discos, inducido por implantes subcutáneos de melatonina (White y Fisher, 1989). Muchos autores han coincidido en demostrar que la pinealectomía y la gangliectomía cervical superior no afectan la frecuencia de recambio de los discos, por consiguiente la participación de la glándula pineal en la regulación de este mecanismo fue descartada (Hollyfield y Basinger, 1978; Goldman, 1982; La Vail y Ward, 1978; Tamai et al., 1982). Se ha especulado, asimismo, que el efecto de la melatonina ocurre primariamente a través de modificaciones sobre la morfología de las células del epitelio pigmentario y sus microvellosidades que intervienen en la fagocitosis de los discos. Dado que la melatonina afecta el recambio de los discos de membrana de los fotorreceptores mientras que la glándula pineal y la melatonina sistémica no parecen estar involucradas, se ha sugerido que la ritmicidad de este proceso está asociada con el ritmo de melatonina de origen local.

La melatonina en concentraciones picomolares y de manera dependiente del calcio extracelular, inhibe el eflujo de ^3H -dopamina inducido por alto potasio o estímulo eléctrico. Este efecto podría estar mediado a través de la activación de heterorreceptores presinápticos para el metoxiindol (Dubocovich, 1983; Dubocovich y Takahashi, 1987). Los más potentes agonistas dopaminérgicos para los autorreceptores D-2, agonistas opiodes o agonistas de los receptores α_2 presinápticos, requieren dosis 500-6000 veces más altas que la concentración de melatonina que provoca una inhibición equivalente en la liberación de ^3H -dopamina en la retina de rata. Teniendo en cuenta estos resultados se ha sugerido que, en condiciones de oscuridad, una elevada concentración de melatonina podría inhibir la liberación de dopamina en la retina. En contraste, los bajos niveles de melatonina en el período de luz, liberarían el freno de las células amácrinas dopaminérgicas, resultando en un

incremento en la liberación de dopamina (Dubocovich,1984). Además, se ha demostrado que la melatonina inhibe la unión específica de dopamina en la retina neural de mamíferos. Esta inhibición es reducida por el antagonista de la melatonina, luzindol, en la retina de conejo (Dubocovich, 1988b), aunque la especificidad de este compuesto no ha sido concluyentemente demostrada en otros sistemas.

En hámsteres, inyecciones diarias subcutáneas de melatonina provocan un incremento en el peso de los ojos, así como un incremento en el contenido de fluido en el espacio intraocular (Quay, 1982, 1984). La pinealectomía no afecta significativamente los resultados obtenidos en retina de hámsteres inyectados con vehículo o en los tratados con melatonina. En 1985, Chiou y colaboradores sugirieron la participación de la melatonina en la variación diaria de la presión intraocular, con valores altos durante la noche (Chiou et al., 1985). Inyecciones intraoculares de melatonina pero no de serotonina o de NAS, aumentan la presión intraocular en conejos. En un estudio reciente, la melatonina, administrada por vía endovenosa o infusión intra-arterial, no modificó la presión intraocular (Kiuchi y Gregory, 1992). En contraste, en humanos mantenidos deliberadamente despiertos en condiciones de luz tenue, la melatonina administrada oralmente generó una disminución de la presión intraocular (Samples et al., 1988).

La interacción entre los fotorreceptores y el epitelio pigmentario es esencial para la fisiología visual (Bok, 1985). La melatonina induce la agregación de melanosomas en el epitelio pigmentario de la retina de peces (Chez y Ali,1976). Asimismo, se demostró que la melatonina provoca agregación del pigmento en los melanocitos del epitelio pigmentario de cobayo y de hámster (Pang y Yew,1979; Krasovich y Benson, 1983). Existen evidencias que sugieren que la melatonina y la dopamina locales actúan en el epitelio pigmentario en respuesta a luz u oscuridad (Dearry y Burnside, 1989; Besharse e Iuvone, 1992; Pierce y Besharse, 1986).

La agregación de gránulos de melanina inducida por la melatonina en la retina, conjuntamente con el rol regulatorio de la iluminación ambiental sobre la síntesis y la liberación de melatonina en el fotorreceptor, apoyan la siguiente hipótesis: en luz, el fotorreceptor hiperpolarizado no produce melatonina. Los gránulos de pigmentos, en el epitelio pigmentario, se dispersan en ausencia de melatonina, posiblemente a través de la dopamina o de la hormona estimulante

de los melanocitos (MSH), generando una mayor absorción de la luz, que suprime consecuentemente la excesiva reflexión a través de las capas visuales, desde la coroides. Este mecanismo disminuye la sensibilidad a la luz pero aumenta la agudeza visual en los vertebrados. En contraste, en condiciones de oscuridad, el fotorreceptor despolarizado libera melatonina que actúa localmente sobre el epitelio pigmentario y la coroides induciendo la agregación del pigmento, lo que permite mayor difusión y reflexión de la luz (Carr y Siegle, 1979). Este mecanismo conduce a una mayor sensibilización de los fotorreceptores en detrimento de la agudeza visual. La sensibilidad visual varía durante el ciclo de 24 horas, incrementándose en el transcurso de la noche (Remé et al., 1991). La melatonina administrada intraocularmente incrementa la sensibilidad visual en conejos (Arendt, 1995). En conjunto, las evidencias descritas ponen de manifiesto la importancia de la melatonina de origen local sobre los mecanismos retinianos involucrados en los procesos de adaptación a la luz o la oscuridad.

Varias evidencias indican que la melatonina aumenta el daño retiniano inducido por la luz (Bubenik et al, 1978; Leino et al., 1984). La exposición a luz continua causa daños irreversibles en la retina de rata (Noell et al.,1966; O'Steen y Lytle, 1971), a través de la ruptura de los discos de membrana seguida por una completa desorganización y degeneración de los segmentos externos, pincosis nuclear y por último degeneración de los segmentos internos (O'Steen y Lytle, 1971; Bubenik y Purtill, 1980). El grado de degeneración es incrementado por la inyección de melatonina (Bubenik y Purtill, 1980). Una de las hipótesis postuladas para explicar este efecto es que la melatonina aumenta la sensibilidad del fotorreceptor a la luz al inducir la contracción del pigmento, potenciando la acción degenerativa de la luz. Una explicación alternativa involucraría la liberación de dopamina y el cambio de la tasa metabólica. Puesto que se ha descrito un rol principalmente inhibitorio para las neuronas dopaminérgicas (Kramer, 1971), una disminución en la liberación de dopamina provocada por la melatonina (Dubocovich, 1983, 1984) podría inducir un incremento de la tasa metabólica retiniana. Un metabolismo excesivamente elevado podría redundar en un severo daño en la estructura de la retina. Por último, se ha postulado que la melatonina a través de su acción sobre las microvellosidades de las células del epitelio pigmentario, provoca una fagocitosis anormal de los discos de membrana y un consecuente daño

retiniano. Aislados o en combinación, estos procesos podrían explicar el efecto potenciador de la melatonina sobre los mecanismos degenerativos, inducidos por la exposición a luz continua.

La melatonina inhibe la proliferación *in vitro* de las células del epitelio pigmentario bovino y humano. La melatonina interfiere con el efecto estimulador del factor de crecimiento epidérmico humano sobre las células del EP (Yu et al., 1991) a través de un efecto antiproliferativo sobre células mitóticamente activas, sin citotoxicidad sobre células confluentes en cultivo (Crews et al., 1992). Estos resultados son consistentes con el efecto de la melatonina sobre otros tipos celulares del sistema visual y parecen indicar que la melatonina no es citotóxica pero sí oncostática (Blask y Hill, 1988; Aldous et al., 1985).

Se ha observado que la melatonina causa una disminución de la onda C del electroretinograma y del potencial de reposo (Textorius y Nilsson, 1987). En el EP de pollo se ha demostrado que la melatonina altera el potencial de membrana y las respuestas evocadas por la luz (Nao-i et al., 1989). La melatonina puede afectar el potencial de membrana del EP de retina de pollo directamente o a través de las células retinianas o de la coroides, puesto que la perfusión de melatonina sobre el lado retiniano genera despolarización de la membrana apical del EP y aumento de la resistencia, seguido de hiperpolarización e incremento de la resistencia de la membrana basal, como ocurre cuando se perfunde melatonina del lado de la coroides (Nao-i et al., 1989).

Por otra parte, se ha descrito que la melatonina incrementa la sensibilidad de las células horizontales de la retina de salamandra (Wiechmann et al., 1988). Los autores sugieren que la melatonina retiniana liberada en oscuridad, aumenta la sensibilidad de las neuronas de segundo orden cuando el "input" fótico que llega a la retina es bajo.

III. 6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MELATONINA

Múltiples pruebas experimentales demuestran que la melatonina ejerce su efecto a través de la interacción con receptores específicos. Inicialmente se caracterizaron sitios de unión a melatonina en membranas de hipotálamo

bovino, corteza cerebral y cerebelo así como en cerebro de rata y de hámster y en tejidos periféricos, utilizando [^3H]-melatonina como radioligando. Más tarde, se describió la coexistencia de sitios de unión tanto en citosol como en membranas de diferentes áreas cerebrales. La constante de disociación (K_d) de los sitios descritos fue de 1 a 10 nM y la concentración máxima de sitios de unión alrededor de 100 fmol/mg de proteína (Dubocovich, 1988; Cohen et al., 1978; Niles et al., 1979; Cardinali et al., 1979).

Posteriormente, la introducción del uso de 2-[^{125}I]-melatonina como radioligando, puesto que posee una mayor actividad específica, permitió la caracterización y localización de sitios de unión de alta afinidad en el sistema nervioso central (Laudon y Zisapel, 1986; Dubocovich y Takahashi, 1987; Vanecek et al., 1987; Duncan et al., 1988). A través de estudios funcionales y estudios de "binding" de 2-[^{125}I]-melatonina, por métodos bioquímicos y autorradiográficos se han descrito receptores con constantes de disociación en el orden picomolar en núcleo supraquiasmático, pars tuberalis, área postrema, retina de pollo y conejo, y cerebro de hámster (Dubocovich, 1988; Reppert et al., 1988), así como en el núcleo paraventricular talámico, colículo superior, arteria caudal y polígono de Willis (Dubocovich, 1995). Los sitios de baja afinidad previamente evidenciados a través del ligando tritiado fueron también revelados mediante el uso de 2-[^{125}I]-melatonina.

Se ha propuesto la existencia de dos sitios receptores distintos para melatonina, denominados ML-1 y ML-2 (Dubocovich, 1988). El sitio ML-1 inicialmente caracterizado en la retina de pollo, representa el sitio de unión de alta afinidad (Dubocovich y Takahashi, 1987; Dubocovich, 1988, 1988a). Este sitio presenta a su vez, un estado de alta afinidad y uno de baja afinidad. El sitio ML-2, identificado en el cerebro de hámster y de ratón, posee una K_d en el orden nanomolar y se ha localizado en hipotálamo, corteza cerebral, cerebelo e hipocampo, así como en testículo y riñón (Dubocovich, 1988; Laudon y Zisapel, 1987; Zisapel et al., 1988, 1991; Duncan et al., 1988; Duncan et al., 1989). El sitio de unión ML-2 ha sido frecuentemente confundido con el estado de baja afinidad del ML-1. Sin embargo existen diferencias en las propiedades cinéticas y las características farmacológicas entre ambos (Figura H). La unión de 2-[^{125}I]melatonina al sitio ML-1 es reversible, saturable, y de alta afinidad; presenta cinéticas lentas de asociación y disociación y es sensible a la temperatura con máxima afinidad a 25°C (Dubocovich y

Takahashi, 1987; Krause y Dubocovich, 1991; Dubocovich, 1988, 1995; Stankov et al., 1991,1992; Sciuciak et al., 1991). El sitio ML-2, en contraste, presenta baja afinidad y cinéticas rápidas de asociación y disociación. La máxima afinidad fue observada a una temperatura de 4°C (Duncan et al., 1988; Dubocovich et al., 1989; Dubocovich, 1995). Adicionalmente, se encontró que los sitios ML-1 y ML-2 muestran marcadas diferencias en cuanto a la presencia de iones y nucleótidos de guanina (Dubocovich y Takahashi, 1987; Duncan et al., 1989; Laitinen y Saavedra, 1990a; 1990b; Morgan et al., 1989; Dubocovich, 1995), (Figura H). En contraste, Sudgen y Chong (1991) proponen la existencia de una sola clase de sitios receptores, con un perfil farmacológico similar en diferentes especies, y sugieren la posibilidad de que la distinción entre sitios de binding de alta y baja afinidad, sea ficticia.

En condiciones fisiológicas, los niveles de melatonina circulante se encuentran en el rango picomolar (Pang, 1985). Por consiguiente, sólo un pequeño porcentaje de los sitios de baja afinidad podrían ser activados, sugiriendo una limitada relevancia fisiológica para estos (Dubocovich, 1983). En contraste, la afinidad de los sitios ML-1 correlaciona con los niveles de melatonina circulante y podrían ser los responsables de la acción del metoxiindol en condiciones fisiológicas (Dubocovich, 1988; Stankov y Reiter, 1990). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las concentraciones de la hormona alcanzadas en espacios reducidos dentro del SNC en condiciones fisiológicas son desconocidas. A este respecto, existen evidencias que en el hipotálamo mediobasal las concentraciones de melatonina son 50 veces más elevadas que las circulantes y se encuentran en el rango nanomolar (Cardinali et al., 1991).

Figura H. Características de los sitios de unión a 2-[¹²⁵I]melatonina

	ML-1	ML-2
Nombre corriente	Sitio de alta afinidad (pM)	Sitio de baja afinidad (nM)
Estados de afinidad	Alto (10-300 pM) - Bajo (0.3-5 nM)	Alto (0.9-10 nM)
Cinéticas: asociación disociación	lenta (t1/2= 9-60 min) lenta (t1/2= < 40 min)	rápida (t1/2= 1-2 min) rápida (t1/2= 1-2 min)
Regulación		
GTP y análogos	si	no
Na ⁺	si	no
Ca ²⁺	si	no
Mg ²⁺	no	no
Temperatura	si (aumenta la afinidad)	si (disminuye la afinidad)
Perfil farmacológico Secuencia de afinidades	2-Iodomelatonina ≥ melatonina > 6-OH-melatonina >> N-acetilserotonina >> prazosina > serotonina	2-Iodomelatonina > prazosina ≥ N-acetilserotonina ≥ 6-OH-melatonina ≥ melatonina >> serotonina
Localización	Retina, NSQ, Núcleo Paraventricular Talámico, Colículo Superior, Pars Tuberalis, Área Postrema, Arteria Caudal	Cerebro de ratón y hámster Testículos y riñón de hámster Células de melanoma RPMI 1846

Un gran número de evidencias demuestra la existencia de variaciones diarias en la respuesta biológica a la melatonina (Reiter, 1987). La administración de melatonina en la fase de luz tardía resulta crítica para los efectos del metoxiindol sobre el sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal (Tamarkin et al., 1976; Reiter et al., 1980). Se ha sugerido que la sensibilidad de los receptores puede jugar un rol muy importante en los cambios diarios de la respuesta a la acción de la melatonina (Margolis y Linch, 1981; Stankov y Reiter, 1990).

Recientemente, a partir de melanóforos de *Xenopus laevis* inmortalizados, se ha clonado un "ADN copia" que codifica para un receptor de melatonina. Este último pertenece a una nueva subfamilia de receptores con

siete dominios transmembrana, acoplados a proteína G (Ebisawa et al., 1994). Asimismo "ADN copias" clonados de células humanas y de ovejas, codifican para un receptor de melatonina que une 2-[¹²⁵I]melatonina con alta afinidad (Reppert et al., 1994). La expresión del ARN mensajero del receptor para melatonina fue observada por hibridización *in situ*, sólo en áreas del cerebro e hipófisis de mamífero, que también exhibieron sitios de binding de alta afinidad por métodos autorradiográficos (Reppert et al., 1994).

Se ha sugerido que los receptores de melatonina en la retina neural y en el colículo superior podrían estar involucrados en la regulación de la función visual (Dubocovich, 1983, 1987, 1995). Los receptores localizados en el NSQ se han relacionado con el efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos (Armstrong y Redman, 1993), en tanto que los sitios ubicados en el núcleo paraventricular talámico han sido involucrados en la regulación de la función límbica (Krause y Dubocovich, 1990; Reppert et al., 1994). Se ha sugerido que los receptores no neurales como los localizados en la pars tuberalis regulan la función reproductiva en especies con reproducción estacional (Reppert et al., 1994; Dubocovich, 1995).

La melatonina retiniana actúa aparentemente a través de receptores específicos, como fue inicialmente descrito por Gern y colaboradores (1980), en homogenatos de retina neural, epitelio pigmentario y coroides de peces. Utilizando ³H-melatonina como radioligando se demostró la existencia de unión específica, tanto en la retina neural como en el epitelio pigmentario. Los sitios de unión para ³H-melatonina han sido localizados principalmente en la capa nuclear externa de la retina de vertebrados (Wiechman et al., 1986). Mediante el uso de 2-[¹²⁵I]melatonina, se ha demostrado la presencia de sitios específicos de alta afinidad en la retina de rana, pollo, conejo y rata, con una Kd en el orden picomolar (Skene, 1992). Sitios de unión de alta afinidad se han localizado principalmente en la capa plexiforme interna de varias especies de vertebrados (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1991; Laitinen y Saavedra, 1990a; Blazynski y Dubocovich, 1991). La capa nuclear interna de la retina de conejo así como las capas de segmentos internos y externos de los fotorreceptores de la retina de ratón presentan unión específica de alta afinidad a 2-[¹²⁵I]melatonina (Blazynski y Dubocovich, 1991). A pesar de la existencia de sitios de unión específicos en la retina, pocos estudios han correlacionado estos sitios con una respuesta funcional mediada por el

metoxiindol. Como se mencionó previamente, Dubocovich y colaboradores demostraron una correlación altamente significativa entre la capacidad de la melatonina y sus análogos indólicos de inhibir la liberación de dopamina y la capacidad de competir por los sitios de unión a 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina de pollo y conejo (Dubocovich, 1988). El efecto de la melatonina sobre la liberación de dopamina está mediado a través de la activación de un receptor con las características farmacológicas del subtipo ML-1. Los ligandos más potentes del subtipo ML-2 resultaron completamente inactivos en la inducción de este efecto (Dubocovich, 1985; Dubocovich, 1995). Asimismo, en membranas de retina de pollo, estudios de "binding" con 2-[¹²⁵I]melatonina han revelado la existencia del sitio ML-1 con dos estados de afinidad (Dubocovich, 1991). Este tipo de receptor en la retina del pollo muestra el mismo perfil farmacológico del heterorreceptor presináptico, involucrado en la inhibición de la liberación de dopamina (Dubocovich, 1983, 1987, 1988; Krause y Dubocovich, 1991). La localización de los sitios de unión de melatonina en la capa plexiforme interna dan un aval anatómico a estos resultados, ya que las neuronas dopaminérgicas se encuentran entre las células amácrinas e interplexiformes retinianas, que hacen sinapsis en la capa plexiforme interna (Ehinger y Dowling, 1987).

Por otra parte, existen evidencias a favor de la existencia de sitios citosólicos y nucleares, a través de los que la melatonina podría ejercer una variedad de efectos celulares, en tejidos desprovistos de receptores de membrana (Mennenga et al., 1991; Menendez Pelaez y Reiter, 1993).

III. 6. a. MECANISMOS INTRACELULARES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA A LA MELATONINA

Evidencias experimentales señalan que el mecanismo intracelular acoplado al sitio receptor ML-1 involucra una proteína G_i , que produce inhibición de la adenilato ciclasa. Los análogos del GTP, que interfieren con la regeneración de receptores acoplados a proteínas G_i , decrecen la afinidad y algunas veces la capacidad de "binding" de la 2-[¹²⁵I]-melatonina en reptiles, aves y mamíferos. La primera evidencia en este sentido se obtuvo a través de la disminución en el contenido de AMPc estimulado por MSH en la piel de

anfibios. Se ha demostrado que la pinealectomía aumenta, la administración de melatonina *in vivo* y el tratamiento con melatonina *in vitro* disminuyen el contenido de AMPc, en el hipotálamo mediobasal de rata (Vacas et al., 1981). En células gliales, la hormona inhibe el incremento en la síntesis de AMPc inducido por estimulación del receptor β -adrenérgico (Vacas et al., 1984). En cerebro de lagartijas, piel de anfibios, cerebro de hámster y células de la pars tuberalis, la melatonina inhibe la producción de AMPc inducido por forskolina, efecto bloqueado por la preincubación con toxina pertussis (Morgan et al., 1989a, b). En 1984, Niles demostró que la melatonina modula los niveles de AMPc retinianos en la rata. La melatonina en una concentración 0.1 micromolar suprime significativamente la actividad de la adenilato ciclasa en presencia de 10 micromolar de GTP. Sin embargo, se ha descrito que la melatonina incrementa la actividad de la adenilato ciclasa y los niveles intracelulares de AMPc en las capas plexiforme externa e interna de retinas de conejo en experimentos *in vitro* (Blazynski et al., 1985). Por otra parte, se ha demostrado que la melatonina incrementa los niveles de AMPc en células fetales de epitelio pigmentario de pollo, provocando un efecto inhibitorio sobre la fagocitosis de segmentos externos de los bastones (Ogino et al., 1983). Asimismo, se ha descrito que receptores recombinantes de melatonina, aislados de oveja y *Xenopus*, y expresados en células COS-7, utilizan también esta vía de transducción de señales (Ebisawa, 1994; Reppert, 1994).

Los receptores de melatonina de alta afinidad, podrían estar acoplados a otros segundos mensajeros. En hipófisis anterior de ratas neonatales, la melatonina inhibe la acumulación de AMPc y GMPc inducida por GnRH, así como la síntesis de diacilglicerol y la liberación de ácido araquidónico (Vanecek y Klein, 1994). En este tejido, la melatonina inhibe el incremento en el influjo de Ca^{2+} inducido por GnRH a través de canales dependientes de voltaje (Vanecek y Klein, 1994).

Por su parte, el receptor ML-2 ha sido involucrado en el cambio de los niveles de Ca^{2+} intracelular, GMPc, AMPc y prostaglandinas (Cardinali et al., 1980; Vacas et al., 1984a). La inyección de melatonina en la cisterna magna de conejo, incrementa los niveles de GMPc cuantificados en el líquido cefalorraquídeo (Rudman, 1976). En concentraciones nanomolares, la melatonina incrementa la acumulación de GMPc en el hipotálamo mediobasal de rata (Vacas et al., 1981) y estimula la actividad de la guanilato ciclasa en el

testículo de esta especie (Kano y Miyachi, 1976). Se ha postulado que un receptor con características similares al ML-2, estaría ligado a un sistema de transducción de señales a través de la hidrólisis de fosfoinosítidos por la fosfolipasa C, mediado por el acoplamiento a una proteína G (Popova y Dubocovich, 1995). Las potencias relativas de los agonistas para estimular la hidrólisis de fosfoinosítidos correlacionan con la posible activación de un sitio de tipo ML-2 (Popova y Dubocovich, 1995). En células de melanoma de hámster y cerebro de ave, la estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos es antagonizada por luzindol y N-acetiltriptamina (Dubocovich, 1995). La prazosina, un antagonista α_1 -adrenérgico, que posee alta afinidad por el sitio ML-2, bloquea selectivamente el incremento en la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por melatonina (Dubocovich, 1995). El antagonista adrenérgico fentolamina, que no posee afinidad por el sitio ML-2, no afecta la respuesta a los agonistas de la melatonina. Este efecto tampoco fue reproducido por antagonistas serotoninérgicos (Popova y Dubocovich, 1995).

El rol fisiológico del sitio ML-2 es incierto. No se ha podido determinar aún la localización de estos sitios en áreas cerebrales específicas, dificultando la predicción de su función fisiológica. Existen evidencias que postulan que el sitio ML-2, además de reconocer a la melatonina, podría unirse a sus precursores o metabolitos endógenos (Popova y Dubocovich, 1995).

La melatonina, a través de su unión a calmodulina (Benítez-King y Anton-Tay, 1993), podría afectar directamente la señal de Ca^{2+} por su interacción con enzimas claves (por ejemplo: la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa) y con proteínas estructurales como la tubulina (Cardinali, 1980), o indirectamente a través de proteínas quinasas. En este sentido, se ha descrito que el tratamiento con melatonina o la inducción de la liberación de melatonina endógena afectan los niveles de tubulina en el hipotálamo. La melatonina inhibe algunos procesos dependientes de microtúbulos, como por ejemplo, la migración del pigmento en la piel de anfibios, o el transporte axoplasmático en nervios de anfibios y mamíferos (Cardinali, 1980).

Por otra parte, en el núcleo, la melatonina podría actuar como un aceptor de radicales libres, protegiendo al ADN de efectos citotóxicos (efectos que no parecen involucrar a un receptor) y regular la expresión génica a través de su unión con receptores nucleares (Menéndez-Pelaez y Reiter, 1993; Reiter et al., 1994). En este sentido, se ha descrito que la melatonina se une

específicamente a los receptores RZR/ROR β , pertenecientes a la familia de receptores nucleares denominados "orphan nuclear receptors" (Carlberg et al., 1996).

OBJETIVOS

El hámster es considerado un modelo relevante para el estudio de la melatonina pineal, ya que la hormona regula la reproducción estacional en esta especie, entre otros procesos fisiológicos rítmicos. Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos generales de los experimentos cuyos resultados se describen y discuten a continuación son:

I. Estudiar la biosíntesis de melatonina en la retina del hámster dorado

- I.1. Examinar si la retina del hámster dorado es un sitio de síntesis activa de melatonina.
- I.2. Examinar el efecto de la señal fótica ambiental sobre este mecanismo biosintético.
- I.3. Estudiar el ritmo de melatonina retiniana en condiciones de iluminación ambiental constante.
- I.4. Estudiar los efectos y el mecanismo de acción del sistema gabaérgico sobre la síntesis de melatonina retiniana.

II. Elucidar las implicancias fisiológicas de la melatonina en la retina del hámster dorado.

- II.1. Examinar los efectos de la melatonina sobre el sistema de GMPc retiniano.
- II.2. Examinar los efectos de la melatonina sobre la liberación y la captación de [³H]-glutamato.
- II.3. Estudiar el mecanismo de acción de la melatonina sobre estos parámetros.
- II.4. Examinar la existencia de sitios de unión específicos para melatonina en la retina del hámster dorado.
- II.5. Caracterizar farmacológica y funcionalmente el tipo de sitio de unión a 2-[¹²⁵I]melatonina.
- II.6. Examinar la existencia de variaciones diarias de los sitios de unión a 2-[¹²⁵I]melatonina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Tejidos

Se utilizaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*), con un peso promedio de 120 ± 20 g.

Los animales se mantuvieron en nuestra colonia bajo un fotoperíodo de 14 h de luz - 10 h de oscuridad, con encendido de la luz a las 06.00 h y apagado a las 20.00 h (salvo excepciones que se indican en cada caso), con libre acceso a alimento y agua.

Cuando se examinó el efecto de la oscuridad durante el día, los animales se mantuvieron en oscuridad desde el horario de transición (06.00 h) hasta las 20.00 h. Para estudiar el efecto de la exposición a luz durante la noche, los animales se mantuvieron con la luz encendida hasta 10 h después del horario de transición (20.00 h). Los experimentos llevados a cabo en condiciones de libre curso ("free-running") se realizaron luego de exponer a los animales a oscuridad constante durante tres días.

Se sacrificó a los animales por decapitación, se enuclearon los ojos y las retinas se extrajeron y mantuvieron a -20°C hasta su posterior tratamiento, o entre $0-4^{\circ}\text{C}$ en el caso de ser utilizadas inmediatamente luego de su extracción.

El sacrificio de los animales, la extracción de las retinas y, en los casos indicados, las incubaciones y/o ensayos enzimáticos en las retinas de animales mantenidos en condiciones de oscuridad, se realizaron bajo luz roja tenue.

Cirugía

La pinealectomía se llevó a cabo bajo anestesia etérea, tres semanas antes del sacrificio de los animales. Se utilizó el siguiente procedimiento: luego de la exposición del cráneo, con un torno de uso odontológico se realizó el corte de la calota, de manera de exponer la desembocadura del seno venoso longitudinal superior en los senos laterales. Luego de ligar el seno longitudinal superior, se disecaron las meninges de manera de exponer la glándula pineal. Esta se extirpó tomándola con una pinza de relojero (Bruselas N° 7). Los animales con operación simulada ("Sham") fueron intervenidos quirúrgicamente de la misma manera, disecándose el seno longitudinal

superior hasta exponer la glándula pineal, sin extirparla. Luego se procedió a la sutura y recuperación de los animales.

Determinación del contenido de melatonina

Las retinas se homogeneizaron en 2 ml de HCl 0.1 M con un homogeneizador de vidrio-teflón. Para la determinación de proteínas se utilizaron dos alícuotas de 50 μ l de este homogenato. Se extrajo la melatonina, a través de la adición de 5 ml de diclorometano. Los tubos se agitaron dos veces durante 20 seg y se centrifugaron a 900 x g durante 3 min. La fase acuosa se descartó y se agregaron 2 ml de NaHCO₃ 2 % sobre la fase orgánica, procediendo de igual manera que en la etapa anterior. Se aspiró la solución de bicarbonato y se lavó la fase orgánica con 2 ml de agua destilada; se repitió el procedimiento y, por último, se aspiró completamente la fase acuosa y la grasa emulsionada. Se tomaron 2 alícuotas de 1.5 ml de la fase orgánica de cada muestra (correspondiente a una retina), se llevaron a sequedad bajo vacío y se guardaron a -20°C hasta que se realizara el radioinmunoanálisis (RIA). Todo el procedimiento de extracción de la melatonina se llevó a cabo a una temperatura de 0 - 4°C. La recuperación del procedimiento de extracción fue de $76 \pm 5\%$, y se determinó por la extracción paralela de [³H]melatonina.

Se resuspendieron las muestras en 100 μ l de buffer (NaN₃ 3 mM, KH₂PO₄ 0.05 M y gelatina 1mg/ml, llevado a pH 7.0 con KOH). Se agregaron 50 μ l de [³H]-melatonina (20.000-24.000 dpm; actividad específica 38.8 Ci/mmol) y 50 μ l de un antisuero de conejo anti-melatonina (dilución final 1:1600). Los tubos se incubaron durante 2 h a 37° C. Finalizada la incubación se agregaron 250 μ l de sulfato de amonio saturado, se agitaron las muestras, se incubaron a 4°C durante 40 min y se centrifugaron a 13200 rpm durante 4 min a 4°C. El sobrenadante se aspiró y el "pellet" se resuspendió en 100 μ l de agua destilada a 37°C. La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido. Los valores del contenido de melatonina se determinaron a partir de una curva estándar de melatonina, con un rango de 20 pg a 5000 pg/tubo. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron, respectivamente, 4.5 y 8.5 %

El RIA para la medición de los niveles de melatonina en la retina del hámster dorado, se validó mediante estudios paralelos en los que, diluciones seriadas de extractos retinales mostraron curvas de desplazamiento paralelas a las curvas de melatonina estándar. El antisuero anti-melatonina se desarrolló en nuestro laboratorio. El inmunógeno (cedido por el Dr. Bernhard Manz. IBL. Hamburgo, F.R.G.) fue hemisuccinamida 5-metoxitriptamina unido a seroalbúmina bovina. Este antisuero tuvo reacción cruzada con serotonina (< 0.4 %), aunque se descartó la posible interferencia de serotonina en el RIA por el procedimiento de extracción, dado que esta es retenida en la fase acuosa alcalina. No se observó competencia significativa con 5-metoxitriptamina, 5-metoxitriptofol, N-acetilserotonina o 5-hidroxitriptofol.

Determinación de la síntesis *in vitro* de melatonina

Se sacrificaron los animales a las 10.00 h. Las retinas aisladas y separadas del epitelio pigmentario, se incubaron a 37°C durante 8 horas, en medio esencial mínimo (MEM), ajustado a pH 7.4 con HNaCO₃ y burbujeado con carbógeno (5 % CO₂ y 95 % O₂) durante todo el período de incubación. Las incubaciones se realizaron en condiciones de luz o de oscuridad continua durante 8 horas en presencia o ausencia de los diferentes compuestos examinados (dibutiril-GMPc, 8-Bromo-GMPc, GABA, baclofen y bicuculina) según lo indicado en cada caso. Al final de este período, se separaron las retinas de los medios de incubación y se congelaron a -20°C para ser procesadas como se describió previamente.

Determinación del contenido de AMPc y GMPc

Para determinar el efecto de la melatonina, el GABA y agonistas y antagonistas gabaérgicos sobre el contenido de los nucleótidos cíclicos, se incubaron las retinas a 37°C durante 30 min en 500 µl de buffer que contenía NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, glucosa 10 mM e IBMX 0.5 mM (inhibidor de la fosfodiesterasa), ajustado a pH 7.4 con Tris base. Las incubaciones se terminaron por remoción del medio y homogeneización rápida en 1 ml de ácido perclórico 1 M, en

homogeneizadores de vidrio-teflón. Las muestras se mantuvieron a 4°C, hasta ser purificadas, para determinar el contenido de AMPc o GMPc acumulado durante 30 min. Para determinar los niveles de GMPc, se realizaron incubaciones en presencia o en ausencia de IBMX 0.5 mM según se indica. Para determinar los niveles de los nucleótidos cíclicos en los distintos horarios, las retinas extraídas se homogeneizaron directamente y se purificaron como se indica a continuación. Se tomaron 2 alícuotas de 25 µl del homogenato para la determinación del contenido de proteínas. Los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C. Se purificaron los sobrenadantes por cromatografía secuencial en columnas de alúmina (AG 7, 100-200 mesh) y Dowex 50W-X8 (forma H⁺). Las columnas se lavaron previamente utilizando el siguiente protocolo: 1) columnas de alúmina (2.5 cm de altura): se agregaron secuencialmente 5 ml de imidazol 0.1 M (2 veces), 5 ml de H₂O, 2 ml de 0.2 M de NH₄COOH y 4 ml de agua destilada (4 veces). 2) Las columnas de Dowex (4 cm de altura) se lavaron 3 veces con 5 ml de agua destilada, 2 veces con 5 ml de NaOH 0.5 M, 2 veces con 5 ml de agua, 5 ml de HCl 2 M, 2 veces con 5 ml de agua, 5 ml de HCl 0.1 M y por último 4 veces con 4 ml de agua destilada. Las muestras se sembraron sobre las columnas de alúmina previamente hidratadas. Se agregaron secuencialmente dejando escurrir el eluato, 4 ml de agua (2 veces), 2 ml de agua, 5 ml de HCl 0.6 M en etanol 95 %, 5 ml de etanol 50 % y 2 ml de agua. Se montaron las columnas de alúmina sobre las de Dowex y se agregaron 4 ml de formiato de amonio 0.2 M sobre la alúmina, a fin de colectar la fracción de las muestras en las columnas de Dowex. Una vez escurrido el volumen de las Dowex, se agregaron 3 veces 1 ml de agua, recogiendo este eluato (fracción de GMPc) y luego se agregaron 4 veces 1 ml de agua, recogiendo estos últimos 4 ml (fracción de AMPc). El porcentaje de recuperación de este procedimiento se determinó por la purificación en paralelo de [³H]-AMPc y [³H]-GMPc. La recuperación de las columnas para AMPc y GMPc fue usualmente 80-85 %. Los contenidos de AMPc y GMPc se determinaron por RIA.

RIA de AMPc

Alicuotas de 100 μ l de las muestras y los estándares (rango de la curva 10-5000 fmoles) se acetilaron mediante el agregado de 5 μ l de anhídrido acético : trietilamina (en proporción 1:2) con agitación inmediata. Luego de 5 min del agregado de la mezcla de acetilación, se mezclaron las muestras y la curva estándar con 50 μ l de [125 I]-AMPc (15.000 a 20.000 dpm; actividad específica 140 mCi/mmol). Se agregaron 50 μ l de un antisuero de conejo anti AMPc proporcionado por el "National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. Bethesda. Md. USA" (diluido 1:5000). La incubación se realizó durante toda la noche (8-16 horas) a 4°C. El complejo ligando-anticuerpo se precipitó con 2 ml de etanol a 4°C, y se utilizaron 50 μ l de seroalbúmina bovina 2 % como "carrier". Se incubaron las muestras durante 5 min a 4°C y se centrifugaron a 2000 x g durante 30 min. Se separó el complejo ligando-anticuerpo por aspiración del sobrenadante. La radiactividad se determinó en un contador gamma.

La reacción cruzada del anticuerpo con otros nucleótidos (ATP, ADP, 5'AMP, adenosina y GMPc) es menor que 50 partes por millón.

RIA de GMPc

El protocolo utilizado para la determinación de los niveles de GMPc en la retina de hámster es esencialmente similar al descrito para el AMPc. Alicuotas de 100 μ l de la fracción eluída de las columnas y los estándares, previa acetilación como ya se describió, se mezclaron con 50 μ l de [125 I]-GMPc (15.000-20.000 dpm; actividad específica 150 mCi/mmol). Se agregaron 50 μ l de un antisuero de conejo anti-GMPc (Chemicon International Inc., diluido 1:150) y se incubaron toda la noche (8-16 horas) a 4°C. La curva estándar de GMPc fue lineal en un rango de 10 a 5000 fmol/tubo. La reacción cruzada de este anticuerpo con otros nucleótidos es menor que 5 partes por millón.

Determinación de las actividades guanilato ciclasa y fosfodiesterasa

Las retinas se incubaron durante 15 min a 37°C en 500 µl del buffer Tris-HEPES previamente descrito, en presencia o ausencia de melatonina. Al final del período de incubación, se removió el medio y se homogeneizaron las retinas.

Para determinar la variación diaria de la actividad de las enzimas, las retinas se extrajeron y homogeneizaron sin incubación previa.

Ensayo de la actividad de guanilato ciclasa

Las retinas se homogeneizaron en un buffer que contenía Tris-HCl 40 mM pH 7.6, con fluoruro fenilmetilsulfonilo (PMSF 1 mM). Los homogenatos se centrifugaron (luego de tomar alícuotas para la determinación de proteínas) y los sobrenadantes se utilizaron como fuente de enzima. La actividad de la enzima se determinó por el método descrito por Domino et al. (1991). La mezcla de reacción contenía 50 µl de una solución buffer consistente de Tris-HCl 40 mM a pH 7.6, MnCl₂ 6 mM, IBMX 2 mM, GMPc 2mM, seroalbúmina bovina 1 mg/ml, creatina kinasa 0.6 mg/ml y creatina fosfato 13.24 mg/ml, [³²P]GTP (700.000 cpm por tubo, actividad específica de 1500- 3000 Ci/mmol); más 25 µl de 0.5 mM de GTP y 25 µl de la fuente de enzima.

Para determinar los parámetros cinéticos (K_m y V_{máx}) se utilizaron seis concentraciones de GTP frío (0.025 - 1 mM). Los tubos se incubaron a 37°C durante 15 min. La reacción se terminó por el agregado de 100 µl de EDTA 30 mM a 4°C. El [³²P]GMPc se separó del sustrato no reactado y otros compuestos que contuvieran [³²P], por cromatografía en columnas (alúmina, 2.5 cm de altura, AG 7, 100-200 mesh, Bio-Rad laboratories) y se eluyó con 2 lavados de 2.5 ml de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5. La formación no enzimática de GMPc, se cuantificó mediante el agregado de buffer o de tejido hervido durante 1 min, en lugar de la fuente de enzima activa. La radiactividad de las muestras se determinó por cromatografía de centelleo líquido. La recuperación de cada columna se determinó por el agregado de una cantidad conocida de [³H]-GMPc que se eluyó con cada muestra. Los valores de actividad se corrigieron con el porcentaje de recuperación que fue usualmente de 70-80 %. La melatonina no afectó la recuperación de GMPc de las columnas.

Ensayo de la actividad de fosfodiesterasa.

La actividad de PDE se determinó por el método de Thompson et al. (1974) con modificaciones. Las retinas se homogeneizaron individualmente en 300 μ l de agua destilada fría y se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó como fuente de enzima. Se tomaron alícuotas del sobrenadante para la determinación de proteínas. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 40 mM (pH 8.0 a 37°C), β -mercaptoetanol 8 mM, $MgCl_2$ 5 mM, GMPc 100 mM, GTP 1 mM, [3H]GMPc (80.000 cpm/tubo, actividad específica 15 Ci/mmol) y alícuotas de 50 μ l del tejido en un volumen final de 100 μ l. Los tubos se incubaron a 37°C durante 10 min. La reacción se terminó hirviendo los tubos por 1 min. Luego de enfriarlos en hielo, se agregaron 50 μ l de 5'-nucleotidasa (1 mg/ml en agua destilada) y se incubaron a 30°C durante 10 min. Este paso permite la conversión de 5'-GMP en guanosina. Los nucleótidos cíclicos residuales se removieron mediante el agregado de 1 ml de una mezcla que contenía: 1 parte de resina (Dowex 1X8, 200 a 400 mesh, Sigma Chemical Co.), más tres partes de metanol. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 15 min, con agitación esporádica, y luego se centrifugaron a 900 x g durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se recolectaron en viales y la radiactividad se determinó en un contador β , luego del agregado de líquido de centelleo. La conversión inespecífica de [3H]-GMP a 5'-GMP, se determinó por el agregado de buffer o de fuente de enzima inactivada por calor en lugar de tejido.

Determinación de la actividad de óxido nítrico sintetasa (NOS).

Para determinar el efecto de la melatonina sobre la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa, se incubaron las retinas en buffer Tris-HEPES previamente descrito, durante 20 min a 37°C, en presencia o ausencia de melatonina. Al final de la incubación, las retinas se homogeneizaron en buffer HEPES 10 mM (pH 7.4), que contenía sacarosa 0.32 M y EDTA 0.1 mM. La actividad de la NOS se determinó, por la conversión de [3H]arginina en [3H]citrulina, por el método de Bredt y Snyder (1990), con pequeñas modificaciones. Alícuotas de 100 μ l de los homogenatos (3 mg de proteínas/ml) se incubaron por 30 min a 37°C en presencia de 40 μ l de buffer

que contenía Hepes 10 mM, CaCl₂ 3 mM, H₂O₂ 0.2 %, NADPH 1mM, FAD 5 mM y [³H]-arginina (11 Ci/ml, actividad específica 37.4 Ci/mmol) (volumen final 140 µl). Las muestras se enfriaron a 4°C y se agregaron 250 µl de resina Dowex AG 50 WX-8 resuspendida en el buffer de incubación (11 g de resina en 14 ml de buffer). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 5 minutos, con agitación esporádica, y se centrifugaron a 12.000 rpm por 5 min. La radiactividad del sobrenadante se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido. La formación inespecífica de producto se determinó utilizando alícuotas de homogenato del tejido hervido, durante 1 min, en lugar de la fuente de enzima activa.

Determinación del "turnover" de GABA

La determinación del turnover de GABA se realizó mediante la cuantificación de la acumulación del aminoácido luego de la inhibición de la enzima de degradación, GABA transaminasa por la administración intraperitoneal de gamma-acetilénGABA (200 mg/kg), 62.5 min antes del sacrificio. Para prevenir el aumento post-mortem en el contenido de GABA se administró un inhibidor de la enzima de síntesis (GAD), el ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA), 2.5 min antes del sacrificio, en una dosis de 50 mg/kg (i. p.) (Fonnum, 1985). Para determinar el contenido de GABA acumulado, se utilizó el ensayo de radioreceptor (Bernasconi et al., 1980). Alícuotas de 100 µl de una preparación cruda de membranas sinápticas de cerebelo de rata (aproximadamente 300 µg de proteína) en buffer Tris-citrato, pH 7.2, se incubaron con 100 µl de muestras de tejido o con varias concentraciones de GABA disueltas en agua destilada. Se agregaron 100 µl de [³H]muscimol (actividad específica 27.8 Ci/mmol, New England Nuclear) en una concentración final de 5 nM. La unión inespecífica se determinó en presencia de 200 µM de GABA; cada determinación se realizó por triplicado. Se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12.000 x g por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó superficialmente 2 veces con buffer Tris-citrato frío. El precipitado se digirió con hidróxido de hiamina durante toda la noche. La radiactividad se cuantificó de la manera habitual. El rango de detección para GABA fue de 1-20 ng. Los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron

de 5 y 20 % respectivamente. A fin de verificar que el desplazamiento del ^3H -muscimol de su sitio de unión se debe a GABA presente en el tejido, una serie paralela de muestras de tejido se incubaron en presencia de un sistema enzimático de degradación de GABA altamente específico, (GABAse, Sigma) antes del ensayo. Tanto el GABA auténtico como el contenido en la preparación del tejido fue completamente degradado por la GABAse (más del 85 %) (Graham y Aprison, 1966).

Determinación de la captación de [^3H]glutamato

La captación de glutamato se examinó mediante la incubación del tejido a 37°C con [^3H]glutamato ($5-6 \times 10^5$ dpm/tubo, actividad específica 17.25 Ci/mmol) en 500 μl de buffer que contenía NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgCl_2 1mM, HEPES 10 mM, glucosa 10 mM (ajustado a pH 7.4 con Tris base). Para los experimentos en medio libre de Ca^{2+} , el catión no se incluyó en el medio y se agregó EGTA 5 mM. La melatonina, 8-Br GMPc o dibutilil GMPc se agregaron 20 min antes que el agregado de [^3H]glutamato. Luego de 10 min, las retinas se separaron rápidamente del medio por filtración, se lavaron con buffer frío 5 veces y se pesaron. Se digirió el tejido, durante toda la noche, con hidróxido de hiamina y la radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido. La captación inespecífica de ^3H -glutamato se determinó en un medio en el que se reemplazó, isosmóticamente, el Na^+ por colina. La captación inespecífica fue usualmente el 20 % de la total.

Determinación de la liberación de [^3H]glutamato

Las retinas se incubaron durante 30 min a 37°C con [^3H]-glutamato ($1-1,5 \times 10^6$ dpm/retina) en 500 μl de un buffer Tris-HEPES, similar al usado en los experimentos de captación. Para los experimentos en medio libre de Ca^{2+} , el catión no se incluyó en el buffer y se agregó EGTA 5 mM. Las retinas se lavaron 6 veces en buffer frío de manera de remover el exceso de radiactividad y se incubaron durante 20 min, con agitación suave, en 500 μl del mismo buffer, en presencia o ausencia de melatonina, 8-Bromo GMPc o dibutilil GMPc. Al final del período de incubación, las retinas se separaron del medio y

se digirieron toda la noche con hidróxido de hiamina. La radiactividad en el medio de incubación y la contenida en el tejido se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido. Los resultados se expresan como liberación fraccional calculada como la relación entre radiactividad liberada/radiactividad total captada por el tejido. Esta última se calculó como el contenido remanente en el tejido más lo liberado al medio de incubación. La radiactividad liberada por el tejido se identificó como glutamato (70 %) por cromatografía en placa delgada.

Determinación de la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$

La captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ se examinó en una fracción sinaptosomal cruda. Las retinas se homogeneizaron en una solución de sacarosa 0.32 M que contenía MgCl_2 1 mM, y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 4°C. El "pellet" se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 20000 rpm durante 20 min. El "pellet" resultante se resuspendió por homogeneización en el buffer de incubación (buffer Tris-HEPES descrito previamente). Se realizó una nueva centrifugación a 20000 rpm por 20 min, el "pellet" se resuspendió en el medio de incubación y se tomaron alícuotas de 100 μl (300 a 600 μg de proteína). La fracción sinaptosomal cruda se incubó, por 20 min (salvo en los casos indicados en la sección de resultados) a 37°C, en presencia o ausencia de melatonina, 8-Br GMPc o dibutilil GMPc. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron a cada tubo 100 μl de buffer que contenía $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ ($8\text{-}10 \times 10^5$ dpm/tubo, actividad específica de 7.57 mCi/mg). Luego de 10 seg, la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ se interrumpió por el agregado de 500 μl de una solución fría de EGTA 5 mM y, luego de 5 seg, se agregaron 4 ml de buffer Tris-HEPES. El contenido de los tubos se filtró rápidamente bajo presión reducida, a través de filtros de fibra de vidrio, Whatman GF/B, embebidos en una solución que contenía polietilenimina 0.5%. Los filtros se lavaron 2 veces con 4 ml de buffer frío. Los filtros se transfirieron a viales de conteo y se secaron. La radiactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido. La captación inespecífica se determinó por la adición de 500 μl de EGTA, antes del agregado del $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$.

Ensayo de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina

Para los estudios de unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina, se utilizó una fracción cruda de membranas preparadas de la siguiente manera: las retinas se homogeneizaron en una solución de sacarosa 0.32 M; el homogenato se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, el "pellet" se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 20000 rpm por 20 min. El "pellet" resultante se lavó dos veces por resuspensión y homogeneización en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) y CaCl₂ 4 mM, y se centrifugó nuevamente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en buffer Tris-HCl (100-200 µg de proteínas por tubo) y se incubó con 2-[¹²⁵I]melatonina en una concentración no saturante (100 pM, actividad específica 2200 Ci/mmol, New England Nuclear Corp.). Para determinar los parámetros cinéticos del "binding" de 2-[¹²⁵I]melatonina por saturación, se examinaron seis concentraciones diferentes de 2-[¹²⁵I]melatonina (20-400 pM).

Se realizó la caracterización farmacológica de la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina a través de estudios de "binding" por competencia. La inhibición de la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina (70-100 pM) a las fracciones sinaptosomales crudas se determinó utilizando 6-8 concentraciones de cada compuesto. Los valores de K_i se calcularon por el método de Cheng y Prusoff (1973) a partir de los IC₅₀ obtenidos en curvas de competencia.

Para determinar el efecto de nucleótidos de adenina y de guanina sobre la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina, se realizaron incubaciones de las alícuotas de sinaptosomas crudos con el radioligando, en concentración 100 pM, en presencia de concentraciones variables de GTP, GDP, GMP y ATP (10 nM a 10 mM).

Las incubaciones se realizaron durante 2 h a 25°C. La reacción se terminó por el agregado de 4 ml de Tris-HCl frío y filtrado rápido bajo presión reducida, a través de filtros de fibra de vidrio, Whatman GF/B, embebidos en una solución de polietilenimina 0.5 %. Los filtros se lavaron tres veces con 4 ml de buffer frío y se transfirieron a tubos de Khan. Se cuantificó la radiactividad en un contador gamma. La unión inespecífica se determinó como el "binding" en presencia de 10 µM de melatonina. La unión específica del radioligando se determinó por la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica. Los datos de unión en el equilibrio obtenidos por el método de saturación se

analizaron por el método de Scatchard (1949) y los parámetros cinéticos se calcularon por regresión lineal.

El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry y colaboradores (1951), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los test de Student para la comparación entre dos grupos experimentales o ANOVA (dos colas o factorial) seguido de test de Tukey o de Dunnett, para comparaciones múltiples. En los gráficos de regresión por el método de Scatchard y de Lineweaver Burk las pendientes y las ordenadas al origen se calcularon por el método de cuadrados mínimos.

RESULTADOS

I. BIOSÍNTESIS DE MELATONINA EN LA RETINA DEL HÁMSTER DORADO.

En la Introducción se han mencionado distintas evidencias que avalan la capacidad de la retina de diversas especies de vertebrados de sintetizar melatonina. En la mayoría de las especies examinadas, la melatonina retiniana presenta variaciones significativas a lo largo del ciclo de 24 horas. Sin embargo, existen indicios controvertidos acerca de la existencia de un ritmo diario en el contenido de melatonina en la retina de mamíferos. Si bien el hámster dorado es considerado el modelo más conspicuo (como se mencionara en los Objetivos) para el estudio de la melatonina de origen pineal, la melatonina retiniana ha recibido relativamente escasa atención. Por consiguiente, se realizó la primera serie de experimentos con el objeto de investigar distintos aspectos vinculados a la biosíntesis de melatonina en la retina del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).

I.1 a. Variaciones diarias en el contenido de melatonina retiniana.

La figura 1 representa los cambios diarios en el contenido de melatonina retiniana, en hámsteres sacrificados en nueve intervalos durante el ciclo de 24 horas. Los niveles de melatonina exhiben variaciones diarias significativas, con valores máximos durante la noche tardía (04.00 y 06.00 h).

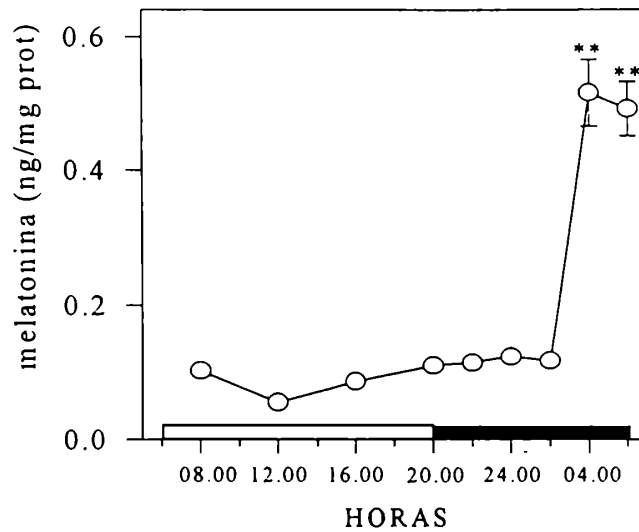


Fig.1 Variaciones diarias en el contenido de melatonina en la retina del hámster dorado. Los niveles de melatonina presentaron variaciones diarias significativas ($p < 0.01$, ANOVA). El contenido del metoxiindol a las 04.00 y 06.00 h difirió significativamente de todos los otros intervalos (** $p < 0.01$ por test de Tukey). Se representan medias \pm ES, $n = 15-20$ animales por grupo. La barra oscura en la base de la figura indica las horas de oscuridad.

I.1 b. Variaciones diarias en el contenido de AMPc retiniano.

Como se mencionó en la Introducción una señal regulatoria clave en la biosíntesis de melatonina es el AMPc, a través de su efecto estimulador sobre la expresión de la NAT (enzima considerada limitante en el proceso biosintético). Por lo tanto, se examinaron las variaciones diarias en el contenido del nucleótido cíclico en retinas de animales sacrificados a lo largo del ciclo de 24 horas (Figura 2). Los niveles de AMPc variaron en forma significativa en función de la hora del sacrificio. El contenido de AMPc aumentó 4 horas después del apagado de la luz, con valores máximos a las 02.00 h, dos horas antes del incremento en el contenido de melatonina.

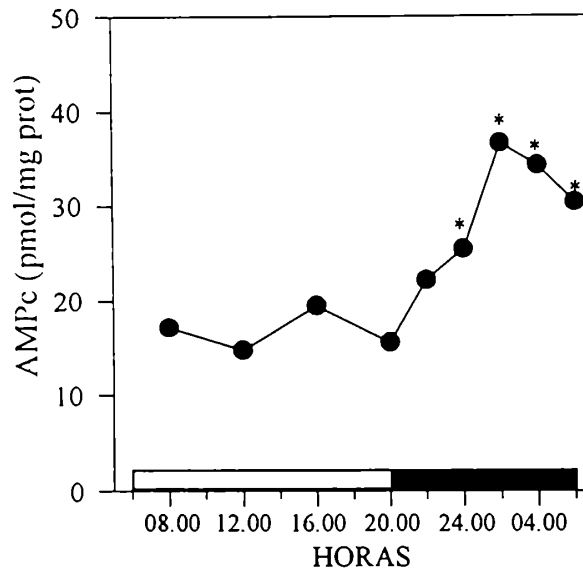


Fig.2 Variaciones diarias en los niveles de AMPc en la retina del hámster dorado. El contenido de AMPc presentó variaciones diarias significativas ($p < 0.01$, ANOVA). Los niveles de AMPc durante la noche (excepto para las 22.00 h) fueron significativamente mayores que los valores correspondientes a la fase de luz ($*p < 0.05$ por test de Tukey). Se representan las medias \pm ES, $n= 15$ a 20 animales por grupo. La barra oscura en el pie de la figura indica los horarios de oscuridad.

1.2. Determinación del origen del contenido de melatonina en la retina.

Con el objeto de determinar el origen del metoxiindol, se realizaron dos series de experimentos tendientes a examinar: 1) el efecto de la pinealectomía sobre el contenido de melatonina retiniana y, 2) la producción del metoxiindol en retinas mantenidas *in vitro*.

1.2.a. Efecto de la pinealectomía sobre el contenido de melatonina retiniana. Estudio ex vivo.

La variación diaria en el contenido de melatonina retiniana de hámsteres pinealectomizados o con operación simulada se representa en la figura 3. El análisis estadístico de los resultados indicó un ritmo diario significativo en el contenido de melatonina tanto en el grupo con operación simulada (SHAM), como en el grupo de animales pinealectomizados.

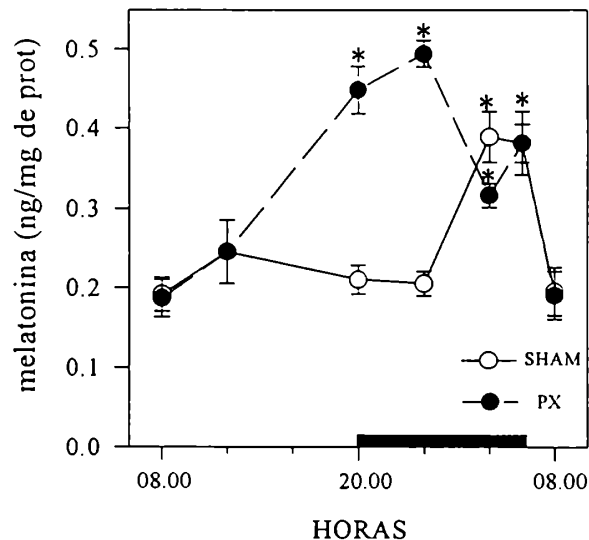


Fig 3. Efecto de la pinealectomía u operación simulada sobre el contenido de melatonina en la retina del hámster dorado. Los niveles de melatonina presentaron variaciones diarias significativas en ambos grupos. En los animales pinealectomizados, los valores de melatonina a las 20.00, 24.00, 04.00 o 06.00 h fueron significativamente mayores que a las 08.00 o a las 12.00 h (** $p < 0.01$, test de Tukey). El contenido de melatonina en la retina de los animales con operación simulada a las 04.00 y 06.00 difirió significativamente de los otros intervalos examinados (** $p < 0.01$, test de Tukey). Los niveles de melatonina retiniana en los hámsteres pinealectomizados fueron significativamente más elevados que los del grupo con operación simulada ($p < 0.001$, ANOVA factorial). Se indican medias \pm ES, $n = 15$ a 20 animales por grupo.

En el grupo SHAM, los niveles de melatonina fueron máximos entre las 04.00 y las 06.00 h (al igual que en los animales intactos), mientras que en los pinealectomizados el máximo se observó en el intervalo comprendido entre las 20.00 y las 24.00 h. El contenido de melatonina retiniana, fue significativamente más alto en los hámsteres pinealectomizados que en el grupo con operación simulada ($p < 0.001$, ANOVA factorial).

I. 2. b. Producción de melatonina retiniana. Estudio *in vitro*.

En la segunda serie de experimentos se examinó la producción de melatonina en retinas de hámster mantenidas *in vitro*. Los resultados obtenidos se esquematizan en la figura 4. La presencia de luz, durante 8 horas de incubación, suprimió significativamente el efecto estimulador de la oscuridad sobre la producción de melatonina retiniana.

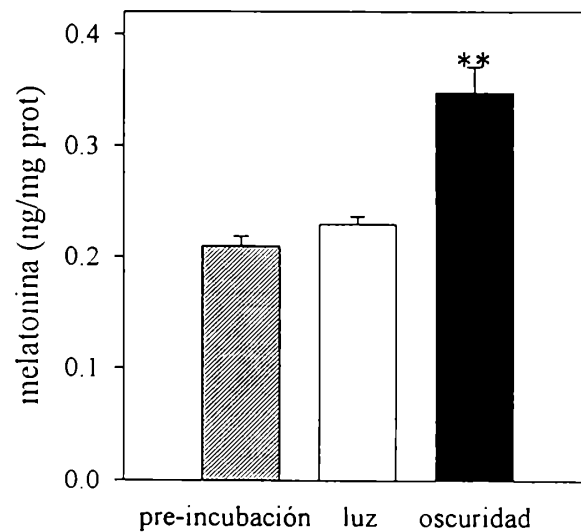


Fig 4. Efecto de la luz y la oscuridad sobre la síntesis de melatonina en retinas de hámster dorado mantenidas *in vitro*. Las retinas fueron extraídas a las 10.00 h en condiciones de luz y se incubaron como se describe en Materiales y Métodos. Los valores previos a la incubación fueron determinados en retinas de animales expuestos a luz. La oscuridad luego de 8 horas de incubación, provocó un incremento significativo en los niveles de melatonina (** $p < 0.01$, test de Dunnett). Las barras indican medias \pm ES, $n=15$ animales por grupo experimental.

I. 3. Efectos del estímulo fótico sobre el contenido de melatonina y AMPc.

Con el objeto de examinar el efecto del estímulo fótico sobre los niveles de melatonina y AMPc retinianos, se llevaron a cabo los experimentos representados en las figuras 5, 6, 7 y 8.

I.3.a. Efecto de la luz durante la noche.

La exposición de los animales a luz (de manera aguda) en horarios de la noche, resultó en la supresión del aumento nocturno del contenido de melatonina (figura 5) y de AMPc (figura 6), alcanzando valores similares a los diurnos.

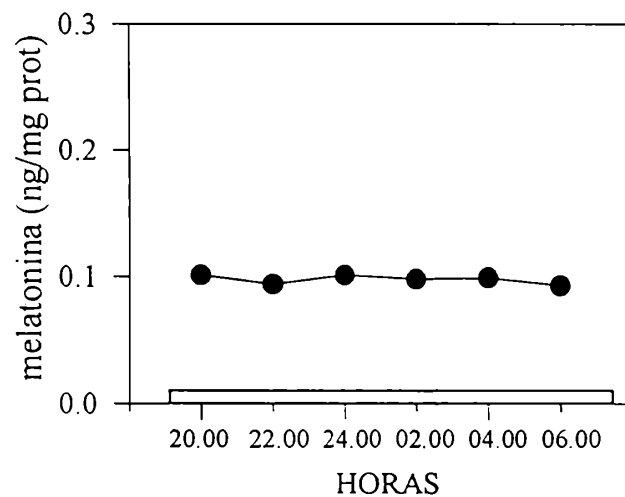


Fig 5. Efecto de la luz durante la noche sobre el contenido de melatonina en la retina de hámster. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de melatonina entre los intervalos examinados (ANOVA). La barra clara indica los horarios de luz. Se representan medias \pm ES, n= 10 a 15 animales por grupo.

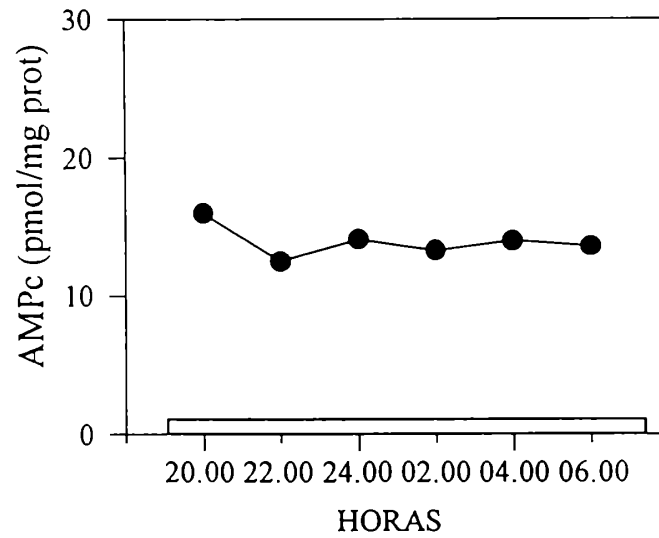


Fig 6. Efecto de la luz durante la noche sobre los niveles de AMPc en la retina del hámster dorado. Los niveles de AMPc no presentaron diferencias significativas entre los intervalos examinados, con valores similares a los diurnos. Se representan medias \pm ES, $n= 10$ a 15 animales por grupo.

1.3.b. Efecto de la oscuridad durante el día.

La exposición de los hámsteres a oscuridad (en forma aguda) durante el día, provocó un incremento significativo sobre el contenido de melatonina y AMPc, como se representa en las figuras 7 y 8 respectivamente. El aumento en los niveles del nucleótido cíclico precedió al de melatonina, análogamente a lo observado en condiciones de fotoperíodo normal. El AMPc alcanzó valores comparables a los de la etapa nocturna en el fotoperíodo normal. En contraste, los niveles nocturnos de melatonina no alcanzaron los valores de la figura 1, aunque fueron significativamente mayores que los diurnos.

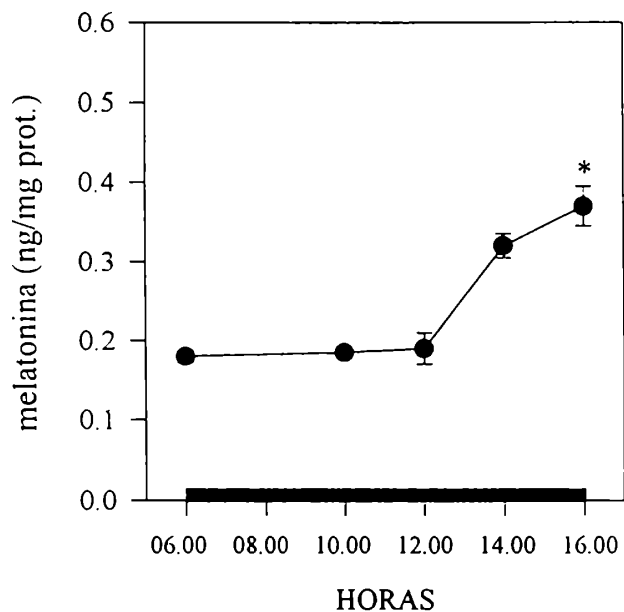


Fig 7. Efecto de la oscuridad durante el día sobre el contenido de melatonina en la retina del hámster. Los niveles de melatonina correspondientes a las 16.00 h difirieron significativamente de todos los otros intervalos, excepto de las 14.00 h. (* $p < 0.05$ por test de Tukey). Se indican medias \pm ES, $n = 6-8$ animales por grupo. La barra oscura en la base de la figura indica el período de exposición de los animales a oscuridad.

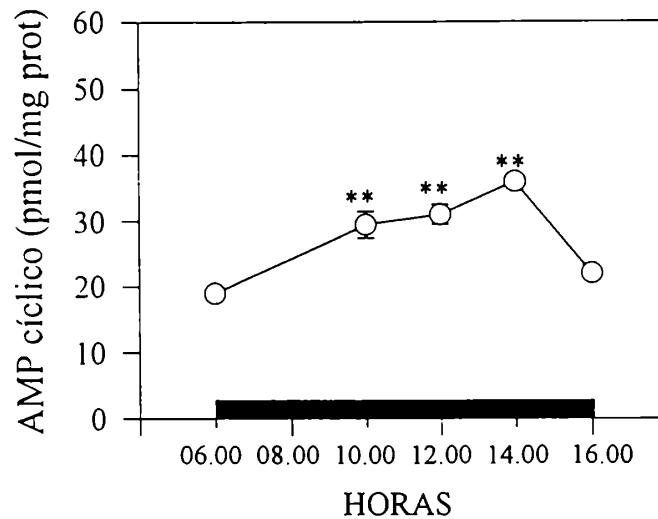


Fig 8. Efecto de la oscuridad durante el día sobre el contenido de AMPc en la retina. Los valores del contenido del nucleótido a las 10.00, 12.00 y 14.00 h presentaron un aumento significativo respecto de los observados a las 06.00 y 16.00 h (**p < 0.01 por test de Tukey). Se representan medias \pm ES, n= 6-8 animales por grupo. La barra oscura en la base de la figura indica el período de exposición de los animales a oscuridad durante los horarios diurnos.

1.4. Efecto de la oscuridad constante sobre los niveles de melatonina retiniana.

A fin de elucidar si paralelamente a la regulación fótica existe un ritmo endógeno que controla los niveles de melatonina en la retina, se cuantificaron los niveles del metoxiindol en seis intervalos durante el ciclo de 24 horas, en la retina de hámsteres expuestos a oscuridad constante durante 3 días (libre curso). En la figura 9 se representan las variaciones diarias en el contenido del metoxiindol en 4 experimentos realizados separadamente.

Los valores máximos en el contenido del metoxiindol se obtuvieron en intervalos distintos del ciclo de 24 horas y los experimentos individuales difirieron entre sí.

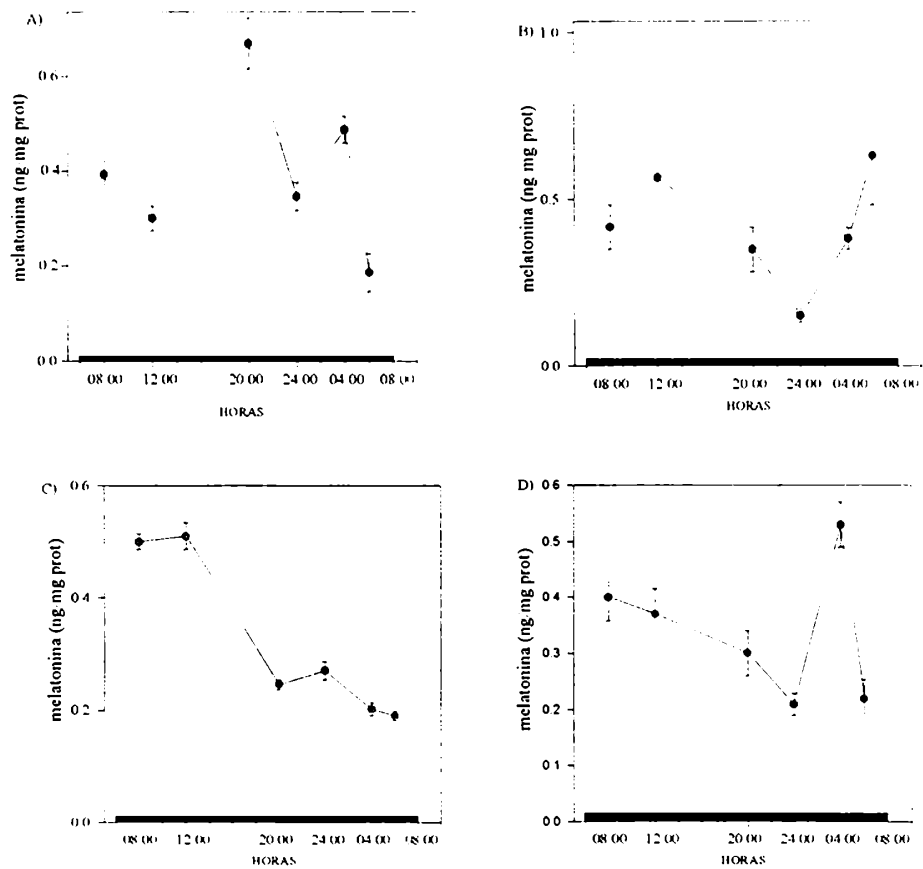


Fig 9. Variaciones diarias en el contenido de melatonina en la retina de hámsteres mantenidos en oscuridad constante durante 3 días. Los animales fueron sacrificados y las retinas extraídas como se indica en Materiales y Métodos. Cada uno de los gráficos representa un experimento. Los datos indican medias \pm ES con un $n= 4-5$ animales por grupo para cada determinación. Los valores máximos en el contenido de melatonina variaron entre experimentos. En la figura 9 A) el contenido de melatonina presenta un máximo a las 20.00 h. En el experimento graficado en la figura 9 B) se observa un mínimo a las 24.00 h. En la figura 9 C) los valores máximos de melatonina se observaron entre las 08.00 y 12.00 h, mientras que en la figura 9 D) el contenido máximo se observa a las 04.00 h ($p < 0.01$, test de Tukey).

I. 5. Efecto del GABA sobre la producción *in vitro* de melatonina retiniana.

I.5.a. Efecto del GABA en condiciones de luz.

Como se mencionara en la Introducción, existen evidencias que llevan a postular al GABA como una señal retiniana asociada a la oscuridad, en algunas especies. Con el objeto de evaluar la posible vinculación del sistema gabaérgico y la melatonina en la retina de hámster, se analizó el efecto del GABA sobre la producción .. del metoxiindol (Figura 10). Las retinas, luego de un período de 8 horas de incubación en condiciones de luz, presentaron valores de contenido de melatonina significativamente más elevados en presencia de GABA, que los observados en el grupo control. El efecto del GABA fue revertido por bicuculina (antagonista del receptor de tipo GABA A). El baclofen (agonista del receptor de tipo GABA B) no tuvo efectos significativos sobre el contenido de melatonina, en tanto que el 2-hidroxisaclofen (antagonista de tipo GABA B) no bloqueó el efecto gabaérgico.

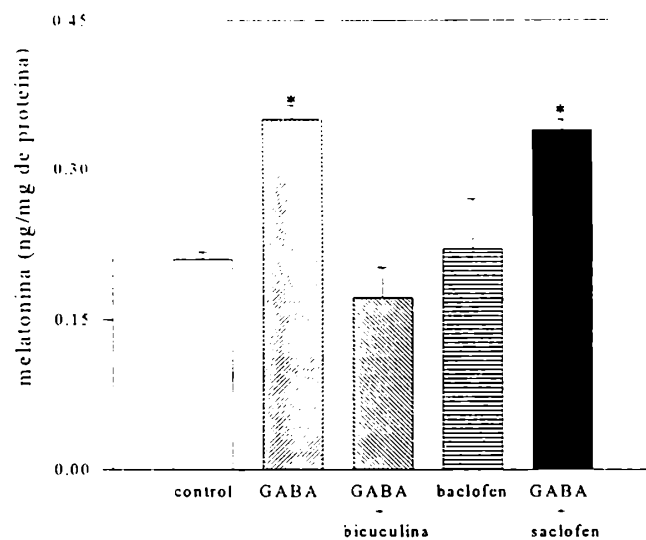


Fig 10. Efecto del GABA, agonistas y antagonistas gabaérgicos, sobre la producción de melatonina en retinas de hámster mantenidas *in vitro*, en condiciones de luz. Los animales fueron sacrificados a las 10.00 h y las retinas extraídas e incubadas como se describe en Materiales y Métodos, en presencia o ausencia de GABA 10 μ M, bicuculina 10 μ M, baclofen 10 μ M y/o 2-hidroxisaclofen 200 μ M. Las barras indican media \pm ES, n = 15 animales por grupo. Las retinas incubadas en presencia de GABA presentaron niveles de melatonina significativamente más elevados que los del grupo control. La bicuculina revirtió el efecto del GABA. El baclofen no tuvo efectos significativos en la concentración examinada, en tanto que el 2-hidroxisaclofen no bloqueó el incremento inducido por GABA en el contenido de melatonina. (*p < 0.05, test de Dunnett).

I.5.b. Efectos de antagonistas gabaérgicos en oscuridad.

Con el objeto de evaluar la participación del sistema gabaérgico en el estímulo inducido por la oscuridad sobre la síntesis de melatonina, se estudió el efecto de antagonistas gabaérgicos sobre la producción de melatonina en oscuridad (Figura 11). El incremento en el contenido de melatonina retiniana inducido por la oscuridad, fue parcialmente bloqueado por bicuculina, en tanto que el 2-hidroxisaclofen resultó inefectivo.

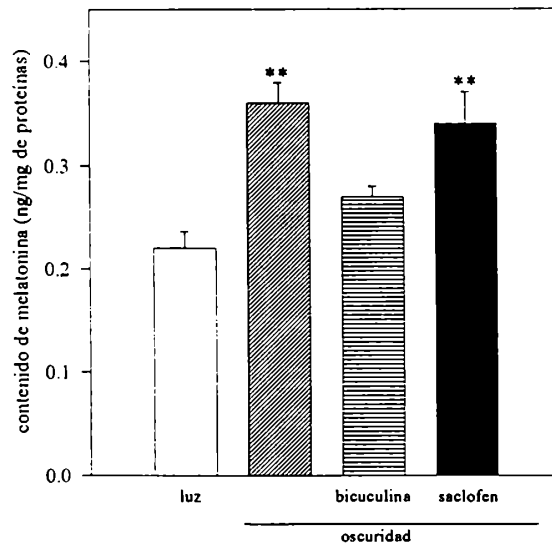


Fig 11. Efecto de antagonistas gabaérgicos sobre la producción de melatonina en condiciones de oscuridad. Los animales se sacrificaron a las 10.00 h, las retinas se extrajeron y se incubaron durante ocho horas, como se indica en Materiales y Métodos. Las incubaciones se realizaron en presencia o ausencia de bicuculina 10 μ M o 2-hidroxisaclofen 200 μ M. Los datos representan medias \pm ES, con un $n= 15$ animales por grupo. La oscuridad incrementó significativamente el contenido de melatonina respecto del valor observado en luz. La bicuculina disminuyó de manera significativa el aumento inducido por la oscuridad. El 2-hidroxisaclofen no tuvo efectos significativos. ** $p < 0.01$, por test de Dunnett.

1.6. Variación diaria en el "turnover" de GABA.

Dado que el efecto de la oscuridad sobre la síntesis retiniana de melatonina parece estar vinculado con el sistema gabaérgico, se planteó la hipótesis de que los niveles locales de GABA variaran en función del ciclo de luz-oscuridad. Con este fin se examinó la existencia de variaciones diarias en el "turnover" de GABA en la retina del hámster. Los resultados de los experimentos realizados se representan en la figura 12. El "turnover" de GABA en la retina de animales sacrificados en seis horarios distintos del ciclo de luz-oscuridad (L:O, 14:10), presentó variaciones diarias significativas con valores máximos en la segunda mitad de la noche, a las 24.00 y 04.00 h y en la primera parte de la mañana (a las 08.00 h).

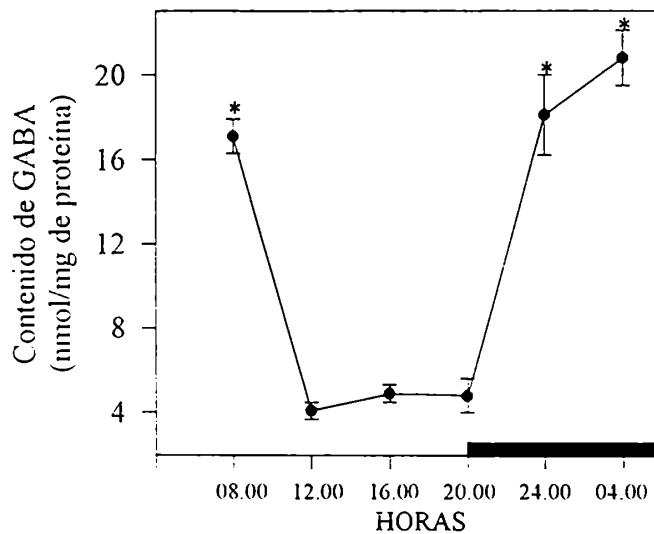


Fig 12. Variación diaria en el "turnover" de GABA en la retina de hámster dorado. Los animales se sacrificaron en los horarios indicados y el contenido de GABA se cuantificó como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los valores indican medias \pm ES, $n= 10$ animales por grupo. El contenido acumulado de GABA en la retina presentó variaciones diarias significativas ($p < 0.01$, ANOVA), con valores máximos a las 24.00, 04.00 y 08.00 h (* $p < 0.05$, test de Tukey).

I.7. Mecanismo de acción del GABA en la inducción de la síntesis de melatonina.

I.7.a. Efecto del GABA sobre el contenido acumulado *in vitro* de AMPc.

Con el objeto de evaluar el mecanismo de acción del GABA en la inducción de la síntesis de melatonina y teniendo en cuenta la serie de antecedentes que señalan al AMPc como el modulador clásico de este mecanismo, se examinó el efecto del GABA, sobre la acumulación de AMPc, en incubaciones de retina de hámster, en presencia de luz (Figura 13). El GABA inhibió significativamente la acumulación de AMPc. La bicuculina revirtió el efecto del GABA, mientras que el baclofen no tuvo efectos significativos.

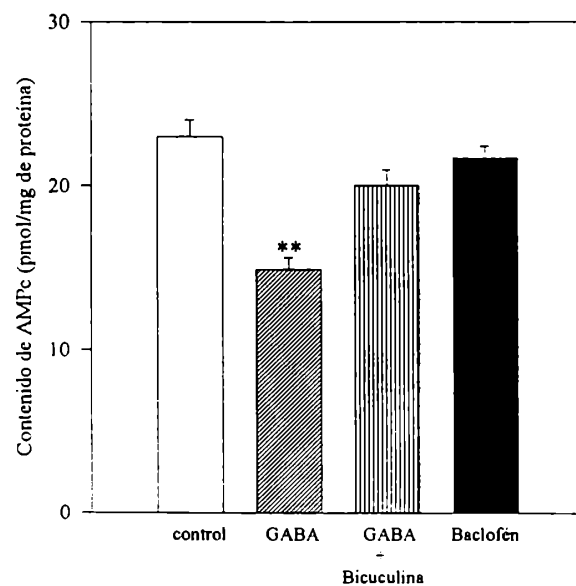


Fig 13. Efecto del GABA, baclofen y bicuculina, sobre el contenido acumulado *in vitro* de AMPc, en la retina de hámster dorado. Los hámsteres fueron sacrificados a las 10.00 h, las retinas extraídas e incubadas en luz, en presencia de IBMX (0.5 mM) como se describe en Materiales y Métodos, con o sin GABA 10 μ M, bicuculina 10 μ M o baclofen 10 μ M. El GABA inhibió significativamente la acumulación de AMPc. Este efecto fue bloqueado por bicuculina. El baclofen no tuvo efecto significativo a la concentración examinada. Se indican medias \pm ES. (n= 15 animales por grupo). ** $p < 0.01$ por test de Dunnett.

I.7.b. Efecto del GABA sobre el contenido acumulado de GMPc.

Con el objeto de evaluar si el mecanismo de acción gabaérgico sobre la síntesis de melatonina, podría ocurrir a través de una vía alternativa a la del AMPc, se examinó el efecto del GABA sobre la acumulación de GMPc, teniendo en cuenta una serie de antecedentes que postulan a este nucleótido como un inductor de la actividad de la NAT en algunas especies. Los resultados obtenidos se representan en la figura 14. El GABA incrementó significativamente el contenido acumulado de GMPc. Este efecto fue completamente revertido por bicuculina. El baclofen no tuvo efectos significativos a la concentración examinada.

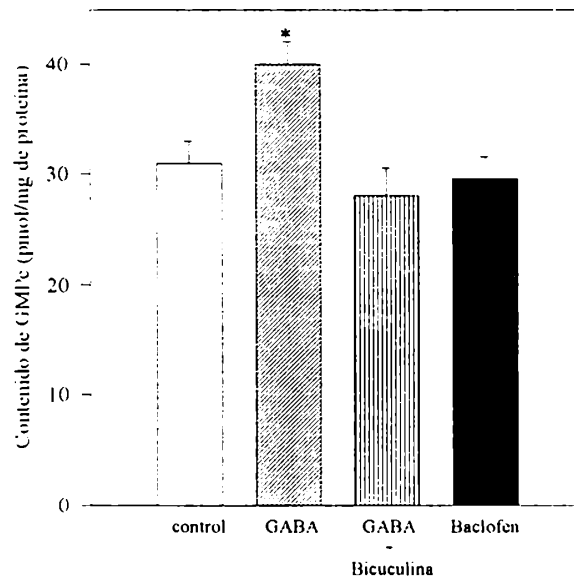


Fig 14. Efecto del GABA, bicuculina y baclofen sobre el contenido acumulado *in vitro* de GMPc, en retinas de hámster dorado. Los animales se sacrificaron a las 10.00 h, las retinas se extrajeron e incubaron en luz, en presencia de IBMX (0.5 mM) como se describe en Materiales y Métodos, con GABA, bicuculina o baclofen (en concentración de 10 μ M). El GABA incrementó significativamente la acumulación de GMPc. La bicuculina bloqueó el efecto del GABA. El baclofen no provocó efectos significativos sobre la acumulación del nucleótido cíclico. Se representan medias \pm ES, n= 15 animales por grupo. * $p < 0.05$ por test de Dunnett.

I.8.a. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la producción *in vitro* de melatonina.

Con el objeto de examinar si el GMPc induce la síntesis de melatonina en la retina del hámster, se estudió el efecto de análogos permeables del nucleótido sobre este parámetro (Figura 15). El 8-Br-GMPc indujo un incremento significativo en la producción de melatonina en retinas incubadas *in vitro* en condiciones de luz. Este efecto fue reproducido por el dibutiril-GMPc que provocó un incremento comparable (datos no mostrados).

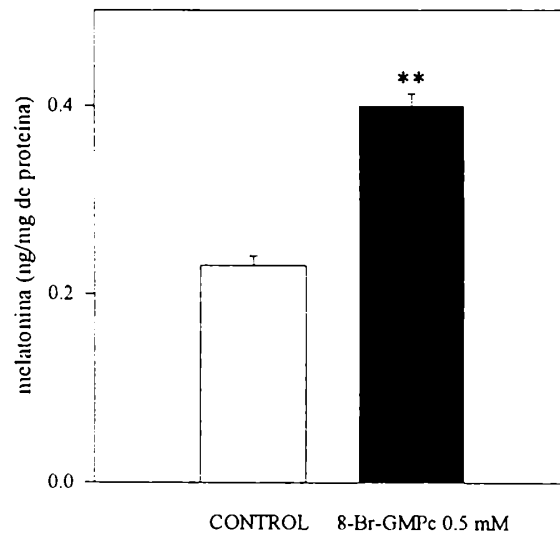


Fig 15. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la producción *in vitro* de melatonina. Los animales se sacrificaron a las 10.00 h, se extrajeron las retinas y se incubaron durante 8 horas en presencia de luz, con o sin 8-Br-GMPc (0.5 mM) como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican medias \pm ES, n=10 animales por grupo. El 8-Br-GMPc provocó un incremento significativo en el contenido retiniano de melatonina (**p < 0.01, test de Student).

I.8.b. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la producción *in vitro* de melatonina en función del tiempo de incubación.

En la figura 16 se muestra la curva temporal del efecto del 8-Br-GMPc sobre la producción de melatonina *in vitro*, en presencia de luz. El efecto estimulador de este análogo fue observado sólo en el período correspondiente a 8 horas de incubación comparado con el grupo control correspondiente. Los niveles basales de melatonina no presentaron diferencias significativas entre los tiempos de incubación examinados.

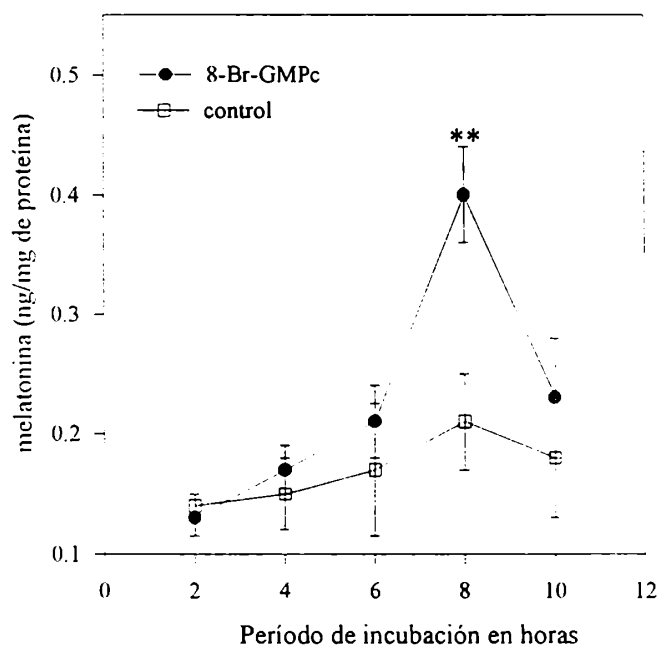


Fig 16. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la producción de melatonina *in vitro* en función de distintos tiempos de incubación. Se representan medias \pm ES, $n=8-10$ animales por grupo. Los animales se sacrificaron a las 10.00 h y las retinas se incubaron durante 2, 4, 6, 8 y 10 horas en presencia o en ausencia de 8-Br-GMPc (0.5 mM). Los resultados indican que el contenido de melatonina fue significativamente más alto en presencia que en ausencia de 8-Br-GMPc luego de 8 horas de incubación (** $p < 0.01$, test de Student). El contenido de melatonina en los períodos de incubación restantes no mostró diferencias significativas con sus respectivos controles. Los valores basales no

mostraron diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación examinados por ANOVA.

I.9.a. Variaciones diarias en los niveles de GMPc retinianos.

Para examinar una posible relación fisiológica entre el GMPc y los niveles de melatonina *in vivo*, se determinaron las variaciones diarias en el contenido de GMPc en la retina del hámster durante el ciclo de 24 horas. Los resultados se representan en la figura 17. Los niveles de GMPc presentaron variaciones diarias significativas con valores más elevados durante la fase nocturna. Los niveles del nucleótido aumentaron después del apagado de las luces, con un máximo a las 24.00 h.

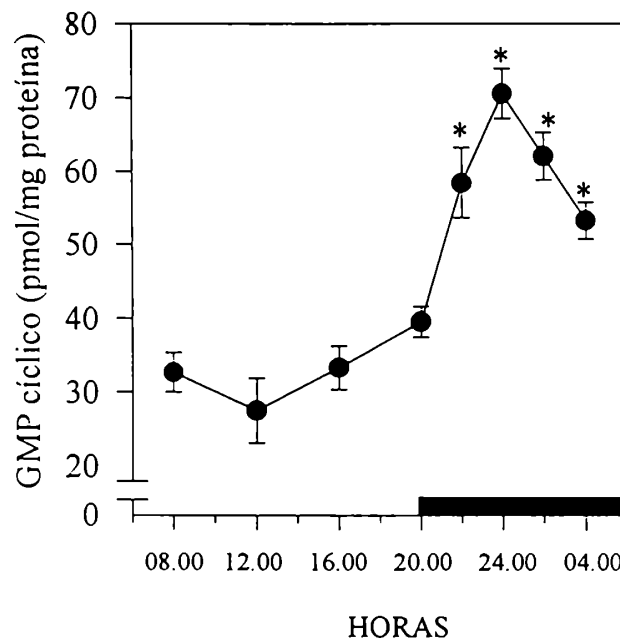


Fig 17. Variaciones diarias en los niveles de GMPc en la retina del hámster dorado. Se indican medias \pm ES, $n = 15-20$ animales por grupo. Los niveles de GMPc mostraron variaciones diarias significativas ($p < 0.01$, ANOVA). Los niveles de GMPc durante la noche fueron significativamente más altos que los valores correspondientes a la etapa diurna ($*p < 0.05$, test de Tukey).

1.9.b. Efecto de la señal fótica sobre los niveles retinianos de GMPc durante la noche.

En la figura 18 se representa el efecto de la aplicación de luz durante la noche sobre los niveles de GMPc *in vivo* en la retina de hámster dorado. Los animales fueron expuestos a luz continua durante la noche y sacrificados en 4 intervalos distintos. Los resultados indican que la luz suprime el incremento nocturno en los niveles de GMPc, llevando los valores a los observados durante la fase diurna.

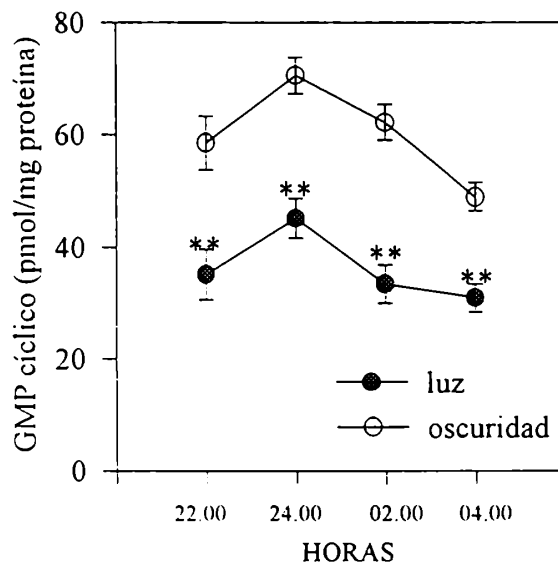


Fig 18. Efecto de la luz durante la noche, sobre el contenido de GMPc en la retina del hámster dorado. Los animales adaptados a la luz o a la oscuridad fueron sacrificados a las 22.00, 24.00, 02.00 y 04.00 h. Se extrajeron las retinas y se cuantificó el contenido de GMPc como se describe en Materiales y Métodos. La luz inhibió significativamente el incremento nocturno en los niveles de GMPc en todos los intervalos examinados (** $p < 0.01$, test de Student). Se representan medias \pm ES, $n=7$ a 12 hámsteres por grupo.

II. EFECTOS DE LA MELATONINA EN LA RETINA DEL HÁMSTER DORADO.

A diferencia de la melatonina pineal que es secretada a la circulación general, la melatonina retiniana podría tener una acción fundamentalmente local. Con el objeto de examinar el rol fisiológico de la melatonina en la retina del hámster dorado, se realizó la serie de experimentos que se detalla a continuación.

II.1. Efectos de la melatonina sobre el sistema de GMPc retiniano.

Existe una serie de antecedentes, ya discutidos en la Introducción, que postulan un vínculo entre la melatonina y el GMPc en diversos tejidos. Dada la relevancia del GMPc en la fisiología retiniana en general y en el mecanismo de fototransducción en particular, se consideró de interés estudiar la posible interacción de la melatonina con el sistema de GMPc retiniano.

II.1.a. Efecto de la melatonina sobre el contenido acumulado *in vitro* de GMPc.

En la tabla I se resumen los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto de la melatonina sobre el contenido de GMPc acumulado *in vitro*.

En las retinas de hámsteres sacrificados a las 20.00, 24.00 ó 04.00 h, la melatonina incrementó significativamente la acumulación de GMPc, en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX). La melatonina no tuvo efecto sobre este parámetro a las 12.00 y 06.00 h en ninguna de las concentraciones examinadas.

	12.00 h	20.00 h	24.00 h	04.00 h	06.00 h
CONTROL	34.4 ± 2.6 (08)	30.1 ± 1.2 (14)	33.5 ± 1.7 (15)	28.4 ± 1.0 (12)	19.6 ± 6.5 (13)
MELATONINA					
1 pM	37.7 ± 2.6 (17)	28.7 ± 3.0 (10)	50.2±5.1** (12)	36.6±1.9* (14)	23.7 ± 3.8 (11)
100 pM	37.9 ± 1.5 (16)	41.0± 1.8** (11)	53.1±2.6** (11)	46.9±2.2** (12)	13.6 ± 2.3 (9)
10000 pM	27.2 ± 1.3 (13)	38.6 ± 1.9** (17)	80.5 ± 3.4** (11)	44.0 ± 1.9** (12)	17.1 ± 2.0 (11)

Tabla I. Efecto de la melatonina sobre la acumulación de GMPc en la retina del hámster dorado. Los hámsteres fueron sacrificados en los horarios indicados. Las retinas fueron disecadas e incubadas como se describe en Materiales y Métodos, con o sin melatonina, en presencia de IBMX (0.5 mM). La melatonina incrementó significativamente la acumulación de GMPc a las 20.00, 24.00 y 04.00 h con una concentración mínima de 1 pM (24.00 y 04.00 h) y 100 pM (20.00 h). Los valores son medias ± ES, expresados como pmol/mg de proteínas. (n) indica el número de animales por grupo. *p<0.05, **p<0.01, test de Dunnett.

II.1.b. Efecto de la melatonina sobre la síntesis de GMPc retiniano.

El efecto de la melatonina sobre la actividad de guanilato ciclasa en la retina del hámster analizado en diferentes intervalos del ciclo de 24.00 h se representa en la tabla II. La melatonina provocó un aumento significativo sobre la actividad de la guanilato ciclasa a las 20.00 y 24.00 h, siendo inefectiva a las 12.00, 04.00 y 06.00 h.

	20.00 h	24.00 h	04.00 h
CONTROL	63.5 ± 0.7 (17)	49.8 ± 0.7 (17)	29.7 ± 0.4 (14)
MELATONINA 10 nM	67.4 ± 1.2*(19)	53.2 ± 1.4*(17)	28.5 ± 0.7 (15)

Tabla II. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la guanilato ciclasa en la retina del hámster dorado. Los hámsteres fueron sacrificados en los horarios indicados. Las retinas fueron disecadas e incubadas como se describe en Materiales y Métodos, con o sin melatonina (10 nM). La melatonina incrementa significativamente la actividad de la enzima a las 20.00 y 24.00 h. Los valores indicados representan medias ± ES, expresados como pmol/mg.prot .min.

*p < 0.05, test de Student.

II.1.c. Análisis cinético de la actividad guanilato ciclasa. Efecto de la melatonina.

Con el objeto de determinar cuál de los parámetros cinéticos de la guanilato ciclasa es susceptible a la acción de la melatonina, se realizó el análisis cinético de la actividad enzimática en presencia o ausencia de melatonina (figura 19). Los animales fueron sacrificados a las 24.00 h y la actividad de la enzima fue examinada en presencia o ausencia de melatonina (10 nM). La melatonina incrementó significativamente el K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes de la guanilato ciclasa. Los valores medios de estos parámetros en presencia y ausencia de melatonina se indican en la tabla III.

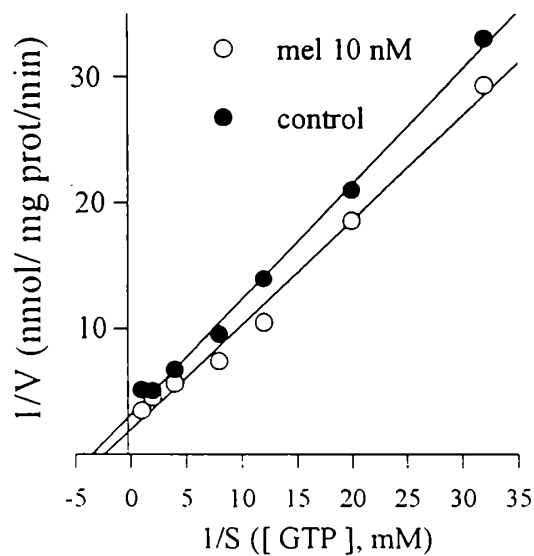


Fig 19. Efecto de la melatonina sobre la actividad retiniana de la guanilato ciclasa: determinación gráfica de los valores aparentes de K_m y $V_{m\acute{a}x}$. Las pendientes y ordenadas al origen fueron calculadas por el método de cuadrados mínimos. Los puntos representan valores promedio de triplicados, utilizando 5 hámsteres por grupo. Las diferencias entre los triplicados fueron menores del 10 %. Los valores aparentes del K_m (mM) y $V_{m\acute{a}x}$ (nmol/mg de prot/min) en este experimento fueron 0.308 y 0.340 respectivamente, para el control y 0.414 y 0.498 respectivamente, para el grupo tratado con melatonina.

	Km (mM)	Vmax. (nmol/mg prot.min)
CONTROL	0.286 ± 0.019	0.386 ± 0.020
MELATONINA 10 nM	0.441 ± 0.025 *	0.507 ± 0.036 *

Tabla III. Efecto de la melatonina sobre la actividad de guanilato ciclasa retiniana. Determinación gráfica de los parámetros cinéticos aparentes, Km y V_{máx.} de la guanilato ciclasa, realizada como se indica en la figura 19. Los valores representan medias ± ES. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el test de Student. *p<0.05. Se representan las medias de los parámetros cinéticos de la actividad guanilato ciclasa retiniana (n=4).

II.1.d. Variación diaria de la actividad de guanilato ciclasa retiniana.

Como hemos demostrado previamente los niveles de melatonina presentan una variación diaria significativa en la retina del hámster dorado. Para estudiar una posible relación fisiológica entre el efecto de la melatonina y la actividad de guanilato ciclasa, se examinó la variación diaria de la actividad de esta enzima en la retina del hámster dorado (Figura 20). La actividad enzimática varió significativamente con valores máximos durante la noche.

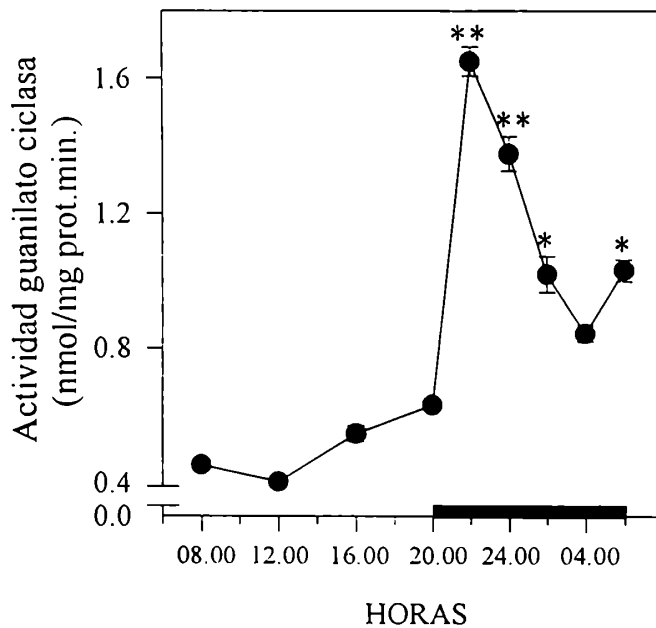


Fig 20. Actividad de la guanilato ciclasa retiniana a través del ciclo de 24 h. Los valores indican medias \pm ES, $n=15$ animales por grupo. La actividad de guanilato ciclasa presentó variaciones diarias significativas ($p < 0.01$, ANOVA), con valores más altos durante la noche, excepto para las 04.00 h. (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, por test de Tukey).

II.1.e. Análisis cinético de la actividad de guanilato ciclasa. Diferencias horarias.

En la figura 21, se grafican los resultados obtenidos a partir de la determinación de los parámetros cinéticos aparentes de la guanilato ciclasa en dos horarios distintos (a las 12.00 y a las 24.00 h) del ciclo de luz-oscuridad. La $V_{m\acute{a}x}$ a las 24.00 h (1.068 ± 0.083 nmol/mg prot .min. (n=3)) fue significativamente más alta que a las 12.00 h (0.351 ± 0.025 nmol/mg prot .min. (n=3)). El K_m no presentó cambios significativos entre ambos horarios (0.455 ± 0.15 mM para las 12.00 h y 0.497 ± 0.06 mM para las 24.00 h).

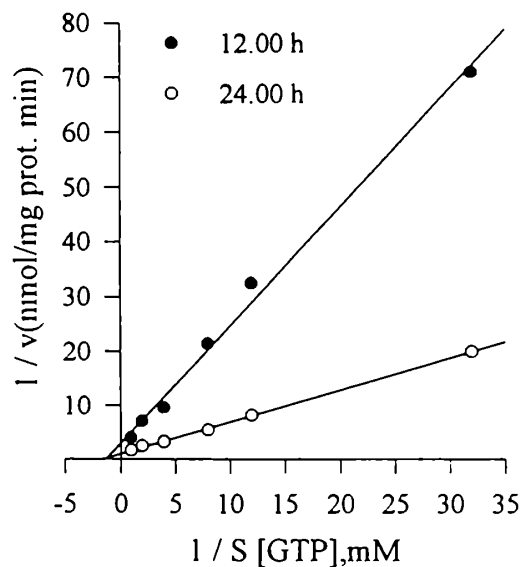


Fig 21. Determinación gráfica de los parámetros cinéticos de la actividad de guanilato ciclasa en dos horarios distintos del ciclo de 24 horas. Los hámsteres fueron sacrificados y las retinas extraídas a las 12.00 y 24.00 h. Las pendientes y ordenadas al origen fueron calculadas por el método de cuadrados mínimos. Cada punto representa los valores promedio de triplicados, utilizando 5 hámsteres por grupo. Las diferencias entre los triplicados fueron menores del 10 %. En este experimento, representativo de tres, los parámetros aparentes K_m (mM) y $V_{m\acute{a}x}$ (nmol/mg de prot. min) presentaron valores de 0.738 y 0.341 respectivamente, para las 12.00 h; 0.618 y 1.046 respectivamente, para las 24.00 h.

II.1.f. Efecto de la melatonina sobre la actividad de óxido nítrico sintetasa retiniana.

En múltiples sistemas biológicos, se ha demostrado que el producto de la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), el óxido nítrico, posee una acción estimuladora sobre la guanilato ciclasa, que resulta en un aumento de los niveles de GMPc. Considerando estos antecedentes y teniendo en cuenta el efecto de la melatonina sobre el contenido retiniano del nucleótido cíclico, se evaluó la posibilidad de que el efecto de la melatonina estuviera mediado a través de la activación de la NOS. En la figura 22 se grafican los resultados obtenidos. La melatonina a una concentración 10 nM no presentó efectos significativos sobre la actividad de la NOS en retinas de animales sacrificados a las 24.00 h.

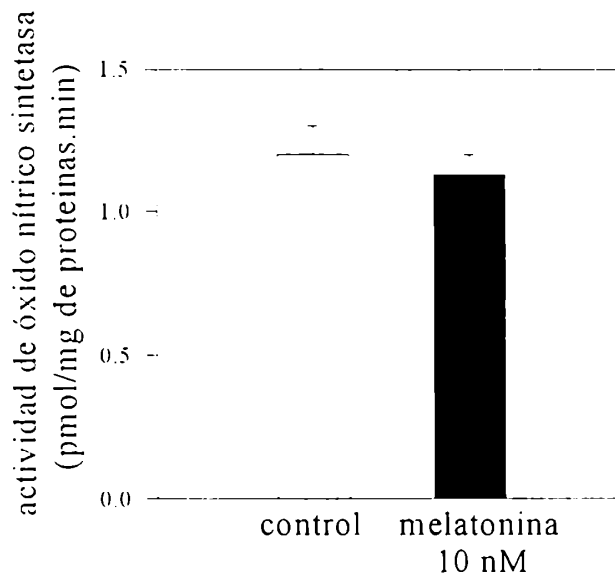


Fig 22. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la NOS en la retina del hámster dorado. Los animales fueron sacrificados a las 24.00 h. Las retinas fueron extraídas e incubadas como se indica en Materiales y Métodos, en presencia o ausencia de melatonina 10 nM. Los valores indican medias \pm ES, n= 10-15 animales por grupo. La melatonina no modificó la actividad de la óxido nítrico sintetasa en la retina del hámster (test de Student).

II.1.g. Efecto de la melatonina sobre la degradación de GMPc retiniano.

Con el objeto de determinar la existencia de una acción acoplada sobre la síntesis y la degradación del nucleótido por efecto de la melatonina, los niveles de GMPc se cuantificaron en ausencia de IBMX. Los resultados se representan en la figura 23, junto con los resultados obtenidos en presencia de IBMX (similares a los de la tabla I). La melatonina, en todas las concentraciones examinadas, provocó un porcentaje de aumento respecto a los niveles basales significativamente mayor, en ausencia que en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa.

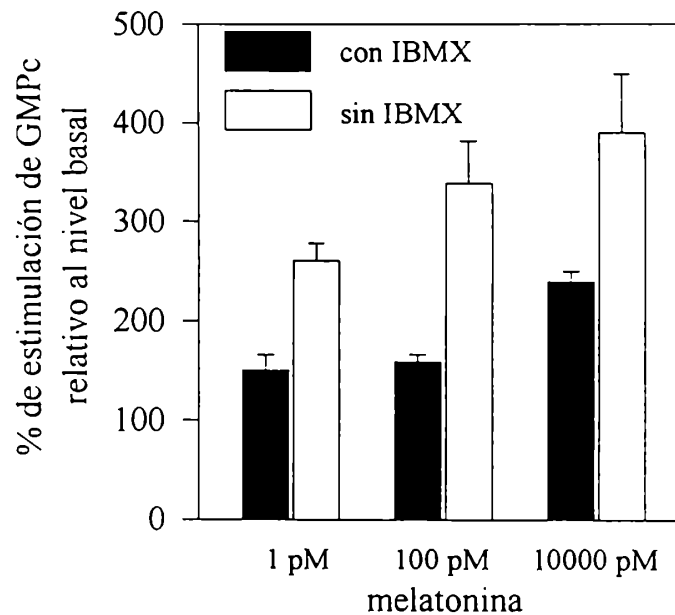


Fig 23. Efecto de la melatonina sobre el contenido de GMPc en presencia o ausencia de IBMX (0.5 mM). Los hámsteres se sacrificaron a las 24.00 h, se extrajeron las retinas y se realizaron las incubaciones como se describe en Materiales y Métodos. La melatonina incrementó significativamente el contenido de GMPc a todas las concentraciones examinadas, con o sin IBMX. Las barras representan medias \pm ES (n=6 a 8 animales por grupo). Los niveles basales en ausencia o en presencia de IBMX se expresaron como 100 %, siendo los valores absolutos 10.5 ± 1.3 y 34.8 ± 1.5 pmol/mg de proteínas, respectivamente.

Estos resultados podrían indicar un efecto de la melatonina sobre la degradación del nucleótido. Por consiguiente, se estudió el efecto del metoxiindol sobre la actividad de la fosfodiesterasa (Figura 24). La melatonina disminuyó significativamente la actividad de esta enzima a las 24.00 h.

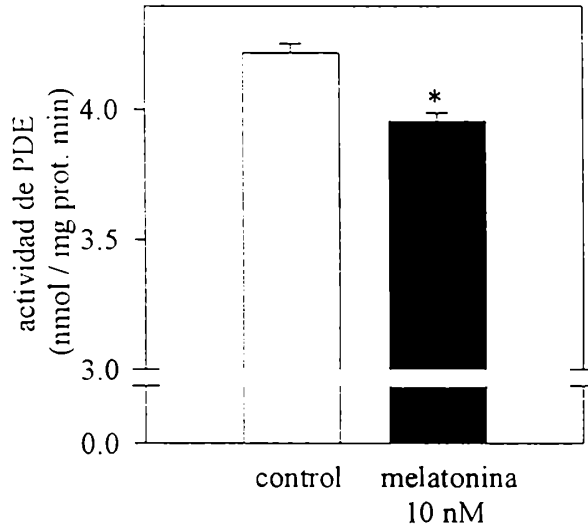


Fig 24. Efecto de la melatonina sobre la actividad de la fosfodiesterasa. Los hámsteres se sacrificaron a las 24.00 h y las retinas se incubaron como se describe en Materiales y Métodos. La melatonina (10 nM) disminuyó significativamente la actividad de la enzima. Los valores indican medias \pm ES, n= 10 animales por grupo. * $p < 0.05$, analizado por test de Student.

II.1.h. Efecto de la melatonina y el IBMX sobre la actividad de fosfodiesterasa.

A fin de descartar que el efecto de la melatonina sobre la actividad de la guanilato ciclasa fuera una consecuencia de su acción potenciadora sobre la inhibición inducida por IBMX, se examinó la actividad de la fosfodiesterasa a las 24.00 h, en presencia conjunta de melatonina y del inhibidor de la enzima. Los resultados se resumen en la tabla IV. Los efectos inhibitorios de la melatonina y del IBMX no fueron aditivos sobre la actividad de la fosfodiesterasa.

	Actividad de fosfodiesterasa (nmol/mg prot)
CONTROL	4.60 ± 0.1
MELATONINA 10 nM	3.70 ± 0.16 *
IBMX 0.5 mM	1.19 ± 0.03 **
IBMX 0.5 mM + MELATONINA 10 nM	1.16 ± 0.05 **

Tabla IV. Efecto de la melatonina y el IBMX sobre la actividad de la fosfodiesterasa. Se extrajeron las retinas de animales sacrificados a las 24.00 h. Se realizaron incubaciones como se indica en Materiales y Métodos, en presencia de melatonina 10 nM y/o IBMX 0.5 mM. Los valores expresados como nmol/mg de prot. min, indican medias ± ES, n= 10 animales por grupo. El IBMX indujo una inhibición significativa del 75 % sobre la actividad de la enzima. Los efectos del IBMX y la melatonina no fueron aditivos sobre este parámetro. **p < 0.01, *p < 0.05, test de Tukey.

II.1.i. Variación diaria de la actividad fosfodiesterasa retiniana.

En la figura 25 se representa la variación diaria de la actividad de fosfodiesterasa en la retina del hámster. La actividad de esta enzima no presentó variaciones significativas durante el ciclo de 24 horas.

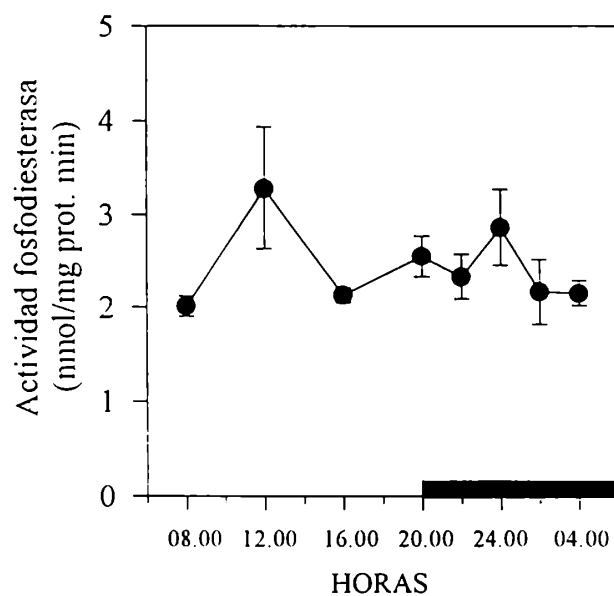


Fig 25. Actividad de fosfodiesterasa retiniana durante el ciclo de 24 horas. Los valores representan medias \pm ES, $n= 15$ animales por grupo. La actividad de la enzima no presentó variaciones significativas entre los intervalos examinados. (analizados por ANOVA).

II.1.j. Efectos de la señal fótica sobre las actividades de guanilato ciclasa y fosfodiesterasa retinianas.

Para evaluar el efecto de la luz sobre las actividades de las enzimas de síntesis y de degradación del GMPc, se efectuaron los experimentos que se resumen en la tabla V. La luz durante la noche suprimió el incremento nocturno en la actividad de la guanilato ciclasa. En contraste, la luz durante la noche no provocó modificaciones significativas en los niveles de actividad de fosfodiesterasa.

	22.00 h	24.00 h	02.00 h	04.00 h
oscuridad	1.651 ± 0.043 (11)	1.308 ± 0.050 (9)	1.018 ± 0.053 (12)	0.843 ± 0.025 (10)
luz	0.539 ± 0.03 (8) **	0.507 ± 0.014 (7) **	0.495 ± 0.039 (8) **	0.487 ± 0.040 (7)**

Actividad de guanilato ciclasa en la retina de hámster dorado (nmol/mg de prot.min).

	22.00 h	24.00 h	02.00 h	04.00 h
oscuridad	2.33 ± 0.24 (12)	2.86 ± 0.41 (10)	2.17 ± 0.35 (9)	2.15 ± 0.13 (10)
luz	2.67 ± 0.25 (7)	2.72 ± 0.13 (7)	2.75 ± 0.18 (8)	2.32 ± 0.21 (7)

Actividad de fosfodiesterasa en la retina de hámster dorado (nmol/mg de prot .min)

Tabla V. Los animales fueron expuestos a luz u oscuridad durante la noche y se sacrificaron a las 22.00, 24.00, 02.00 y 04.00 h. Las retinas fueron extraídas y las actividades enzimáticas fueron determinadas como se describe en Materiales y Métodos. La luz inhibió significativamente el aumento nocturno de la actividad de guanilato ciclasa. La actividad de PDE no presentó cambios significativos. Los valores representan medias ± ES, (nº de animales). ** p< 0.01, test de Student.

II.2. Efectos *in vitro* de la melatonina sobre la transmisión glutamatérgica retiniana.

Considerando que la liberación de glutamato en la retina es un proceso inducido por la despolarización del fotorreceptor, debida a la activación de canales dependientes de GMPC, una continuación de esta serie de experimentos consistió en examinar, si el efecto estimulador de la melatonina sobre el mensajero intracelular trasciende a nivel sináptico, a través de la regulación de la transmisión glutamatérgica. En base a estas consideraciones se examinó el efecto de la melatonina sobre los mecanismos de recaptación y liberación de glutamato en ensayos *in vitro*.

II.2.a. Efecto de la melatonina sobre la recaptación de [³H]-glutamato.

El efecto de la melatonina sobre la recaptación de [³H]-glutamato en la retina del hámster dorado, examinado en dos horarios distintos del ciclo de luz-oscuridad, se observa en la figura 26. En las retinas extraídas a las 24.00 h, la melatonina en concentraciones de 0.1 y 10 nM provocó un incremento significativo sobre la recaptación de [³H]-glutamato, siendo inefectiva a las 12.00 h en todas las concentraciones examinadas.

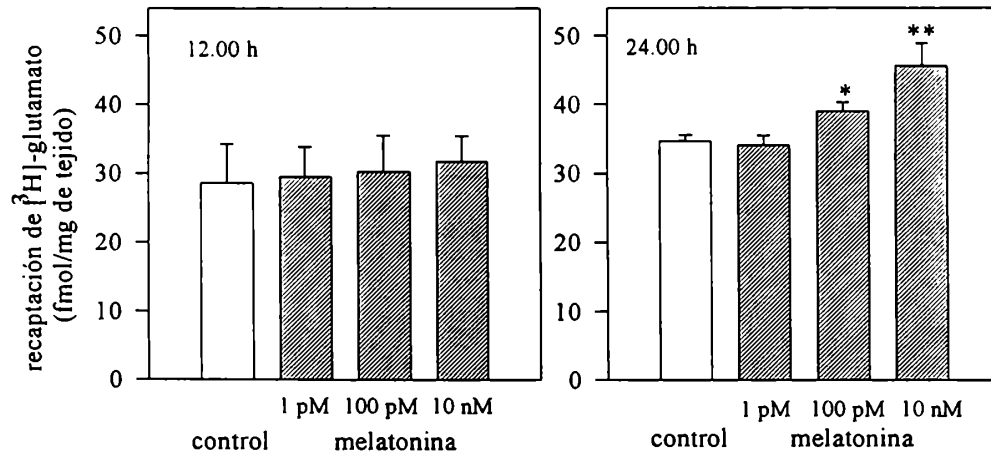


Fig 26. Efecto de la melatonina sobre la recaptación de ^3H -glutamato en la retina del hámster dorado. Los animales se sacrificaron a las 12.00 y 24.00 h, las retinas se extrajeron e incubaron como se describe en Materiales y Métodos, en presencia o ausencia de melatonina (1pM a 10 nM). Se representan medias \pm ES, $n=15$ animales por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ tratados vs control (test de Dunnett).

El efecto de la melatonina sobre la captación de [³H]-glutamato, observado a las 24.00 h, persistió aún en ausencia de calcio extracelular como se muestra en la Tabla VI. La ausencia de calcio en el medio de incubación no tuvo efecto significativo sobre la captación basal de [³H]-glutamato.

	fmol/mg de tejido
CONTROL	33.7 ± 1.4
MELATONINA 10 nM	40.0 ± 1.2 *

Tabla VI. Efecto de la melatonina sobre la captación de [³H]-glutamato en ausencia de calcio extracelular. Las retinas extraídas a las 24.00 h se incubaron como se describe en Materiales y Métodos, en ausencia del catión divalente y en presencia de 5mM de EGTA, con o sin melatonina 10 nM. Los datos indican medias ± ES, n= 10 animales por grupo. * p < 0.05 vs control (ANOVA).

II.2.b. Efecto de la melatonina sobre la liberación de [³H]-glutamato.

En la figura 27 se representa el efecto de la melatonina sobre la liberación de [³H]-glutamato en retinas de hámsteres sacrificados a las 12.00 y 24.00 h. La melatonina indujo un incremento significativo sobre la liberación fraccional de glutamato a las 24.00 h sin modificar significativamente este parámetro a las 12.00 h, en ninguna de las concentraciones examinadas.

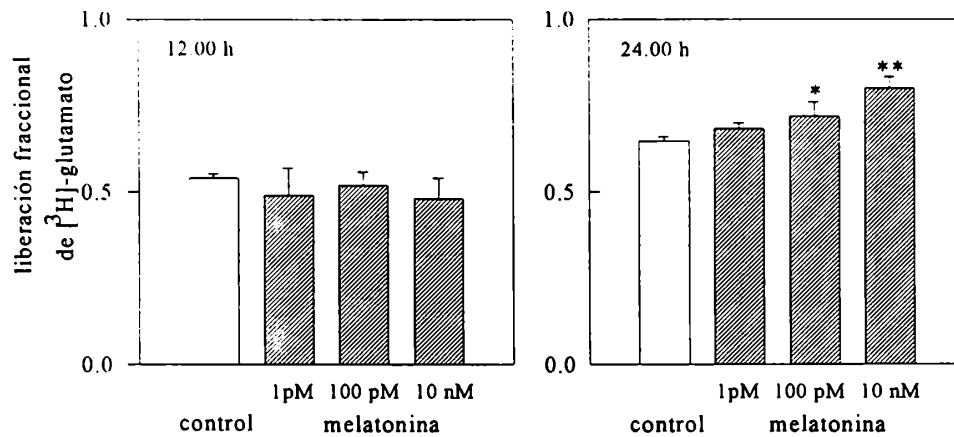


Fig 27. Efecto de la melatonina sobre la liberación de ^3H -glutamato en la retina del hámster dorado. Los hámsteres se sacrificaron a las 12.00 y 24.00 h y las retinas se incubaron como se indica en Materiales y Métodos. Se indican medias \pm ES ($n=15$ animales por grupo). La melatonina con una concentración umbral de 100 pM incrementó significativamente la liberación de ^3H -glutamato a las 24.00 h. A las 12.00 h, la melatonina no provocó efectos significativos sobre este parámetro (ANOVA). Los valores de liberación se expresaron como liberación fraccional: radioactividad liberada / radioactividad total captada por el tejido. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (test de Dunnett).

La omisión de calcio extracelular del medio de incubación, más el agregado de EGTA, suprimió el efecto de la melatonina sobre la liberación de [³H]-glutamato en retinas de hámsteres sacrificados a las 24.00 h (tabla VII).

	liberación fraccional (liberado/contenido)
CONTROL	0.411 ± 0.016
MELATONINA 10 nM	0.426 ± 0.021

Tabla VII. Efecto de la melatonina sobre la liberación de [³H]-glutamato a las 24.00 h, en ausencia de calcio extracelular. Los hámsteres se sacrificaron a las 24.00 h. Se extrajeron las retinas y se incubaron como se indica en Materiales y Métodos con o sin melatonina 10 nM en un medio sin calcio (con EGTA 5 mM). Los valores se expresan como liberación fraccional (radioactividad liberada / radioactividad total captada por el tejido). Los valores indican medias ± ES con un n=10 animales por grupo. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

En el medio libre de calcio se observó una disminución significativa respecto de la liberación en presencia del catión. Los valores basales en presencia y en ausencia de calcio, expresados como liberación fraccional fueron: 0.65 ± 0.01 y 0.41 ± 0.02, respectivamente.

II.3.a. Efecto de la melatonina sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$.

Considerando que el efecto de la melatonina sobre la liberación de $[^3\text{H}]$ -glutamato fue dependiente del calcio extracelular, se contempló un posible efecto de la melatonina sobre el influjo del catión. Para evaluar esta posibilidad se estudió el efecto del metoxiindol sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$. En la figura 28 se representa el efecto de la melatonina sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ a diferentes tiempos de incubación en presencia de melatonina 10 nM, en fracciones sinaptosomales crudas de retinas de animales sacrificados a las 24.00 h.

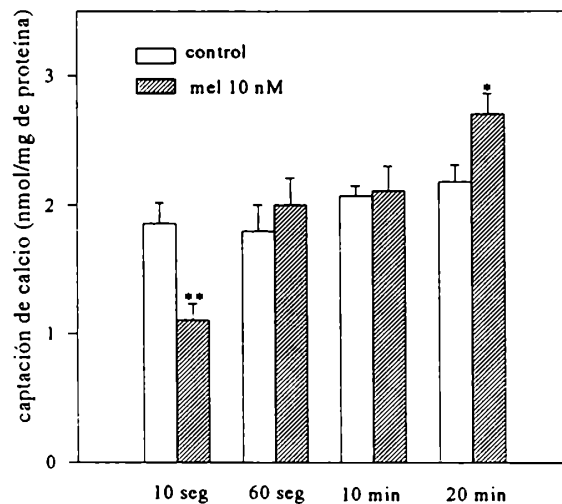


Fig 28. Efecto de la melatonina sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ en fracciones sinaptosomales crudas de retinas de hámster dorado. Los animales se sacrificaron a las 24.00 h, las retinas se extrajeron, se procesaron e incubaron con o sin melatonina durante 10 seg, 60 seg, 10 min y 20 min como se indica en Materiales y Métodos. Se representan medias \pm ES, n=10 animales por grupo. La melatonina inhibió significativamente la captación de calcio a los 10 seg, mientras que a los 60 seg y 10 min de incubación, no modificó significativamente este parámetro. La melatonina al cabo de 20 min en el medio de incubación, incrementó de manera significativa la captación de calcio en sinaptosomas de retina. Test de Student (control vs melatonina). **p< 0.01, * p< 0.05.

La melatonina provocó una inhibición significativa en la captación de calcio luego de 10 seg. de agregada al medio de incubación. A los 60 seg y 10 min la melatonina no tuvo efectos significativos. En contraste, la presencia de melatonina durante 20 min en el medio de incubación causó un incremento significativo sobre este parámetro.

II.3.b. Efecto de la melatonina sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ en función del horario.

Con el objeto de examinar el efecto de la melatonina (durante 20 min) sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ en función del horario, se estudió este efecto a las 12.00 y 24.00 h (figura 29). La melatonina incrementó significativamente la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ a las 24.00 h con una concentración umbral de 100 pM, siendo inefectiva a las 12.00 h en todas las concentraciones examinadas.

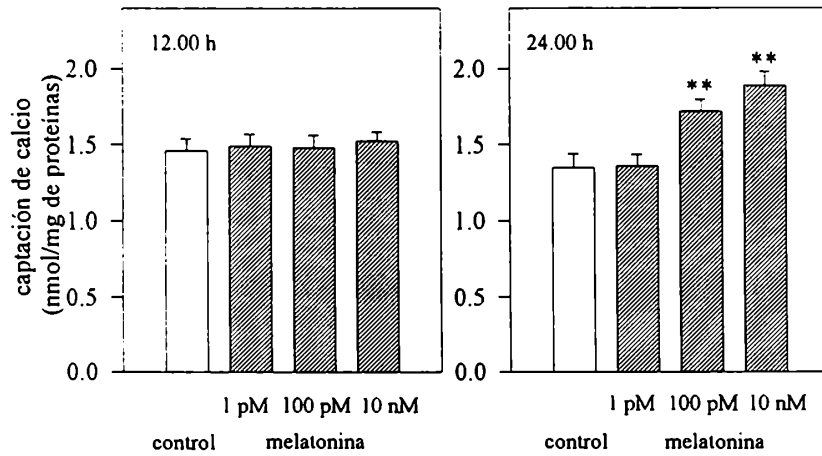


Fig 29. Efecto de la melatonina sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ por fracciones sinaptosomales crudas de retinas de hámster. Los animales se sacrificaron a las 12.00 y 24.00 h, se extrajeron las retinas y se procesaron e incubaron como se indica en Materiales y Métodos, con o sin melatonina (1 pM a 10 nM) durante 20 min. Las barras indican medias \pm ES, $n=15$ animales por grupo. La melatonina en concentraciones 100 pM y 10 nM provocó un aumento significativo en la captación del catión a las 24.00 h (** $p < 0.01$, test de Dunnett). A las 12.00 h la melatonina no modificó significativamente este parámetro a ninguna de las concentraciones examinadas (ANOVA).

II.4. Efectos de análogos de GMPc sobre la transmisión glutamatérgica retiniana.

Con el objeto de evaluar la posibilidad de que los efectos de la melatonina fueran mediados por el incremento en los niveles de GMPc según se ha descrito, se realizaron ensayos *in vitro* para estudiar el efecto del 8-Br-GMPc sobre la recaptación y liberación de [^3H]-glutamato, así como en la captación de [$^{45}\text{Ca}^{2+}$].

II.4.a. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la captación de [^3H]-glutamato.

El efecto del 8-Br-GMPc sobre la captación de glutamato se observa en la figura 30. El 8-Br-GMPc incrementó significativamente la captación de [^3H]-glutamato a las 12.00 y 24.00 h.

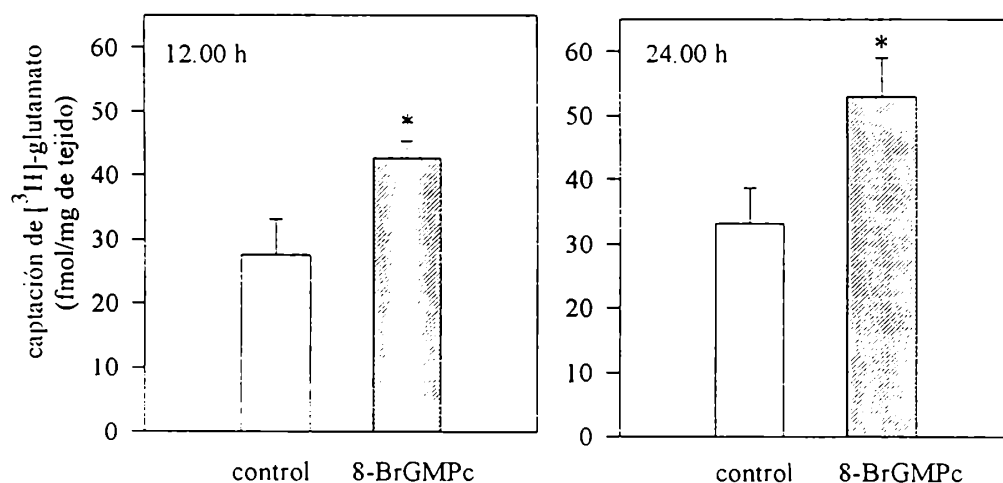


Fig 30. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la captación de [^3H]-glutamato en la retina de hámster dorado. Los animales se sacrificaron a las 12.00 y 24.00 h, la extracción de retinas y las incubaciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, con o sin el análogo del GMPc en una concentración 0.5 mM. Los valores representan medias \pm ES, n= 6-12 animales por grupo. El 8-Br-GMPc incrementó significativamente la captación de glutamato en los dos horarios examinados (test de Student, *p < 0.05).

II.4.b. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la liberación de [³H]-glutamato.

El efecto del 8-Br-GMPc sobre la liberación de [³H]-glutamato se observa en la figura 31. El análogo del GMPc, en una concentración 0.5 mM, incrementó significativamente la liberación de [³H]-glutamato en retinas de hámster tanto a las 12.00 como a las 24.00 h.

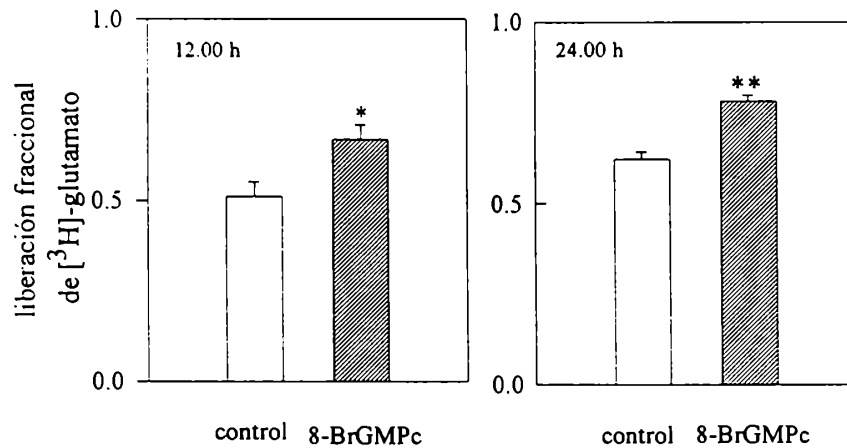


Fig 31. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la liberación de [³H]-glutamato en la retina de hámster dorado. Las retinas extraídas a las 12.00 y 24.00 h fueron incubadas como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican medias \pm ES, n= 10 a 14 animales por grupo. Los valores se expresan como liberación fraccional (radioactividad liberada/ radioactividad total captada por el tejido). El análogo del GMPc en una concentración 0.5 mM incrementó significativamente la liberación de [³H]-glutamato en los dos horarios examinados (test de Student, *p < 0.05, **p < 0.01).

II.4.c. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$.

En la figura 32 se representa el efecto del 8-Br-GMPc sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ en fracciones sinaptosomales crudas de retinas de hámster. El efecto del análogo se examinó a las 12.00 y 24.00 h. El 8-Br-GMPc (0.5 mM) incrementó significativamente la captación de calcio en los dos horarios examinados.

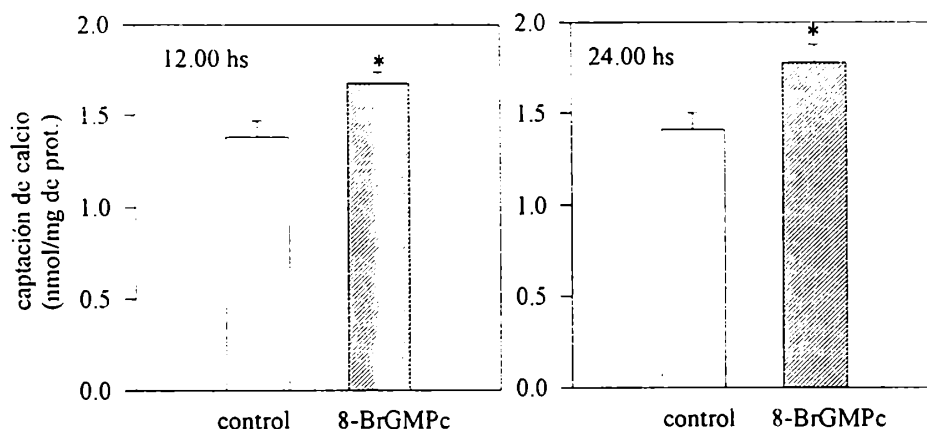


Fig 32. Efecto del 8-Br-GMPc sobre la captación de $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ en fracciones sinaptosomales crudas de retinas de hámsteres sacrificados a las 12.00 y 24.00 h. Las fracciones se prepararon y se incubaron como se indica en Materiales y Métodos con o sin 8Br-GMPc (0.5 mM) durante 20 min. Se indican medias \pm ES (n=7 a 12). El análogo del nucleótido incrementó significativamente la captación de calcio a las 12.00 y 24.00 h. (* $p < 0.05$, test de Student).

Los efectos del 8-Br-GMPc sobre los parámetros descritos en las figuras 30, 31 y 32 fueron reproducidos por el dibutiril-GMPc en una concentración de 0.5 mM (datos no mostrados).

II.5. Estudio de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina a membranas de retina.

Como paso siguiente en la caracterización de los efectos de la melatonina en la retina del hámster, se examinó la presencia de receptores específicos para el metoxiindol mediante el uso de 2-[¹²⁵I]melatonina como radioligando.

II.5.a. Análisis de Scatchard de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina.

En la figura 33 se muestra el análisis de Scatchard de la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina a membranas de retina de hámster dorado. Los estudios de saturación se realizaron en retinas de animales sacrificados a las 20.00 h. La concentración máxima de sitios de unión ($B_{\text{máx}}$) calculada a partir del análisis de Scatchard de tres experimentos fue 1.72 ± 0.2 fmol/mg de proteínas y la K_d de 98.3 ± 11 pM. Se indican medias \pm ES (n=3).

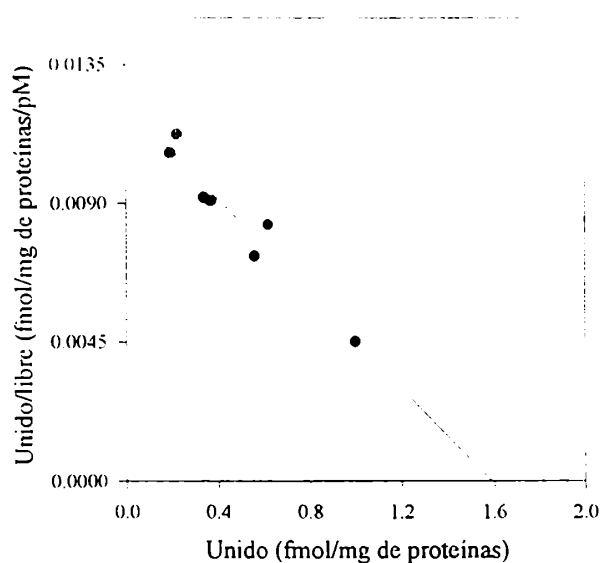


Fig 33. Gráfico de Scatchard de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina de hámsteres sacrificados a las 20.00 h. La pendiente y ordenada al origen se calcularon por el método de cuadrados mínimos. Cada punto representa medias de triplicados utilizando 6 a 8 animales por grupo. Las diferencias entre los triplicados fueron menores que el 10 %. En este experimento (representativo de tres) el valor de Kd fue 111.3 pM y de Bmáx 1.63 fmol/mg de proteínas. Las medias ± ES de los parámetros de los experimentos realizados se mencionan en el texto.

II.5.b. Curso temporal de asociación y disociación de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina.

En la figura 34 se observa el curso temporal de asociación y disociación de la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina (50 pM) en fracciones sinaptosomales crudas aisladas de retinas de hámster. La unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina, definida como la unión total menos la unión inespecífica en

presencia de 10 μM de melatonina fría, alcanzó el equilibrio a los 60 min. y permaneció estable por 5 horas. El valor de la constante de asociación (k_1) fue $32.9 \pm 2.6 \times 10^7 \text{ l/ M. min}$ ($n=4$). La disociación del complejo de unión se inició, luego de 120 min de incubación con el radioligando, por la adición de un exceso de melatonina fría (10 μM). El valor de la constante de disociación (k_{-1}) fue $0.0219 \pm 0.0061 \text{ 1/min}$ ($n=4$), con un $t_{1/2}$ de $48.5 \pm 12 \text{ min}$. El valor de la constante cinética de disociación (K_d) para la unión específica de 2-[^{125}I]melatonina se calculó como el cociente k_{-1}/k_1 y fue 66.5 pM.

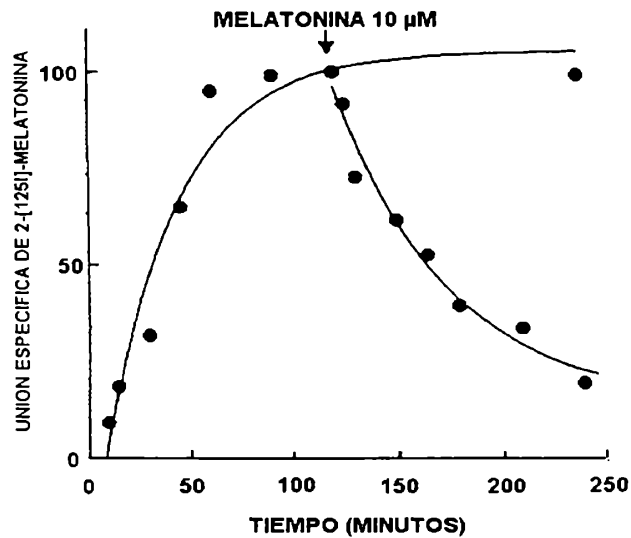


Fig 34. Curso temporal de asociación y disociación de la unión de 2-[^{125}I]melatonina a la fracción sinaptosomal cruda de retina de hámster. Los animales se sacrificaron a las 20.00 h, las retinas se extrajeron y se procesaron como se indica en Materiales y Métodos. La unión específica de 2-[^{125}I]melatonina alcanzó un máximo a los 60 minutos, permaneció estable durante 5 horas y fue totalmente reversible por la adición de un exceso de melatonina fría (10 μM). Se indican medias de un experimento representativo de tres.

II.5.c. Caracterización farmacológica del sitio de unión a 2-[¹²⁵I]melatonina.

En la tabla VIII se resume la caracterización farmacológica del sitio de unión a la 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina del hámster dorado. Las curvas de competencia de la melatonina y los análogos del metoxiindol por el sitio de unión al radioligando fueron monofásicas sugiriendo la unión a un único sitio. La caracterización farmacológica dió como resultado el siguiente orden de afinidades (K_i): 2-iodomelatonina > 6-hidroximelatonina > melatonina > 6-cloromelatonina >>> n-acetil-5-hidroxitriptamina > 5-metoxitriptamina ≥ 5-hidroxitriptamina (serotonina).

Unión de 2-[¹²⁵ I]melatonina	
compuesto	K _i (nM)
2-Iodomelatonina	0.6 ± 0.3 (6)
6-hidroximelatonina	2.1 ± 0.7 (3)
Melatonina	4.2 ± 1.0 (3)
6-Cloromelatonina	9.3 ± 2.0 (3)
N-acetil-5-Hidroxitriptamina	2180 ± 800 (3)
5-Metoxitriptamina	8006 ± 4000 (3)
5-hidroxitriptamina	8526 ± 3800 (3)

Tabla VIII. Perfil farmacológico del sitio de unión a la 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina del hámster dorado. Los valores de K_i fueron calculados por el método de Cheng y Prusoff (1973) a partir de los IC₅₀ obtenidos de las curvas de competencia. La inhibición de la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina (50-70 pM) se determinó utilizando 6-8 concentraciones distintas de las drogas indicadas. Se representan medias ± ES y (n) indica el número de experimentos por grupo.

II.5.d. Efecto de los nucleótidos de guanina y adenina sobre la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina.

La figura 35 muestra el efecto de los nucleótidos de guanina (GTP, GDP y GMP) y adenina (ATP) sobre la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina de hámster. La inhibición del 50 % de la unión específica máxima (IC₅₀) se obtuvo con GTP $0.49 \pm 0.15 \mu\text{M}$ (n=5), GDP $0.76 \pm 0.15 \mu\text{M}$ (n=5), GMP $0.16 \pm 0.03 \text{ mM}$ (n=3) y ATP $0.31 \pm 0.05 \text{ mM}$ (n=3).

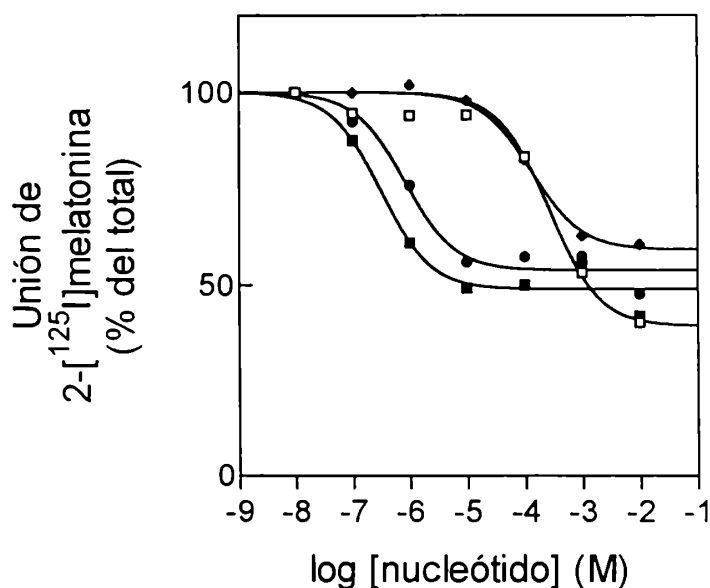


Fig 35. Curvas de inhibición por nucleótidos de guanina y adenina de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina en retina de hámster dorado. Los animales fueron sacrificados a las 20.00 h, las retinas se extrajeron y se trataron como se indica en Materiales y Métodos. Las incubaciones se realizaron con [¹²⁵I]melatonina 100 pM y varias concentraciones de los nucleótidos (1 nM a 10 mM). Los símbolos indican: ■ GTP, ● GDP, ◆ GMP y □ ATP. Se representan los valores promedio de triplicados para cada concentración obtenidos de un experimento representativo de tres (n=6 a 8 animales por grupo).

II.6. Efecto de la melatonina sobre el contenido acumulado *in vitro* de AMPc retiniano.

Los resultados obtenidos en el estudio de los efectos de los nucleótidos sobre la unión de 2-[¹²⁵I]-melatonina, señalan la posible interacción del receptor con una proteína Gi. Para evaluar esta posibilidad se estudió el efecto del metoxiindol sobre la acumulación *in vitro* de AMPc, en distintos intervalos del ciclo de 24 horas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla IX. En retinas extraídas de animales sacrificados a las 12.00, 24.00 y 04.00 h, la melatonina inhibió significativamente el contenido acumulado de AMPc (en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa) a las 12.00 y 24.00 h. La concentración mínima efectiva fue 1 pM y 10 pM para las 24.00 y 12.00 h, respectivamente. A las 04.00 h la melatonina no tuvo efecto significativo en ninguna de las concentraciones examinadas.

	Contenido de AMP cíclico (pmol/mg de proteínas)		
	12.00 h	24.00 h	04.00 h
control	26.1 ± 0.6 (25)	55.4 ± 1.3 (18)	71.2 ± 5.4 (17)
melatonina			
1 pM	25.4 ± 1.2 (10)	45.1 ± 4.1 (10)*	68.3 ± 4.9 (15)
10 pM	18.0 ± 0.9 (20)*	45.7 ± 2.8 (11)*	87.9 ± 3.1 (16)
100 pM	16.9 ± 0.6 (16)*	43.8 ± 2.3 (14)*	81.6 ± 7.4 (15)
1000 pM	13.5 ± 1.2 (12)*	45.8 ± 2.6 (10)*	66.5 ± 4.7 (14)

Tabla IX. Efecto de la melatonina sobre la acumulación de AMPc en la retina del hámster dorado. Los hámsteres fueron sacrificados a las 12.00, 24.00 y 04.00 h. Las retinas se extrajeron y se incubaron como se describe en Materiales y Métodos, con o sin melatonina en concentraciones de 1 a 1000 pM, en presencia de IBMX (0.5 mM). La melatonina inhibió significativamente la acumulación de AMPc a las 12.00 y 24.00 h, con una concentración mínima efectiva de 10 y 1 pM respectivamente. Se representan medias ± ES (número de animales por grupo). *p < 0.05, test de Dunnett.

II.7.a. Variación diaria de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina.

Todos los efectos de la melatonina hasta ahora descritos mostraron una marcada dependencia horaria. Con el objeto de estudiar si la diferencia en la respuesta a la melatonina se relaciona con cambios vinculados al receptor, se determinó la variación diaria de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina del hámster (figura 36). La unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina examinada con una concentración no saturante del radioligando (100 pM) presentó variaciones diarias significativas. La unión específica fue máxima a las 24.00 h y difirió significativamente entre todos los intervalos examinados.

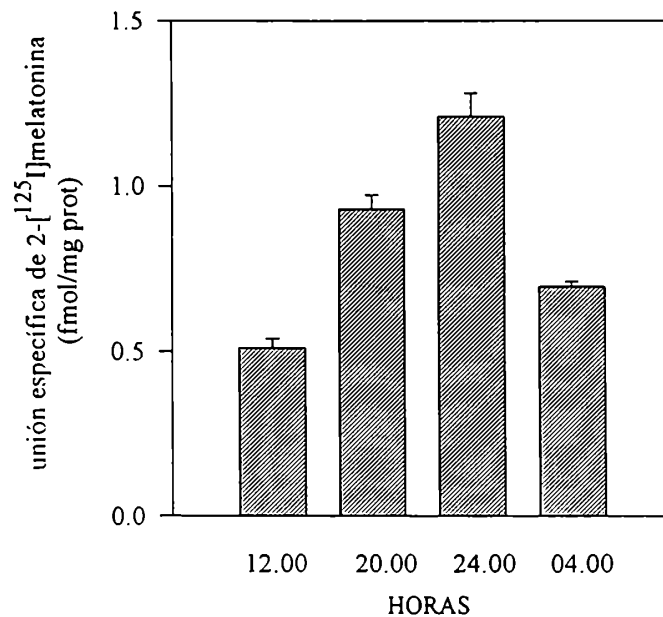


Fig 36. Variación diaria de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina del hámster dorado. Los animales se sacrificaron a las 12.00, 20.00, 24.00 y 04.00 h, las retinas se extrajeron y se trataron como se indica en Materiales y Métodos. Se utilizó una concentración no saturante del radioligando (100 pM). Cada barra representa la media \pm ES, n= 10 animales. La unión específica difirió entre todos los intervalos examinados con un máximo a las 24.00 h ($p < 0.01$, ANOVA, seguido por test de Tukey).

II.7.b. Análisis de Scatchard de la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina a las 12.00 y 24.00 h.

Con el objeto de determinar cuál de los parámetros cinéticos del receptor de 2-[¹²⁵I]melatonina varía en función de la hora del sacrificio, se realizaron estudios de saturación en retinas de animales sacrificados a las 12.00 y 24.00 h, como se observa en la figura 37. El valor de B_{máx} a las 24.00 h (3.24 ± 0.3 fmol/mg de proteínas) fue significativamente mayor que a las 12.00 h (1.25 ± 0.15 fmol/mg de proteínas) ($p < 0.01$). En contraste, las constantes de disociación no presentaron diferencias significativas entre ambos horarios (87 ± 12 pM para las 24.00 h y 95 ± 10 pM a las 12.00).

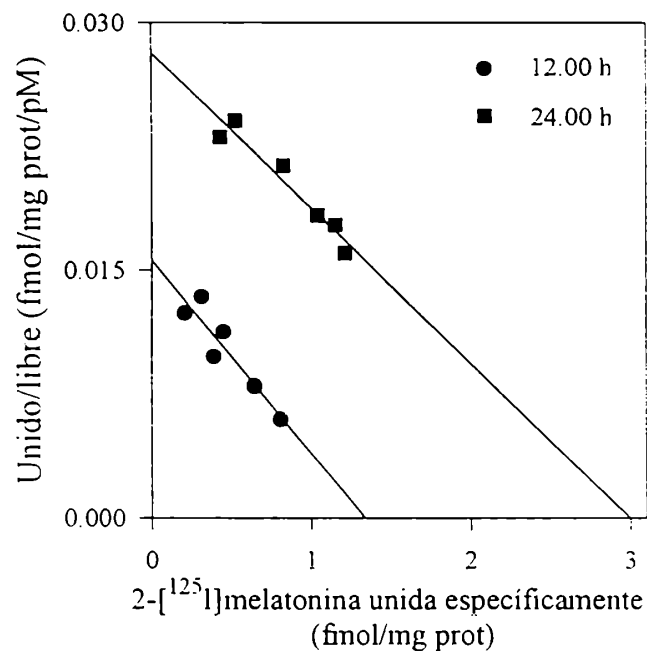


Fig 37. Análisis de Scatchard de la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina de hámster dorado. Los animales se sacrificaron a las 12.00 y 24.00 h, las retinas se extrajeron y se trataron como se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa la media de triplicados de un experimento representativo de tres. Se utilizaron

6-8 animales por grupo. En este experimento los valores de K_d fueron 90.5 pM a las 12.00 h y 106.6 pM a las 24.00 h. Los valores de B_{\max} fueron 1.39 fmol/mg de prot. a las 12.00 h y 3.00 fmol/mg de prot. a las 24.00 h. Los valores de K_d no presentaron diferencias significativas. La B_{\max} a las 24.00 h fue significativamente mayor que la correspondiente a las 12.00 h. ($p < 0.01$, test de Student). Las medias y los ES. de los K_d y B_{\max} para $n=3$ se incluyen en el texto.

DISCUSIÓN

I. BIOSÍNTESIS DE MELATONINA EN LA RETINA.

La síntesis y el rol fisiológico de la melatonina en la retina del hámster dorado, considerado el modelo clásico para el estudio de la melatonina pineal, han sido relativamente poco examinados. Por consiguiente, en una primera etapa, este trabajo de tesis tuvo como objetivo obtener evidencias que indicaran la producción retiniana de melatonina y estudiar aspectos vinculados a la regulación de la biosíntesis del metoxiindol en la retina de esta especie.

La primera serie de experimentos que se muestran en la sección de Resultados (figura 1), indica que en la retina del hámster dorado, existen variaciones diarias significativas en el contenido del metoxiindol durante el ciclo de 24 horas, con valores máximos en la segunda mitad de la noche. La existencia de variaciones diarias en el contenido de melatonina, con valores máximos nocturnos, en paralelo a variaciones diarias de la NAT había sido previamente descrita en retinas de diversas especies de vertebrados (Bubenick et al, 1978; Pang et al., 1980, 1981b, 1983; Binkley et al., 1979). Sin embargo, en estudios previos en el hámster dorado, Beck y Pévet (1984) no detectaron variaciones diarias en el contenido de melatonina retiniana, cuantificado por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa. La discrepancia con los resultados descritos podría deberse a que estos autores utilizaron una más baja frecuencia de muestreo y además extrajeron las retinas de los animales sacrificados en la fase de oscuridad, en condiciones de luz brillante, afectando quizás de esta manera los niveles de melatonina.

En la retina del hámster dorado, el contenido de AMPc presentó variaciones diarias significativas durante el ciclo de luz-oscuridad, como se observa en la figura 2. Los niveles del nucleótido aumentaron luego del apagado de la luz y alcanzaron valores máximos a las 02.00 h. El pico en el contenido retiniano de AMPc precedió en dos horas, al valor máximo observado para los niveles de melatonina (04.00 h). Existen múltiples evidencias experimentales que indican que la expresión génica de la NAT es dependiente de AMPc (Iuvone y Besharse, 1986; Nowak y Zawilska, 1994). El hecho de que el valor máximo en el contenido de AMPc precede al incremento máximo en los niveles de melatonina, sugiere la existencia de una relación

causal entre ambos parámetros en la retina del hámster, de manera similar a lo descrito en la glándula pineal.

La existencia de variaciones diarias en el contenido de melatonina y AMPc, no constituyen por sí mismas evidencias contundentes de la producción local de melatonina en la retina del hámster, ya que la presencia del metoxiindol en este tejido podría, alternativamente, ser consecuencia de la entrada de melatonina por vía sistémica, a partir de la secreción pineal. De hecho, el ritmo de melatonina retiniana en el hámster dorado no difiere significativamente del ritmo observado en la pineal de la misma especie (Maywood et al., 1993). Sin embargo, los resultados representados en la figura 3, indican que la pinealectomía en hámsteres no suprime los niveles retinianos de melatonina, aún cuando se ha descrito, en repetidas oportunidades, que la ablación pineal, en diversas especies de mamíferos incluyendo al hámster dorado, reduce el contenido plasmático del metoxiindol a niveles indetectables (Yu et al., 1981; Pang et al., 1985; Maywood et al., 1993).

En los hámsteres pinealectomizados el ritmo en el contenido de melatonina retiniana presentó una acrofase desplazada, respecto al descrito para los animales con operación simulada. El valor máximo en el contenido de melatonina retiniana, en los animales pinealectomizados, ocurrió durante la noche temprana, mientras que en los SHAM se observó en la noche tardía, de manera análoga a lo descrito para los animales intactos. Por otra parte, el contenido de melatonina en los animales pinealectomizados fue significativamente mayor que en los animales con operación simulada. Un aumento similar en los niveles retinianos de melatonina se ha descrito en ratas, un mes después de la pinealectomía. En condiciones agudas, en cambio, la pinealectomía no afecta los niveles de melatonina retiniana, en diversas especies (Underwood et al., 1984; Yu et al., 1981; Reiter, 1983). El incremento, observado 3 semanas después de la ablación pineal, podría sugerir un mecanismo compensatorio de la melatonina retiniana. En este sentido, se ha postulado un efecto inhibitorio desde la pineal, sobre la producción del metoxiindol en la retina, mediado posiblemente a través de un mecanismo de retroalimentación negativa por melatonina sistémica (Yu, 1993).

Sin embargo, a pesar de que un mecanismo de estas características podría modular los niveles retinianos de melatonina, es improbable que se trate de la única señal que regula el contenido del metoxiindol durante el ciclo de 24 horas, ya que cuando los niveles plasmáticos de melatonina son bajos (durante la etapa de luz) los niveles retinianos también se encuentran disminuídos.

Existen relativamente pocos estudios sobre la síntesis de melatonina en retinas de mamíferos mantenidas *in vitro*. Se ha descrito síntesis del metoxiindol a partir de precursores marcados en retinas aisladas de trucha y rata (Cardinali y Rosner, 1971a; Gern y Ralph, 1979; Redburn y Mitchell, 1989), así como la liberación de melatonina producida *in vitro* a partir de precursores no radioactivos, en retinas de cobayo, en la línea celular Y79 de retinoblastoma humano y en ojos de *Xenopus* (Yu et al., 1982; Pierce et al., 1989; Cahill y Besharse, 1990). Estos trabajos demostraron concluyentemente la capacidad de la retina de estas especies de sintetizar melatonina. Los resultados presentados en este trabajo indican que la retina de hámster dorado aún en condiciones aisladas es capaz de producir melatonina en respuesta a la señal fótica (figura 4), dado que en presencia de oscuridad los niveles del metoxiindol son significativamente mayores que los niveles observados en las retinas incubadas en luz, o que los cuantificados previamente al período de incubación. Si el aumento en el contenido de melatonina se debiera exclusivamente a un oscilador endógeno, los niveles detectados a las 18.00 h (luego de un período de 8 h de incubación para animales sacrificados a las 10.00 h) deberían permanecer bajos, ya que el incremento en el contenido de melatonina en la retina de hámster *in vivo* ocurre durante la segunda mitad de la noche. En contraste, los resultados representados en la figura 4, indican que la oscuridad resultó un estímulo efectivo para incrementar el contenido de melatonina en el hámster.

El conjunto de resultados observados en animales pinealectomizados y en retinas *in vitro* demuestran en forma concluyente la capacidad de la retina del hámster dorado de sintetizar melatonina. Dado que la oscuridad indujo la síntesis de melatonina *in vitro* resulta probable que la producción del metoxiindol esté regulada por el estímulo fótico. Para evaluar esta hipótesis se

expuso a los animales a luz durante la noche y oscuridad durante el día. La exposición a luz de hámsteres durante la noche, resultó en la supresión del incremento nocturno en el contenido de melatonina retiniana (figura 5). La luz durante la noche provocó también, la supresión del incremento nocturno en los niveles de AMPc (figura 6). En cambio, la exposición de los animales a oscuridad durante el día, causó un incremento significativo en el contenido de melatonina y de AMPc retinianos, como se representa en las figuras 7 y 8. También en este caso, el valor máximo en el contenido de AMPc precedió al de melatonina.

Se ha descrito que, en fotorreceptores de pollo en cultivo, la despolarización por potasio incrementa la acumulación de AMPc y la actividad de la NAT. Este efecto podría estar mediado a través del influjo de calcio por canales dependientes de voltaje, dado que bloqueantes específicos de los canales de calcio de tipo L, inhiben el efecto estimulador de la oscuridad sobre la actividad de la NAT pero no modifican el efecto inductor de análogos del AMPc sobre la actividad enzimática (Avenida et al., 1990; Iuvone et al., 1991; Zawilska et al., 1992). De esta manera, los niveles elevados de AMPc durante la noche podrían ser el resultado de la despolarización de los fotorreceptores y la consecuente activación de canales de calcio dependientes de voltaje en el terminal sináptico (Stryer, 1987; Corey et al., 1984). El incremento en el contenido de AMPc podría inducir la síntesis de novo de la NAT o de alguna proteína regulatoria necesaria para su actividad. Adicionalmente, se ha descrito en fotorreceptores de pollo, que el AMPc y el Ca^{2+} aumentan la vida media de las moléculas enzimáticas preexistentes. (Alonso-Gómez e Iuvone, 1995).

Los niveles de melatonina y AMPc fueron cuantificados en retinas enteras, por consiguiente, no es posible establecer el tipo celular donde ocurren los fenómenos observados. Sin embargo, un amplio número de evidencias señalan a los fotorreceptores como el sitio más probable de síntesis de melatonina retiniana (Hall et al., 1985; Nowak et al., 1989; Skene, 1992; Cahill y Besharse, 1992). Además, dado que los fotorreceptores son el tipo celular más abundante en la retina de hámster, parece posible que los fenómenos descritos, ocurran primariamente en estas células.

En conjunto, estos resultados sugieren que la producción de melatonina en la retina del hámster dorado es principalmente regulada por el estímulo fótico. En este sentido, Pang y colaboradores describieron que además de la existencia de un ritmo endógeno de melatonina en la retina de algunos vertebrados no mamíferos, los niveles de melatonina retiniana son afectados por manipulaciones artificiales de la iluminación ambiental. En la retina del hámster, en coincidencia con lo observado en diversas especies de vertebrados, los niveles diurnos de melatonina retiniana se incrementan por efecto de la oscuridad y los niveles de melatonina durante la noche, disminuyen como consecuencia de la exposición a la luz (Pang et al., 1982; Pang et al., 1985; Pang et al., 1991). En experimentos *in vitro* en retinas de cobayo, la oscuridad incrementa significativamente la liberación de melatonina al medio de incubación (Yu et al., 1982). En base a estas evidencias, se ha sugerido que la oscuridad estimula, en tanto que la luz suprime la biosíntesis y secreción de melatonina por los fotorreceptores. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que el incremento en el contenido de melatonina, por exposición a oscuridad durante el día, no alcanza los niveles *in vivo* del metoxiindol observados durante la noche, en las retinas de hámsteres en fotoperíodo normal. Es posible que los niveles retinianos del metoxiindol sean paralelamente regulados por un oscilador endógeno sincronizable por el ciclo de luz-oscuridad, como se ha descrito en la retina de aves y ojos de *Xenopus*. En estas especies, el marcapasos intraocular (Ham y Menaker, 1980; Besharse e Iuvone, 1983; Underwood et al., 1988) parece estar asociado a la fotosensibilidad retiniana (despolarización e hiperpolarización de los fotorreceptores), en la regulación de la biosíntesis de melatonina local (Pang y Yew, 1979; Yu et al., 1982).

La presencia de osciladores circadianos en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) de mamíferos, ha sido concluyentemente demostrada (Menaker, 1982). Por otra parte, existen evidencias que postulan la existencia de relojes circadianos intraoculares (Remé et al., 1991). Cuando se examinó el contenido de melatonina retiniana en distintos intervalos del ciclo de 24 horas, en animales mantenidos durante tres días en oscuridad constante, este parámetro varió aparentemente en forma aleatoria (figura 9), indicando la ausencia de la participación de un oscilador circadiano endógeno,

en la regulación de este proceso. En contraste con estos resultados, Tosini y Menaker (1996) han demostrado recientemente la existencia de ritmos circadianos en el contenido de melatonina, en cultivos de retinas de hámster dorado incubadas a 27 °C. Esta ritmicidad fue resincronizable por cambios de fase del ciclo de luz-oscuridad (adelantos y retrasos) y persiste inalterada durante 5 ó 6 días de oscuridad constante *in vitro*. Los autores concluyen que la retina de mamíferos contiene un reloj circadiano que regula la biosíntesis local de melatonina en forma independiente del marcapasos localizado en los NSQ. Los valores de las concentraciones de melatonina detectadas en los estudios mencionados y los descritos en este trabajo se hallan dentro del mismo orden. Una posible explicación de la discrepancia entre nuestros resultados y el trabajo mencionado, es que nuestros estudios se basan en mediciones realizadas con el animal *in toto*, condición experimental en la que la expresión del reloj circadiano intraocular, podría ser influenciado por eferencias desde el sistema nervioso, por ejemplo desde el NSQ u otras áreas cerebrales, incluso desde el sistema nervioso autónomo, así como por señales sistémicas, de manera que la expresión del ritmo podría responder a múltiples factores de regulación. Es importante destacar que en experimentos realizados por varios grupos de investigación, no se había observado la existencia de ritmicidad circadiana en la síntesis de melatonina en retinas de mamífero incubadas a 37°C. El ritmo circadiano de este parámetro en la retina del hámster fue evidente sólo cuando las incubaciones se realizaron a 27 °C, probablemente debido a que las bajas temperaturas incrementan la viabilidad de las células retinianas en cultivo (Tosini y Menaker, 1996). Los autores argumentan, para otorgar una justificación fisiológica a este hallazgo, que el hámster es un animal que hiberna y por lo tanto, presenta en determinadas épocas del año, menor temperatura corporal. En contraste, los animales utilizados en este trabajo, adaptados a condiciones de fotoperíodo y temperatura constantes, presentan una temperatura corporal más elevada. Si bien existen evidencias que vinculan a la temperatura con la producción de melatonina retiniana (Shiu y Pang, 1985), no parece evidente que sea esta la explicación de la discrepancia.

Se ha propuesto que la dopamina participa de los mecanismos que median la señal luminosa para varios procesos fisiológicos retinianos,

incluyendo la regulación de la biosíntesis de melatonina (Iuvone, 1988). Evidencias previas indican que el efecto inhibitorio de la luz sobre la actividad de la NAT es bloqueado por antagonistas dopaminérgicos de tipo D₂, solamente en presencia de inhibidores de la fosfodiesterasa (Iuvone et al., 1987). Recientemente, se ha descrito que el incremento de actividad de la NAT inducido por la oscuridad o farmacológicamente, puede ser suprimido por agonistas dopaminérgicos de tipo D₄, a través de la inhibición de los niveles de AMPc inducidos por forskolina o por inhibidores de la fosfodiesterasa. Los agonistas dopaminérgicos no bloquean el efecto de análogos no hidrolizables del AMPc (Iuvone y Besharse, 1986b; Iuvone et al., 1990; Zawilska y Nowak, 1994a). Algunos antagonistas de la familia de receptores dopaminérgicos D-2, administrados intraocularmente a pollos adaptados a luz, inducen un marcado incremento de la actividad de la NAT retiniana y el contenido de melatonina (Zawilska y Nowak, 1994b). El efecto de la dopamina sobre los niveles de AMPc sensibles a la luz y la actividad de la NAT retiniana, parece ser, sin embargo, indirecto y ocurriría a través de un mecanismo todavía desconocido, puesto que agonistas de la familia de receptores D-2, a la que pertenecen los receptores D₂ y D₄ (Schwartz et al., 1992) no inducen inhibición directa de la adenilato ciclasa, ya que no modifican los niveles basales de AMPc (Zawilska et al., 1995).

Si bien la dopamina es considerada la principal señal regulatoria de la producción de melatonina en la retina, existen evidencias que postulan al GABA como un modulador adicional del contenido de melatonina retiniana. Los resultados, representados en la figura 10, indican que el GABA incrementa la producción de melatonina en retinas mantenidas *in vitro* durante 8 h en condiciones de luz. Este efecto está mediado a través de receptores gabaérgicos de tipo A, puesto que fue revertido por el antagonista específico bicuculina, en tanto que el agonista específico de tipo B, baclofen no tuvo efectos significativos. El 2-hidroxisaclofen, antagonista específico de los receptores GABA_B, no fue efectivo en bloquear el efecto gabaérgico sobre la producción de melatonina en la retina. Estos resultados se correlacionan con evidencias previas en mamíferos que sugieren que los receptores que median los efectos gabaérgicos, tanto a nivel del terminal de los fotorreceptores, como en las células amácrinas y bipolares de la retina de rata, corresponden a

receptores específicos para GABA de tipo A (Lam et al., 1978; Murakami et al., 1982a, 1982b; Tachibana y Kaneko, 1984; Kaneko y Tachibana, 1986; Wu, 1991; Qiang y Dowling, 1994). Otras evidencias indican que el baclofen no afecta la respuesta de las células bipolares en mamíferos, y en las células ganglionares sólo se han observado conductancias características de los canales asociados a los receptores de GABA_A (Lipton, 1989; Yeh et al, 1990).

Se ha descrito que agonistas del receptor gabaérgico, tanto de tipo A como B, administrados en la fase de luz en ojos de *Xenopus* incrementan la actividad de la NAT retiniana (Cahill et al., 1991). Existen varias evidencias que postulan al GABA como una señal intrarretiniana de adaptación a la oscuridad (Yazulla, 1986; Pierce y Besharse, 1988; Dearry y Burnside, 1986). Teniendo en cuenta, el efecto estimulador del GABA sobre la producción de melatonina en la retina, se consideró la posibilidad de que, la activación del sistema gabaérgico participara del efecto estimulador inducido por la oscuridad sobre este parámetro. Los resultados, representados en la figura 11, indican que el efecto estimulador de la oscuridad es suprimido por antagonistas gabaérgicos específicos del receptor GABA_A. En aves existen antecedentes que coinciden con estos resultados, dado que el bloqueante del canal de cloruro asociado al receptor de tipo A, picrotoxina, inhibe el incremento nocturno de la actividad de la NAT retiniana (Boatright e Iuvone, 1989a).

Una evidencia adicional a favor de esta hipótesis se obtendría al demostrar un aumento de la actividad gabaérgica inducido por la oscuridad. El método elegido para analizar este aspecto fue la técnica del radioreceptor por tratarse de un método específico y altamente sensible. La determinación del contenido de un neurotransmisor es a menudo un indicador pobre de la actividad neural del mismo. En particular en el caso del GABA, la determinación de los valores del contenido queda invalidada dado que pocos minutos después de la muerte del animal ocurre un aumento en este parámetro, debido a la rápida inhibición de la GABA transaminasa por anoxia, sin que se altere la actividad de la GAD. Por consiguiente un parámetro más apropiado, consiste en la determinación del "turnover" del transmisor (evaluando su acumulación por inhibición de la enzima de degradación) en

lugar del contenido. Como se representó en la figura 12, el "turnover" de GABA en la retina del hámster dorado varió significativamente en función del ciclo de 24 horas, con valores máximos nocturnos en el intervalo comprendido entre las 24.00 y las 08.00 h. El incremento en el "turnover" de GABA, determinado en condiciones *ex vivo*, precede por al menos 4 horas, al valor máximo observado en el contenido de melatonina retiniana durante el ciclo de luz-oscuridad. Teniendo en cuenta estos resultados, conjuntamente con el efecto estimulador gabaérgico sobre los niveles de melatonina en experimentos *in vitro*, sumado a la reversión del estímulo inducido por la oscuridad en presencia de antagonistas gabaérgicos, se sugiere una relación causal entre ambos parámetros y avala el posible rol del GABA como parte de la vía de señales que traducen la oscuridad a nivel retiniano.

Los experimentos que siguieron a estos resultados fueron realizados con el objeto de evaluar el mecanismo de acción del GABA en la producción de melatonina, en la retina del hámster. Contrariamente a lo esperado, dado el bien establecido rol del AMPc en la inducción de la biosíntesis de melatonina (Besharse et al., 1988; Iuvone et al., 1990; Zawilska y Nowak, 1992, 1994a), el neurotransmisor provocó una disminución significativa en el contenido acumulado de AMPc (figura 13). También en este caso, el receptor gabaérgico involucrado es de tipo A, puesto que, en coincidencia con lo descrito previamente, la acción del GABA fue bloqueada por bicuculina, mientras que el baclofen no tuvo efectos significativos. Si bien por estos resultados no puede descartarse un efecto del GABA sobre la fosfodiesterasa de AMPc, que en esta serie de experimentos se encontraba inhibida por la presencia de IBMX, las evidencias reunidas podrían sugerir un mecanismo alternativo en la inducción de la síntesis de melatonina que no involucra al AMPc.

Existen algunos antecedentes que involucran al GMPc como un modulador de la producción de melatonina en la retina. La administración intraocular de análogos del GMPc, incrementa significativamente la actividad de la NAT retiniana en pollos expuestos a la luz, 4 horas después de ser administrados. Sin embargo, los autores sugieren que podría estar mediado a través del AMPc, ya que análogos de ambos nucleótidos, administrados simultáneamente no fueron sinérgicos, a las dosis intraoculares administradas

(Nowak y Wawrocka, 1993). Considerando estos antecedentes y la hipótesis del sistema gabaérgico como parte de la vía de señales que transducen la oscuridad, se evaluó la posibilidad de que el efecto gabaérgico pudiera ocurrir a través de la activación de esta señal intracelular. Como se representó en la figura 14, el GABA incrementó el contenido de GMPc en retinas de hámster mantenidas *in vitro*, en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa. Este efecto fue antagonizado por bicuculina, en tanto que el agonista del receptor GABA_B, baclofen, no modificó este parámetro. Estas evidencias sugieren un efecto gabaérgico a través del receptor de tipo A, coincidiendo con lo observado para la modulación sobre el contenido de melatonina retiniana.

Con el objeto de convalidar el hecho de que un incremento en el contenido de GMPc es capaz de inducir la síntesis retiniana de melatonina en el hámster, se examinó el efecto de análogos del nucleótido sobre la producción del metoxiindol (representado en las figuras 15 y 16). Los análogos permeables del GMPc y menos sensibles a la hidrólisis por fosfodiesterasas, 8-Bromo-GMPc y dibutilil-GMPc, incrementaron el contenido de melatonina en retinas de hámster dorado, mantenidas *in vitro*, luego de 8 h de incubación, en condiciones de luz. Este intervalo coincide con el observado para el aumento en el contenido de melatonina durante el ciclo de 24 horas, que ocurre 8 h después del apagado de la luz. De hecho en un estudio posterior sobre el tiempo necesario para que el nucleótido induzca un incremento significativo sobre el contenido de melatonina indicó que son necesarias precisamente 8 h de incubación.

Otra evidencia indirecta que avala la existencia de un vínculo entre el contenido de melatonina y de GMPc en la retina de hámster dorado *in vivo*, es la presencia de variaciones diarias significativas en el contenido del nucleótido que aumentan después del comienzo de la fase de oscuridad, manteniéndose elevados a lo largo de la misma (figura 17).

El GMPc es una molécula clave en el mecanismo de fototransducción, regulada negativamente por la señal fótica (Stryer, 1987), de manera que las variaciones diarias en el contenido del nucleótido coinciden con lo esperado. Sin embargo, un ritmo en el contenido de GMPc en función de la hora del día no había sido descrito previamente. En concordancia con estas evidencias, la

exposición de los animales a luz durante la noche, causó una disminución de los niveles de GMPc a valores diurnos (figura 18) en forma análoga a lo observado para la melatonina.

Conjuntamente con el incremento en el contenido de melatonina inducido por análogos del GMPc en la retina del hámster, estas evidencias sugieren que los cambios en el contenido de GMPc podrían ser instrumentales en la regulación de la biosíntesis de melatonina. Estas consideraciones no atentan, en modo alguno, contra el bien establecido rol del AMPc como inductor clave de la síntesis de melatonina, sin embargo, abren la posibilidad de la existencia de múltiples mecanismos regulatorios de este proceso, en particular, teniendo en cuenta que el GABA, si bien produce una caída aparente en los niveles de este nucleótido, incrementa significativamente los niveles de melatonina retiniana. Por otra parte tanto el AMPc como el GMPc aumentan en forma significativa durante la oscuridad, en particular alcanzando valores máximos previos al incremento del metoxiindol lo cual podría sugerir la participación conjunta de ambos en la inducción de este proceso.

En condiciones de oscuridad, la liberación de glutamato desde los fotorreceptores o las células bipolares, podría inducir la liberación de GABA por las células amácrinas y quizás horizontales (Schwartz, 1987; Yazulla, 1986; Neal et al., 1992), que actuando a través de receptores específicos, probablemente de tipo A, podría estimular la síntesis de GMPc. De esta forma, un incremento en el contenido de GMPc en oscuridad podría aumentar la actividad gabaérgica, que a su vez, podría contribuir a mantener elevados los niveles del nucleótido. Esta serie de eventos podría prolongar la capacidad de adaptación a la oscuridad, que a su vez, de una manera compleja, no completamente elucidada, redundaría en un incremento de la melatonina retiniana, evidente durante la noche tardía. El GABA podría ser sinérgico con la oscuridad para mantener elevados los niveles de GMPc, en la retina de hámster, favoreciendo la síntesis de melatonina.

Alternativamente, dado que existen antecedentes que postulan la compartimentalización del GMPc en los fotorreceptores (de Azeredo et al., 1981; Cote y Brunnok, 1993) la oscuridad podría actuar directamente sobre un "pool" de GMPc que regula la corriente de oscuridad y a través del GABA

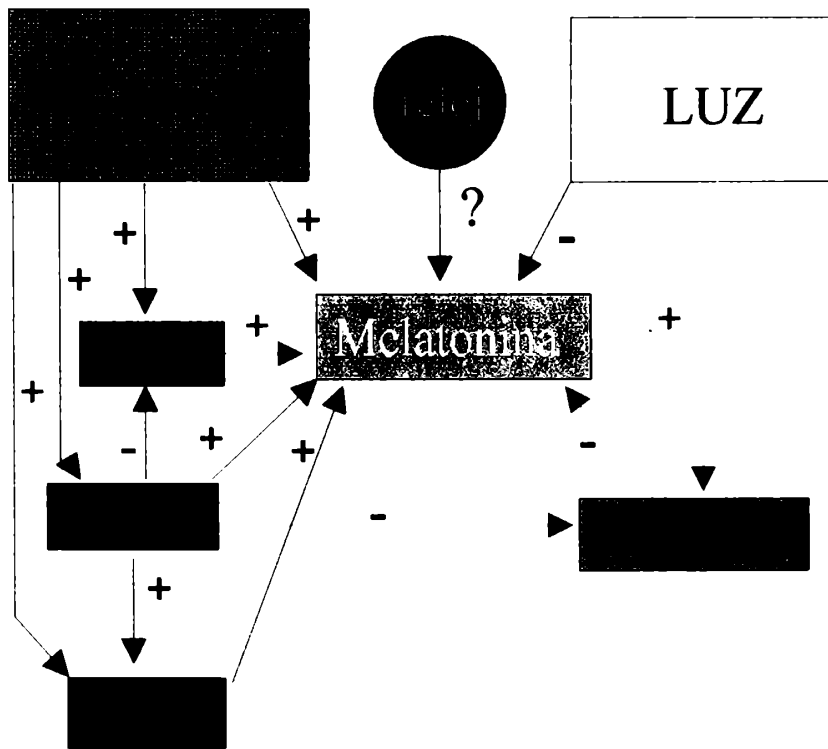
sobre otro "pool" del nucleótido cíclico responsable de la síntesis de melatonina retiniana.

Como se mencionara, la dopamina inhibe la producción de melatonina a través de la modulación negativa indirecta de la adenilato ciclasa en los fotorreceptores, que resulta en la disminución de los niveles de AMPc. Sin embargo, no se ha podido bloquear el estímulo de la oscuridad sobre los niveles de AMPc con agonistas dopaminérgicos. Por consiguiente, el GABA podría actuar en forma paralela, estimulando la síntesis de melatonina en oscuridad, a través de un mecanismo que involucra no exclusivamente la inhibición de la liberación de dopamina como se ha postulado. El efecto inhibitorio del GABA sobre el contenido acumulado de AMPc se observa en condiciones en que la degradación del nucleótido cíclico se encuentra inhibida, sin embargo, en condiciones fisiológicas este efecto podría no ser significativo sobre los niveles basales, o aún los resultantes de la activación de la adenilato ciclasa, o bien, el estímulo sobre la vía que involucra al GMPc podría compensar el resultado de la inhibición sobre el AMPc.

Los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo de tesis, indican que la retina de hámster es un sitio de síntesis activa de melatonina, que presenta variaciones diarias significativas en el contenido del metoxiindol, con valores máximos nocturnos, regulados principalmente por la señal fótica. El GABA podría estar involucrado en la inducción de la síntesis de melatonina como un intermediario de la señal de oscuridad, basado en la inhibición por antagonistas gabaérgicos del incremento nocturno en el contenido de melatonina. Este efecto gabaérgico podría estar mediado por un aumento en el contenido de GMPc, probablemente en el fotorreceptor. Cabe señalar que, las evidencias reunidas sugieren diferencias muy significativas en la regulación de la síntesis de melatonina en la glándula pineal y la retina. La biosíntesis de melatonina pineal está probadamente asociada a la actividad del oscilador endógeno en los NQS, en cambio, a nivel retiniano la melatonina parece responder fundamentalmente al estímulo fótico que, sin dudas, representa una información relevante para un transductor de luz-oscuridad como es la retina, o bien, a un oscilador local intraocular, según lo propuesto por Tosini y Menaker, que podría tener relevancia en la fisiología retiniana. Por otra parte, en la

glándula pineal se ha demostrado que la síntesis de melatonina es inhibida por GABA (Rosenstein et al., 1989), señal que resultó estimuladora sobre la melatonina retiniana. Por consiguiente, si bien los componentes fundamentales de este mecanismo biosintético son esencialmente similares en la glándula pineal y en la retina (de hecho ambas estructuras comparten características morfológicas y ontogénicas) los mecanismos regulatorios involucrados no parecen coincidir estrechamente.

Los resultados de la primera parte de este trabajo de tesis, junto con antecedentes de los mecanismos regulatorios de la biosíntesis de melatonina en la retina, se representan en el siguiente esquema:



Representación esquemática de los mecanismos regulatorios de la biosíntesis retiniana de melatonina.
 Las flechas rojas indican los mecanismos descritos previamente.
 Las flechas negras indican los mecanismos descritos en este trabajo de Tesis. Los efectos gabaérgicos están mediados por receptores de tipo A.

II. EFECTOS DE LA MELATONINA EN LA RETINA.

Los resultados sobre la regulación de la biosíntesis de melatonina en la retina, ponen de manifiesto un vínculo muy estrecho entre la melatonina retiniana y la oscuridad. Se planteó por consiguiente, la posibilidad de que el metoxiindol participara, a su vez, en la transducción de la señal luminosa.

Como ya se mencionara, la melatonina en concentraciones nanomolares incrementa la acumulación de GMPc, en el hipotálamo mediobasal de rata (Vacas et al., 1981) y estimula la actividad de la guanilato ciclasa en el testículo de la misma especie (Kano y Miyachi, 1976). Teniendo en cuenta, además, que el GMPc es clave en el procesado de la información fótica tanto a nivel de los fotorreceptores, las células bipolares que se despolarizan en respuesta a la luz, como de las células ganglionares, ya que regula las conductancias de canales catiónicos, responsables de la despolarización de estos tres tipos celulares (Pugh y Lamb, 1990; Nawy y Jahr, 1990; Ahmad et al., 1994), se consideró relevante examinar el efecto y el mecanismo de acción de la melatonina sobre este parámetro (tablas I a V y figuras 19 a 25).

La melatonina aumenta significativamente la acumulación *in vitro* de GMPc de manera dependiente del horario. El horario de mayor sensibilidad corresponde al intervalo comprendido entre las 24.00 y 04.00 h, ya que el metoxiindol tuvo efecto a partir de una concentración de 1 pM, en tanto a las 20.00 h fue también efectivo aunque con menor sensibilidad (umbral: 100 pM). El efecto de la melatonina no parece estar vinculado a las condiciones fóticas a la que los animales se encontraban expuestos, ya que fue efectiva tanto en luz (20.00 h) como en oscuridad (24.00 h) e inefectiva también en ambas condiciones (04.00 y 08.00 h, respectivamente). El hecho de que la melatonina sea efectiva en determinados intervalos y no en otros, podría estar relacionado con cambios diarios en la sensibilidad del tejido al metoxiindol, como se ha descrito para los efectos centrales de la melatonina pineal (Reiter, 1987). Alternativamente, dado que el contenido acumulado de GMPc *in vitro* en ausencia de melatonina presenta variaciones significativas entre los distintos horarios examinados, es posible que el sistema de GMPc presente diferente

susceptibilidad a la acción de la melatonina, que justifique la diferencia horaria en respuesta al metoxiindol.

Teniendo en cuenta el ya discutido efecto del GMPc sobre la síntesis de melatonina, la acción estimuladora del metoxiindol sobre este nucleótido, podría constituir la base de un mecanismo de retroalimentación positiva.

Considerando que estos ensayos se realizaron en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX), resulta probable que la actividad de guanilato ciclasa sea el blanco de acción de la melatonina. El metoxiindol incrementa la actividad guanilato ciclasa (representado en la tabla II) en los mismos horarios en que aumenta la acumulación de GMPc (a las 20.00 y 24.00 h), siendo inefectiva a las 12.00 y 06.00 h (horarios en los que tampoco modifica la acumulación de GMPc). La melatonina aumentó la actividad enzimática sólo con una concentración de 10 nM y aún en este caso el efecto fue pequeño, aunque significativo.

Es necesario señalar que la determinación de la actividad de guanilato ciclasa se realiza en presencia de todos los factores necesarios para una actividad enzimática máxima, algunos de los cuales, en condiciones fisiológicas, podrían ser limitantes para la síntesis del nucleótido cíclico en el ensayo de acumulación. La melatonina podría actuar modificando alguno de estos factores limitantes de la actividad de guanilato ciclasa. Este hecho podría explicar la aparente inefectividad del metoxiindol exógeno sobre la enzima a las 04.00 h, horario en el cual la acumulación de GMPc aumenta en respuesta a la melatonina. De hecho si se analiza la variación entre los niveles controles del contenido acumulado de GMPc y la actividad de guanilato ciclasa *in vitro*, no parece existir una correlación estrecha entre ambos parámetros, ya que, por ejemplo la actividad enzimática a las 20.00 h es significativamente mayor que a las 24.00 h, en tanto que los niveles de GMPc acumulados *in vitro* no difieren entre ambos horarios.

El análisis cinético de la actividad de guanilato ciclasa a las 24.00 h, demuestra que la melatonina incrementa tanto la K_m como la $V_{m\acute{a}x}$. El incremento en la $V_{m\acute{a}x}$ es compatible con los resultados obtenidos en el efecto del metoxiindol sobre la acumulación de GMPc. El aumento en la K_m sugiere en cambio, una disminución de la afinidad de la enzima por su sustrato. Sin

embargo, considerando que la determinación de la enzima se realiza en un homogenato de tejido, el valor de este parámetro cinético es aparente, de manera tal que su aumento podría reflejar un incremento en el contenido de sustrato endógeno o en la accesibilidad de éste a la enzima.

En estos experimentos quedó demostrado que la melatonina modifica significativamente la actividad de guanilato ciclasa retiniana. Con el objeto de examinar la existencia de una correlación fisiológica entre el aumento nocturno de la melatonina y la actividad de la guanilato ciclasa, se estudió la actividad enzimática en función del ciclo de 24 horas. La actividad de guanilato ciclasa varió significativamente en función de la hora del sacrificio, con valores nocturnos más elevados, excepto a las 04.00 h. A partir de estos resultados se infiere que las variaciones diarias de la actividad de guanilato ciclasa no parecen estar relacionadas con la ritmicidad diaria en el contenido de melatonina retiniana, ya que el aumento en la actividad de la enzima precede al incremento en los niveles del metoxiindol. El ritmo diario de actividad de guanilato ciclasa, en cambio, correlaciona con las variaciones en el contenido de GMPc.

Múltiples evidencias demuestran que el producto de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), el óxido nítrico (NO), posee una acción estimuladora sobre la actividad de la guanilato ciclasa de tipo soluble, resultando en un incremento en los niveles de GMPc (Vaccaro et al., 1991; Margulis et al., 1992; Yamamoto et al., 1993). Se ha sugerido que el NO a través de sus efectos locales, podría participar en el procesado de información visual en la retina. En este sentido, se ha descrito que el NO modula la transmisión desde los fotorreceptores a las neuronas retinianas de segundo orden, a través del aumento de una corriente de calcio dependiente de GMPc (Kureny et al., 1994). Se ha sugerido además, que el NO podría actuar sobre otros tipos celulares retinianos (como las células ganglionares) en las que activaría canales catiónicos dependientes del nucleótido (Ahmad et al., 1994). Dado que la melatonina incrementa el contenido de GMPc presumiblemente a través de la activación de la guanilato ciclasa, se estudió el efecto del metoxiindol sobre la actividad de la NOS. La melatonina en concentración 10 nM careció de efectos significativos sobre la actividad de la NOS a las 24.00 h. La elección

de este horario se basó en que este es el intervalo en el que la retina presenta mayor sensibilidad al metoxiindol. Los resultados descartan la participación del NO en el mecanismo de acción de la melatonina y podrían indicar que la guanilato ciclasa involucrada es de tipo particulada. Un mecanismo probable que involucra al calcio extracelular, será discutido en detalle más adelante.

Con el objeto de examinar la existencia de una acción acoplada de la melatonina sobre la síntesis y la degradación del nucleótido se realizaron los experimentos representados en las figuras 23 y 24. En primer lugar, se determinó el efecto del metoxiindol sobre el contenido de GMPc en ausencia de IBMX. Cuando se compara el efecto de la melatonina sobre el contenido de GMPc en presencia y en ausencia de IBMX, se observa que el efecto estimulador relativo al basal, es significativamente mayor en ausencia que en presencia del inhibidor de la enzima de degradación. Esta diferencia podría indicar que la melatonina afecta no solamente la síntesis sino también la degradación de GMPc. Por lo tanto, se examinó el efecto de la melatonina sobre la fosfodiesterasa de GMPc. Los resultados indican que la melatonina inhibe la actividad de esta enzima a las 24.00 h. Dado que la melatonina y el IBMX no mostraron efectos sinérgicos sobre la actividad de la fosfodiesterasa (el IBMX en ausencia o presencia de melatonina provoca una inhibición del 75%) se descarta la posibilidad de que el efecto estimulador de la melatonina sobre la guanilato ciclasa fuera consecuencia de una inhibición adicional de la melatonina sobre la fosfodiesterasa, ya parcialmente inhibida por la xantina.

Las variaciones diarias en el contenido de melatonina retiniana podrían regular los niveles de la actividad fosfodiesterasa (una molécula clave en el mecanismo de fototransducción) durante el ciclo de 24 horas. Con el objeto de evaluar esta hipótesis se examinó la actividad de fosfodiesterasa en función de la hora del día. La fosfodiesterasa no presentó variaciones diarias significativas durante el ciclo de luz-oscuridad. Este resultado en principio, análogamente a lo observado respecto al ritmo diario de actividad de guanilato ciclasa, parece descartar un vínculo fisiológico entre ambas enzimas con la melatonina retiniana.

Cabe señalar, sin embargo, que la demostración formal de un vínculo fisiológico entre la melatonina local y ambas enzimas requiere excluyentemente, examinar el efecto de un antagonista específico del metoxiindol sobre las actividades enzimáticas, de manera de evidenciar los efectos de la melatonina endógena. Hasta el presente, no se dispone de compuestos con probada acción inhibitoria de la melatonina necesarios para evaluar este aspecto. Por consiguiente, el efecto del metoxiindol local sobre estas enzimas retinianas no puede descartarse en forma concluyente.

El mecanismo de fototransducción implica la activación de una fosfodiesterasa específica de GMPc en los fotorreceptores (Stryer, 1987), por consiguiente, contrariamente a los resultados obtenidos resulta esperable una mayor actividad de la fosfodiesterasa en horarios de luz. Asimismo, las variaciones diarias en la actividad de guanilato ciclasa parecen oponerse también a lo esperado según el paradigma clásico, ya que en oscuridad las concentraciones elevadas de calcio intracelular, modularían negativamente la actividad de esta enzima (Kaupp y Koch, 1992). Por lo tanto cabría esperar una actividad de la guanilato ciclasa mayor en luz que en oscuridad. En contraste, la luz durante la noche disminuyó la actividad de guanilato ciclasa a los valores observados durante el día, en coincidencia con los resultados obtenidos para los niveles de GMPc, en tanto que la actividad de la fosfodiesterasa no mostró cambios significativos en estas condiciones.

Es importante destacar que todos los estudios que establecieron y corroboraron el paradigma del mecanismo de fototransducción, se realizaron sin excepción, en condiciones de adaptación de retinas o fotorreceptores aislados a oscuridad continua interrumpida por pulsos de luz en el orden de milisegundos a segundos (Woodruff y Bownds, 1979). En condiciones fisiológicas, en cambio, los animales están expuestos a la sucesión de períodos prolongados de luz (en el rango de horas), seguidos de fases de oscuridad de longitud comparable, llamada habitualmente fotoperíodo.

En las condiciones de fotoperíodo normal (14:10, L:O), la regulación de los niveles de GMPc y la actividad de las enzimas relacionadas, podrían proceder de manera diferente a lo observado durante tiempos muy cortos de

exposición a la luz. En este sentido, se ha descrito que los niveles de GMPc en condiciones de luz constante alcanzan niveles estacionarios, siendo su velocidad de síntesis similar a la de degradación de manera que el "turnover" de GMPc, más que sus niveles estacionarios, sería susceptible a los efectos de la luz (Kawamura y Murakami, 1986; Kondo y Miller, 1988).

En estudios recientes se ha descrito que el cambio en los niveles de calcio intracelular inducido ya sea por pulsos (milisegundos) o por luz incidente durante varios segundos, muestran patrones diferentes tanto en la amplitud como en el curso temporal (Gray-Keller y Detwiler, 1994). Por consiguiente, el patrón de cambio en los niveles de calcio citoplasmático durante tiempos prolongados (al cabo de horas) de exposición a condiciones de iluminación u oscuridad constantes, que pudiera explicar los cambios en la actividad de guanilato ciclasa, no puede predecirse.

Por otra parte, un mayor número de moléculas activas durante los horarios de oscuridad podría explicar el incremento nocturno observado en la actividad de esta enzima, a pesar de que cada molécula se encontrara menos activa debido a la mayor concentración de calcio intracelular. De hecho, el análisis cinético de la actividad de guanilato ciclasa, representado en la figura 21, indica que la $V_{m\acute{a}x}$ a las 24.00 h fue significativamente mayor que a las 12.00 h, en tanto que la K_m no se modificó.

El hecho de que la fosfodiesterasa responde a pulsos de luz en el orden de milisegundos, mientras permanece constante en presencia de horas de luz, seguidas de horas de oscuridad, podría deberse a la existencia de otros mecanismos, diferentes a los regulados directamente por el estímulo fótico. Estos resultados no descartan la existencia de múltiples ciclos de activación y desactivación, que no fueron resueltos por la escala temporal utilizada en los ensayos descritos. Sin embargo, es posible que en condiciones de iluminación ambiental continua, la retina procese la señal luminosa en forma diferente. En el largo plazo, la regulación de estos parámetros podría estar dada por un conjunto de factores sinérgicos aún no elucidados, más que por una señal única. De hecho, en estas condiciones, los niveles de GMPc parecen correlacionar mucho más estrechamente con la actividad de guanilato

ciclasa, en tanto que la actividad de fosfodiesterasa parece tener un rol menos relevante.

En conjunto los resultados discutidos muestran un efecto doble de la melatonina sobre el GMPc retiniano, incrementando su síntesis e inhibiendo su degradación, ambos resultantes en un incremento en los niveles del nucleótido.

Los eventos intracelulares desencadenados por la melatonina que pudieran explicar estos efectos quedan por ser examinados. Se ha demostrado que la melatonina inhibe la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ inducida por alto K^+ en sinaptosomas cerebrales (Vacas et al., 1984). La melatonina, a los 10 segundos de incubación, inhibió significativamente la captación de calcio en fracciones sinaptosomales crudas de retina de hámsteres sacrificados a las 24 horas (representado en la figura 28). Como ya se discutiera, la concentración elevada de calcio citoplasmático modula negativamente la actividad de la guanilato ciclasa de membrana y estimula la actividad de la fosfodiesterasa específica de GMPc (Koch y Stryer, 1988; Kawamura y Murakami, 1991). Por lo tanto, a través de la inhibición del influjo de calcio, la melatonina podría afectar en forma simultánea ambas actividades enzimáticas en el mismo sentido en que fueron observadas.

Como ya se mencionara, se ha propuesto que el GMPc se encuentra compartimentalizado en los segmentos externos de los fotorreceptores (de Azeredo et al., 1981; Cote y Brunnock, 1993), por consiguiente, es posible que el efecto de la melatonina sobre la concentración total de GMPc refleje cambios mayores o menores, en la región cercana a los canales catiónicos regulados por el nucleótido cíclico (Pugh y Lamb, 1990). Dada la superioridad numérica de los fotorreceptores respecto de otros tipos celulares, es posible que los cambios observados ocurran en este tipo celular. Sin embargo, no es posible descartar que la melatonina actúe en otras células retinianas, como en las células bipolares de tipo "on-center" y ganglionares retinianas en los que se ha descrito la existencia de canales catiónicos dependientes de GMPc (Ahmad et al., 1994; Nawy y Jahr, 1990).

Una continuación de esta serie de experimentos, fue examinar si el efecto descrito sobre el incremento de los niveles de GMPc retiniano trasciende a la liberación de glutamato a nivel sináptico, dado que tanto los fotorreceptores, como las células bipolares, liberan este transmisor a través de mecanismos que involucran la despolarización celular por flujos de corrientes catiónicas activadas por GMPc (Pugh y Lamb, 1990; Nawy y Jahr, 1990). A tal fin, se realizaron los experimentos representados en las figuras 26 a 32 y las tablas VI y VII, con el objeto de examinar el efecto de la melatonina sobre la transmisión glutamatérgica en la retina del hámster.

Los resultados indican que la melatonina incrementa tanto la captación como la liberación de ^3H -glutamato de manera dependiente de la concentración y del horario del sacrificio.

La melatonina con una concentración umbral de 100 pM incrementó significativamente la captación de ^3H -glutamato, a las 24.00 h pero no a las 12.00 h. El efecto de la melatonina sobre la captación de ^3H -glutamato fue independiente del calcio extracelular, cuya ausencia no afectó la captación del aminoácido en condiciones basales.

No existen enzimas extracelulares que degraden glutamato, por lo tanto, la acción del glutamato es terminada por difusión o por la recaptación en terminales neuronales y células gliales, a través de un "carrier" de alta afinidad, que co-transporta iones sodio y glutamato y contra-transporta iones potasio y oxhidrilos (Nicholls, 1993). Un transportador electrogénico de alta afinidad se ha descrito en los fotorreceptores retinianos de varias especies (Hertz, 1979; Marc y Lam, 1981; Eliasof y Werblin, 1993). La existencia de un transportador de glutamato de alta afinidad, se ha demostrado también en las células gliales, que constituye un mecanismo muy potente de regulación de los niveles del neurotransmisor en el espacio sináptico (Attwell et al., 1993). Sin embargo, otros autores demostraron que las células de Müller no captan ^3H -glutamato selectivamente, en retina de peces, (Marc y Lam, 1981) y poseen las más bajas concentraciones retinianas de glutamato endógeno, detectado por técnicas inmunocitoquímicas, en retina de tortuga y pez dorado (Ehinger et al., 1988; Marc et al., 1990). La discrepancia entre la potente captación de glutamato descrita para las células de Müller y la baja concentración

intracelular de glutamato detectada en este tipo celular, se debería a un rápido mecanismo de degradación glial del aminoácido, que es convertido en aspartato y glutamina (Marc et al., 1990). Los resultados obtenidos indican que un 70 % de la radioactividad liberada por las retinas corresponde a ^3H -glutamato intacto.

El mecanismo de recaptación de glutamato mantiene la concentración extracelular del transmisor dentro de ciertos límites, por consiguiente es posible que el mecanismo de recaptación se active en circunstancias en que la liberación del aminoácido se encuentre incrementada (Attwell et al. 1993; Nicholls, 1993). Sin embargo, el hecho que la melatonina aumente significativamente la captación de ^3H -glutamato, aún en ausencia de calcio extracelular (tabla VI), sugiere que este efecto no es consecuencia de un efecto primario sobre la liberación de glutamato.

La localización específica del efecto de la melatonina sobre la captación de glutamato no puede ser establecida, ya que el proceso fue examinado en la retina *in toto*. Existen muchas evidencias que sugieren que la melatonina podría actuar a través de las células amácrinas dopaminérgicas (Dubocovich, 1983; Boatright et al., 1994). Dado que los fotorreceptores son el tipo celular más abundante, parece factible que los efectos del metoxiindol ocurran sobre este tipo celular, aunque no es posible descartar un efecto sobre las células de Müller u otros tipos celulares, en particular sobre las neuronas dopaminérgicas.

Se desconocen los eventos intracelulares que podrían mediar el efecto de la melatonina sobre la recaptación de glutamato. Se ha demostrado que la despolarización produce, mientras que la hiperpolarización bloquea la captación de glutamato por células horizontales de tortuga (Schütte y Schlemmer, 1993). Asumiendo que una regulación de estas características podría operar en la retina del hámster y considerando que la melatonina incrementa el contenido de GMPc, podría especularse que el efecto de la melatonina sobre la captación de ^3H -glutamato podría estar mediado por la despolarización, inducida por el aumento en los niveles del nucleótido. Existen dos líneas de evidencias que avalan esta hipótesis, por un lado el efecto sobre

la captación de glutamato se observa a las 24.00 h, en coincidencia con el horario en que la melatonina incrementa el contenido de GMPc retiniano, siendo inefectiva a las 12.00 h sobre ambos parámetros. Por otra parte los análogos de GMPc incrementan la captación de ^3H -glutamato tanto a las 12.00 como a las 24.00 h, como se representó en la figura 30.

La melatonina, con la misma concentración umbral que para la captación del transmisor, incrementa de manera significativa la liberación de ^3H -glutamato a las 24.00 h, siendo también inefectiva a las 12.00 h en todas las concentraciones examinadas. El efecto de la melatonina sobre la liberación de glutamato es dependiente del calcio extracelular, ya que la ausencia del catión suprimió su efecto. La liberación de ^3H -glutamato en condiciones basales, es parcialmente reducida en ausencia de calcio extracelular, indicando la existencia de mecanismos de liberación dependientes e independientes de Ca^{2+} . En este sentido, se ha descrito que la despolarización de sinaptosomas cerebrales por alto potasio induce la liberación de glutamato, que en parte es liberado vesicularmente de manera dependiente de calcio extracelular y en parte a través de la reversión del mecanismo de recaptación (Adam-Vizi, 1992). La liberación de ^3H -glutamato que persiste en ausencia de calcio extracelular podría deberse a un mecanismo de esta naturaleza. La demostración directa de la reversión de la recaptación por despolarización ha sido descrita en células gliales (Attwell et al., 1993). La despolarización inducida por el aumento de GMPc en los fotorreceptores podría provocar la inversión del transportador de glutamato, sin embargo el efecto de la melatonina ocurre exclusivamente sobre la liberación de glutamato dependiente de calcio extracelular sugiriendo la naturaleza vesicular de este mecanismo.

En principio, podría suponerse que el efecto de la melatonina sobre la liberación de glutamato es una consecuencia del aumento en la captación del mismo. Sin embargo, la captación de ^3H -glutamato previa al ensayo de liberación, se realizó en ausencia de melatonina y luego de ser lavadas, las retinas se transfirieron a un medio en presencia del metoxiindol. Adicionalmente, el efecto de la melatonina sobre la liberación fue dependiente del calcio extracelular, en tanto que su efecto sobre la captación fue independiente del catión.

Dado que el efecto de la melatonina sobre la liberación de ^3H -glutamato fue suprimido en ausencia de Ca^{2+} extracelular, resulta probable que el mecanismo de acción del metoxiindol involucre un aumento en el influjo de calcio. La melatonina aumenta significativamente la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en fracciones sinaptosomales crudas de retina, de animales sacrificados a las 24.00 h, pero no a las 12.00 h, coincidiendo el horario de sensibilidad y la concentración umbral necesarios para estimular la liberación de glutamato (representado en las figuras 28 y 29). Este aumento resultó significativo luego de 20 minutos de incubación con melatonina. El efecto de la melatonina sobre el "uptake" de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ presentó un patrón bifásico; en el orden de segundos, como ya se mencionara, se observó una inhibición de este parámetro, a los 10 minutos no se produjeron modificaciones evidentes, en tanto que a los 20 minutos causó un incremento significativo. En contraste con estos resultados, estudios previos indicaron que la melatonina luego de 20 min inhibe la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ inducida por despolarización, en hipotálamo y sinaptosomas de cerebro de rata (Zisapel y Laudon, 1983; Vacas et al., 1984). Una explicación posible para esta diferencia reside en que la melatonina en la retina incrementa los niveles de GMPc, de esta manera, su efecto sobre la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, podría estar mediado por la despolarización inducida por este nucleótido o directamente por la entrada de calcio a través de los canales regulados por GMPc. De hecho, los análogos permeables del GMPc incrementaron en forma significativa, tanto la liberación y captación de ^3H -glutamato, como la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, indicando que el efecto de la melatonina sobre estos parámetros podría estar mediado a través del incremento en el contenido del nucleótido cíclico.

Esta hipótesis podría explicar incluso la mencionada curva bifásica observada para la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Una inhibición temprana de este parámetro podría ser suficiente para explicar, a través de un solo evento, los efectos de la melatonina sobre las enzimas de síntesis y degradación del GMPc, ambos resultantes en un incremento en los niveles del nucleótido. Este incremento podría a su vez, explicar el aumento en la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ que se observó sólo después de 20 min de incubación con el metoxiindol. Por

consiguiente, la secuencia de eventos inducida por la melatonina que finaliza en la liberación de glutamato, podría involucrar:

- 1) En forma inmediata, la inhibición del influjo de calcio, 2) la consecuente estimulación de la guanilato ciclasa e inhibición de la fosfodiesterasa. 3) el incremento de los niveles de GMPc, 4) la despolarización de los fotorreceptores debido a la corriente de oscuridad activada por el GMPc, en el segmento externo de los fotorreceptores, 5) la activación de canales de calcio dependientes de voltaje, 6) la inducción de la liberación vesicular de glutamato (McNaughton, 1990).

Alternativamente, se ha descrito que el GMPc activa directamente canales de calcio en el terminal del fotorreceptor de manera que la entrada del catión divalente por estos canales, cercanos a los sitios activos de liberación vesicular, podría provocar la exocitosis de las vesículas de glutamato (Rieke y Schwartz, 1994). En los conos de la salamandra este mecanismo permite el influjo de calcio y la liberación de neurotransmisor en un rango más amplio de voltajes. En contraste, el mecanismo de exocitosis en los bastones es inducido exclusivamente por influjo de calcio a través de canales dependientes de voltaje, que se inactivan a voltajes más hiperpolarizados que -45 mV (Rieke y Schwartz, 1994). La melatonina, a través del aumento en los niveles de GMPc, podría contribuir a que los fotorreceptores (en particular los conos) liberen glutamato en un rango más amplio de voltajes de membrana, aún cuando los canales de calcio dependientes de voltaje estuvieran inactivos, por ejemplo, en intensidades bajas de iluminación ambiental, en las que el potencial de membrana de los fotorreceptores no hubiera alcanzado el umbral necesario para la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes (-45 mV). Este efecto podría estar relacionado con el incremento de sensibilidad fótica retiniana descrito para la melatonina (Wiechmann et al., 1988; Arendt, 1995).

La caracterización farmacológica detallada de los canales de calcio involucrados en los efectos de la melatonina, así como la secuencia temporal de las acciones del metoxiindol sobre los distintos pasos mencionados más arriba, serían necesarias para la demostración formal de esta hipótesis.

Los efectos de la melatonina descritos en este trabajo fueron evidentes en concentraciones relativamente bajas, generalmente en el rango picomolar, compatible con la existencia de receptores específicos de alta afinidad descritos en diversos tejidos (Dubocovich, 1995). Por consiguiente, se examinó la existencia de sitios de unión específica de 2-[¹²⁵I]-melatonina en membranas de retina de hámster dorado, como se representó en las figuras 33 y 34.

En retinas de animales sacrificados a las 20.00 h, el análisis de Scatchard indica la presencia de unión específica de 2-[¹²⁵I]-melatonina, que corresponde a un único tipo de sitios de unión, con una constante de disociación de 98.3 pM. Estos resultados fueron corroborados por estudios del curso temporal de asociación y disociación del "binding" de 2-[¹²⁵I]-melatonina. La constante de disociación aparente, obtenida a partir de las constantes cinéticas (66.5 pM), correlaciona con la obtenida a través de los estudios de saturación. La unión resultó estable, saturable, reversible y de alta afinidad. Los valores de las constantes de disociación en el rango picomolar, obtenidas en estos estudios, correlacionan con los valores descritos para las retinas de diversas especies, así como para distintas áreas del cerebro de mamíferos (Dubocovich, 1995).

Como se mencionara en la introducción, se han descrito dos sitios de unión para 2-[¹²⁵I]melatonina (ML -1 y el ML-2) que se diferencian farmacológicamente y presentan distinto rango de afinidad por el radioligando (Dubocovich, 1988). La diferencia farmacológica más evidente entre estos dos sitios de unión, es que en membranas de cerebro de hámster (sitio ML-2) la melatonina y la N-acetil-5-hidroxitriptamina (NAS), son equipotentes en competir con la 2-[¹²⁵I]melatonina. En cambio, la melatonina es mucho más potente que la NAS, en desplazar al radioligando del sitio ML-1. El perfil farmacológico del sitio de unión a 2-[¹²⁵I]melatonina en la retina de pollo y conejo, presenta las características del tipo ML-1. Con la única excepción dada por la alta afinidad de la 6-hidroximelatonina por el sitio de unión a 2-[¹²⁵I]melatonina, mayor aún que la afinidad de la melatonina, el orden de afinidades de los distintos compuestos examinados, como se muestra en la tabla VIII, correlaciona, con el perfil farmacológico observado para las retinas de pollo y conejo (Dubocovich, 1995).

En membranas de cerebro, retina y pars tuberalis de varias especies, la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina es modulada por nucleótidos de guanina (Morgan et al., 1989a; Laitinen y Saavedra, 1990). Con el objeto de evaluar si estos afectan la unión específica de 2-[¹²⁵I]melatonina en membranas de retina de hámster, se analizó el "binding" específico del radioligando en presencia de distintas concentraciones de GTP, GDP, GMP y ATP, como se representó en la figura 35. Los nucleótidos de guanina GDP y GTP fueron equipotentes en inhibir la unión específica del radioligando, mientras que el GMP y el ATP, tuvieron una potencia tres órdenes de magnitud menor.

Se ha postulado, que el GTP y el GDP son equipotentes en disminuir la unión específica en receptores acoplados a proteínas de tipo G inhibitorias (Gi), mientras que el GDP es más potente que el GTP en receptores acoplados a proteínas de tipo G excitatorias (Gs). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el receptor a 2-[¹²⁵I]melatonina en membranas de retina de hámster, está acoplado a una proteína Gi.

En la pars tuberalis/eminencia media de hámsteres, cerebro de lagartijas y piel de anfibios, se han descrito efectos inhibitorios de la melatonina sobre la producción de AMPc inducida por forskolina. Estos efectos fueron bloqueados por toxina pertussis, sugiriendo que este receptor estaría acoplado a una proteína Gi (Carlson et al., 1989; Morgan et al., 1989a, b). La melatonina suprime la actividad de la adenilato ciclase en la retina de pollo (Niles et al, 1991), disminuye los niveles de AMPc estimulados por MSH en la piel de anfibios, así como el contenido de AMPc en el hipotálamo medio basal de rata (Vacas et al., 1981).

En retina de hámster dorado, la melatonina inhibió significativamente el contenido acumulado de AMPc, en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa (representado en la tabla IX). El efecto de la melatonina sobre el AMPc fue también dependiente del horario. El metoxiindol fue efectivo tanto a las 24.00 h (a partir de una concentración mínima de 1 pM) como a las 12.00 h, aunque con menor sensibilidad. En cambio, careció de efectos significativos sobre la acumulación de AMPc a las 04.00 h. Los efectos de la melatonina sobre ambos nucleótidos (AMPc y GMPc) ocurrieron con una sensibilidad mayor a las 24.00 h que en el resto de los horarios examinados. En contraste, a las 12.00 h, la melatonina fue efectiva sobre el AMPc, aunque no sobre el

GMPc, en tanto que a las 04.00 h ocurrió lo contrario. Esto podría deberse a diferencias horarias en la susceptibilidad de los sistemas que regulan los niveles de ambos nucleótidos, a la acción de la melatonina.

El AMPc regula ciertas funciones del metabolismo de los conos y bastones ligadas a los mecanismos de adaptación a la luz, aunque no ha sido involucrado directamente en el mecanismo de fototransducción. En este sentido, se ha descrito la participación del AMPc en la regulación del "turnover" de discos de membrana en bastones y en los movimientos retinomotores en los conos (Besharse et al., 1982). Altas concentraciones de AMPc podrían inducir la elongación de los conos, contrariamente al efecto descrito para la melatonina (Yu, 1993). Asimismo, se ha demostrado que el AMPc inhibe el mecanismo de fagocitosis (involucrado en el "turnover" de los discos de membrana) en los bastones de la retina de rata y rana, un efecto que se opone a la acción estimuladora de la melatonina sobre este proceso. En este sentido, el AMPc podría ser un mensajero intracelular de la acción de la melatonina. Sin embargo, en células fetales de epitelio pigmentario de pollo, otros autores describieron inhibición de la fagocitosis provocada tanto por la melatonina, como por el incremento de AMPc (Yu, 1993).

Por otra parte, dado el bien establecido rol del AMPc sobre la inducción de la NAT, la melatonina podría regular su propia síntesis a través de la disminución en el contenido de AMPc, por un mecanismo de retroalimentación negativa. De hecho, la variación diaria en el contenido de AMPc podría avalar esta regulación inhibitoria de la melatonina, dado que si bien el AMPc aumenta luego del apagado de la luz, lo que podría constituir la señal estimuladora para la síntesis del metoxiindol, los niveles del nucleótido declinan gradualmente durante la segunda mitad de la noche, quizás en respuesta al aumento de la melatonina. Nuevamente la validez de esta hipótesis queda relegada a la administración de un antagonista específico del metoxiindol.

Todos los efectos de la melatonina descritos a lo largo de este trabajo de tesis, mostraron una marcada sensibilidad diferencial en función de la hora del día. En general, la acción de la melatonina sobre los distintos parámetros es evidente al comienzo o durante la etapa nocturna, en tanto que durante el día o al final de la noche, la melatonina no presenta efectos significativos.

Los efectos de los análogos del GMPc sobre la captación y liberación de ^3H -glutamato y la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, fueron evidentes tanto a las 12.00 como a las 24.00 h (figuras 30 a 32), en tanto que la melatonina fue efectiva sólo durante la noche. Esto podría sugerir una sensibilidad diaria diferencial del tejido retiniano a la melatonina, más que a diferencias diarias en la susceptibilidad del sistema de señales intracelulares a la acción del metoxiindol. En este sentido, se han descrito variaciones diarias en los sitios de unión a 2-[^{125}I]-melatonina en diversos tejidos, tales como la pars tuberalis y el NSQ de rata (Gauer et al., 1993; Laitinen et al., 1989). En ambas estructuras el "binding" fue máximo al final del período de oscuridad.

En la retina de hámster dorado, como se representó en la figura 36, la unión específica de 2-[^{125}I]melatonina presenta variaciones diarias significativas entre todos los horarios examinados. La unión específica fue máxima a las 24.00 h y mínima a las 12.00 h. En contraste, en cerebro de rata y hámster, se ha descrito mayor densidad de receptores al final de la fase de luz (Vacas y Cardinali, 1979).

Se ha descrito una relación inversa entre los niveles plasmáticos de melatonina y sus receptores en la pars tuberalis y el NSQ. La iluminación constante y/o la pinealectomía (dos situaciones que conducen a la supresión del ritmo de melatonina plasmática) induce un aumento en el número de sitios de unión al metoxiindol, sugiriendo la regulación de los receptores por su ligando (Gauer et al., 1992a, b, 1993). Una situación similar se observa en la retina de hámster, puesto que los sitios receptores decrecen a las 04.00 h, coincidiendo con niveles máximos del metoxiindol. A pesar de que los niveles de melatonina se encuentran bajos a lo largo de la etapa diurna, el incremento en el número de sitios receptores no se observa hasta el inicio de la noche. Esto podría deberse a una cinética más lenta de incremento que de disminución, en el número de receptores que resulta en un valor máximo a las 24.00 h, en coincidencia con el período más prolongado transcurrido desde el pico nocturno de melatonina.

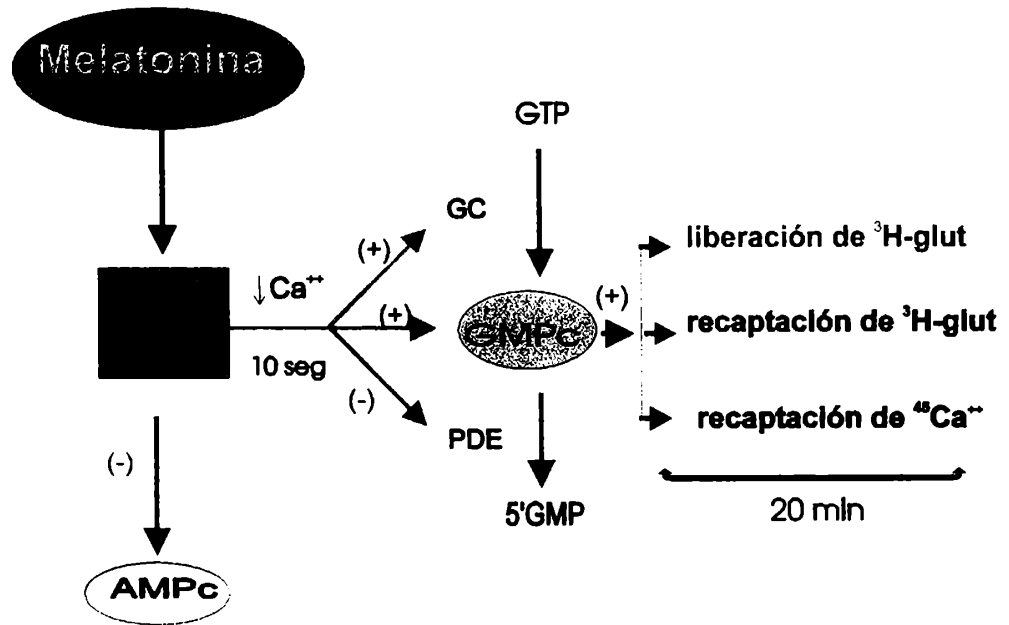
Por consiguiente, se sugiere que los sitios de unión a melatonina podrían ser regulados por mecanismos de "up y down-regulation" por el ligando endógeno. Se ha postulado que los receptores acoplados a proteína G, son susceptibles a mecanismos de esta naturaleza (Sibley y Lefkowitz, 1985). No se puede descartar, sin embargo, que la ritmicidad diaria en el número de receptores esté regulada, al menos en parte, por un componente de naturaleza circadiana endógena y que el ritmo de los sitios receptores como el de los niveles de melatonina retiniana sean dos procesos que fluctúan en forma independiente. Las variaciones en el número de sitios, no parecen deberse a un distinto grado de ocupación de los receptores por melatonina endógena, ya que las membranas fueron exhaustivamente lavadas antes del ensayo en cada punto horario y además porque la unión de 2-[¹²⁵I]melatonina difiere significativamente entre intervalos en que los niveles de melatonina endógena son similares.

En varias estructuras de cerebro de rata se han descrito cambios diarios en la densidad de los sitios de unión a melatonina, en el orden pico y nanomolar, sin cambios en los valores de Kd (Vacas y Cardinali, 1979; Zisapel et al., 1988; Laitinen et al., 1989; Yuang et al., 1990). En cambio, se ha descrito en los NSQ de rata un cambio de una fracción sustancial de los sitios de unión, de un estado de alta a uno de baja afinidad, al final del período de luz (Laitinen et al., 1989). En la retina del hámster dorado, la B_{máx} a las 24.00 h fue mayor que a las 12.00 h, sin cambios en la constante de disociación (figura 37). Esto sugiere que las variaciones diarias en la unión específica a 2-[¹²⁵I]melatonina están relacionadas con cambios en la densidad de los receptores.

La variación diaria en el número de sitios de binding a melatonina podría presumiblemente ser causante de la variación en la respuesta del tejido a la melatonina durante el ciclo de luz-oscuridad. Todos los efectos de la melatonina examinados en este trabajo, presentaron máxima sensibilidad a las 24.00 h, coincidiendo con el intervalo de mayor densidad de sitios de unión al metoxiindol. Teniendo en cuenta que la melatonina es efectiva en concentraciones compatibles con la afinidad de los sitios de unión a 2-[¹²⁵I]melatonina, junto con la relación temporal entre el "binding" específico de

este radioligando y los efectos biológicos de la melatonina, los sitios de unión específica en la retina del hámster dorado podrían ser considerados verdaderos receptores.

Se muestra a continuación una representación esquemática de las evidencias obtenidas, en la segunda parte de este trabajo de tesis, sobre el rol fisiológico de la melatonina en la retina de hámster dorado.



Representación esquemática de los efectos de la melatonina en la retina del hámster dorado.

III. CONSIDERACIONES FINALES.

Ahora bien, ¿Cuáles son las posibles implicancias fisiológicas de la biosíntesis de melatonina en la retina de mamíferos?

Los receptores sensoriales son neuronas especializadas o células epiteliales que responden activamente a cambios ambientales. Cuando los cambios ambientales alcanzan valores umbrales para uno o algunos de los distintos tipos de receptores, estos responden ya sea activando o inhibiendo la actividad físico-química en: células receptoras, neuronas aferentes, neuronas en el sistema nervioso central, neuronas eferentes y órganos efectores. Este mecanismo clásico de procesado de la información y transmisión de señales depende necesariamente de las conexiones anatómicas del sistema nervioso.

Desde hace algunos años se ha propuesto un mecanismo diferente de procesado y transmisión de la información por los receptores sensoriales. En este modelo, estos receptores envían información directamente en forma de una hormona que sirve como una señal necesaria para modificar procesos físico-químicos en blancos remotos. Receptores sensoriales capaces de traducir la señal ambiental directamente en la secreción de una hormona han sido denominados células "senso-hormonales". Como es evidente, en este tipo de transmisión no se necesita la contigüidad anatómica de una vía neural. Una célula senso-hormonal posee las siguientes características: 1) es un receptor sensorial con características de transductor y codificador de estímulos específicos y 2) posee la capacidad de sintetizar una hormona cuya secreción varía en función de la cantidad o cualidad del estímulo. Basándose en los 5 tipos de receptores sensoriales, podrían existir 5 tipos de células senso-hormonales: mecanoendócrinas, termoendócrinas, quimioendócrinas, electroendócrinas y fotoendócrinas. Sin embargo hasta el presente, se ha caracterizado sólo el tipo celular fotoendócrino. Un ejemplo de estos son los fotorreceptores de peces (Pang et al., 1987) o pinealocitos de aves (Pang et al., 1989), células fotoendócrinas capaces de traducir las señales electromagnéticas en un "output" hormonal: la melatonina.

Las estrategias de regulación de la síntesis y secreción de una hormona por una célula senso-hormonal, implican un sensor para detectar los cambios en la señal ambiental, un controlador para generar los cambios correspondientes en la señal neural y el sistema controlado para producir los cambios en la síntesis y secreción de la hormona. Los sistemas hormonales tradicionales (por ejemplo el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal), utilizan el mecanismo de retroalimentación negativa como estrategia principal de control de la síntesis y secreción hormonal. En cambio, la anteroalimentación parece ser el mecanismo de control predominante en la regulación de la síntesis y secreción hormonal de las células senso-hormonales. Los fotorreceptores de peces y los pinealocitos de aves son transductores fotoendócrinos que liberan melatonina como la señal endócrina para el control fotoperiódico de variables fisiológicas. En este sistema, el factor regulatorio predominante es la iluminación ambiental. El "output " hormonal, la secreción de melatonina, proporciona al animal información precisa y predecible sobre el momento del día y/o la estación del año.

El sensor, el controlador y el sistema controlado en los sistemas hormonales más estudiados se localizan en diferentes tejidos. En las células senso-hormonales en cambio, los tres componentes del sistema de control se hallan dentro de la misma célula. Este tipo celular proporciona un sistema simple pero especial, para el estudio de los principios de homeostasis en los sistemas biológicos.

Durante el curso de la evolución ha existido una tendencia hacia el incremento de la participación del sistema nervioso central en la regulación de los procesos de transducción senso-hormonales. Esta tendencia puede ser ejemplificada por la evolución de las células secretoras de melatonina en vertebrados. El ejemplo más temprano está dado por los fotorreceptores de los peces, células fotoendócrinas simples cuya síntesis y secreción de melatonina es principalmente regulada por la luz ambiental. Más tarde, aparecen en la evolución los pinealocitos de las aves, células fotoendócrinas, en los que la síntesis de melatonina es directamente regulada por la luz y parcialmente regulada por el sistema nervioso central. Por último, los pinealocitos de mamíferos constituyen transductores fotoneuroendócrinos, en los que la

síntesis y secreción de melatonina se encuentra bajo el control del sistema simpático, sin influencia directa de la luz.

Como ya se mencionara la glándula pineal y la retina poseen características morfológicas y ontogénicas similares, que avalan la presunción de que la glándula pineal de mamíferos evolucionó a partir de órganos fotorreceptores. A pesar de que la melatonina pineal y la melatonina retiniana comparten ciertas características, los factores regulatorios de su biosíntesis y los roles fisiológicos en cada uno de estos órganos parecen haber evolucionado de manera diferente.

Dependiendo de su modo de acción la melatonina puede ser considerada una hormona que actúa sobre sitios remotos, o puede ejercer una acción local como un factor humoral, un neuromodulador y/o un neurotransmisor.

La función de la melatonina como hormona, factor humoral y neuromodulador ha sido demostrada en vertebrados (Pang et al., 1989; Reiter, 1987; Reiter y Pang, 1989; Dubocovich, 1983). Por ejemplo, en animales con ciclos reproductivos estacionales, el efecto primario ocurre a través de su acción sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. La presencia de sitios específicos de unión en el NSQ, la pars tuberalis y la hipófisis anterior, pero no en la glándula pineal, refuerzan el rol hormonal de la melatonina pineal (Vanecek et al., 1987; Reppert et al., 1988). En contraste, se ha sugerido que la melatonina en la retina juega probablemente un rol primario como neuromodulador local en las capas retinianas y el epitelio pigmentario (Dubocovich, 1988). De hecho, en condiciones fisiológicas normales, la retina de vertebrados superiores, no capta cantidades considerables de melatonina desde la circulación y tampoco libera cantidades significativas del metoxiindol hacia el torrente sanguíneo, dos observaciones que sostienen la hipótesis de su acción intrarretiniana (Remé et al., 1991).

Los fotorreceptores retinianos, por consiguiente, pueden ser considerados no solamente receptores sensoriales sino transductores fotoneuroendócrinos (exclusivamente en vertebrados inferiores en los que la melatonina retiniana contribuye a los niveles plasmáticos) o

fotoneurohumorales (en vertebrados en general) puesto que transducen la señal luminosa ambiental en una secreción neurohumoral de acción retiniana (Pang et al., 1991).

Considerando que en los fotorreceptores retinianos la síntesis de melatonina es estimulada primariamente por la oscuridad, el metoxiindol podría reforzar o mantener durante la segunda mitad de la noche (al menos en el hámster dorado) las señales que indican oscuridad a las células retinianas y/o contribuir con el proceso de adaptación a la ausencia de luz. Se ha descrito que la melatonina incrementa la sensibilidad de algunos tipos celulares retinianos. En este sentido, la melatonina liberada en oscuridad podría modificar la sensibilidad de las células retinianas, incluidos muy probablemente los mismos fotorreceptores, quizás incrementando la respuesta a luz muy tenue, efecto que podría ser muy relevante para un animal de hábitos nocturnos como el hámster dorado.

En el marco de esta línea de pensamiento y considerando las evidencias obtenidas en este trabajo de tesis, se postula la participación de la melatonina en el mecanismo de fototransducción o en otros mecanismos retinianos de procesamiento de la señal luminosa, a través de su rol como una señal "senso-parácrina" o "senso-autócrina", es decir que se sintetiza y libera primariamente en respuesta al estímulo sensorial y podría afectar en forma trascendente algunos aspectos de la fisiología retiniana.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Existen variaciones diarias significativas en el contenido de melatonina retiniana en el hámster dorado, con valores máximos en la segunda mitad de la noche.
2. Los niveles de AMPc retiniano presentan variaciones diarias significativas que correlacionan temporalmente con el ritmo en el contenido de melatonina, siendo regulados por la señal fótica de manera análoga a la melatonina. Estas evidencias avalan una relación causal entre ambos parámetros.
3. Las retinas en condiciones aisladas, poseen la capacidad de sintetizar melatonina.
4. La pinealectomía crónica no suprime el ritmo en el contenido de melatonina retiniana, provocando un incremento global y un adelanto horario en el aumento nocturno del metoxiindol.
5. La biosíntesis de melatonina tanto *ex vivo* como *in vitro* es principalmente regulada por la señal fótica ambiental.
6. La existencia de un ritmo circadiano de naturaleza endógena no resulta evidente a partir de los resultados presentados en este trabajo, dado que en condiciones de oscuridad constante, los niveles de melatonina retiniana fluctuaron azarosamente.
7. El GABA estimula la producción *in vitro* de melatonina en luz. El antagonista del receptor gabaérgico de tipo A, bicuculina, suprime este efecto. Asimismo, la bicuculina suprime el incremento en el contenido de melatonina inducido por oscuridad *in vitro*.
8. El "turnover" de GABA presenta variaciones diarias significativas con valores máximos nocturnos que preceden al incremento en el contenido de melatonina. Las evidencias reunidas sugieren que el GABA podría ser un mensajero intercelular en la regulación de la síntesis de melatonina inducida por oscuridad.
9. El GABA inhibe significativamente el contenido acumulado de AMPc. En cambio, la acumulación *in vitro* de GMPc es significativamente estimulada por el neurotransmisor.

10. Análogos permeables del GMPc incrementan el contenido de melatonina retiniana *in vitro*. Asimismo, los niveles de GMPc presentan variaciones diarias significativas con valores máximos nocturnos, que correlacionan temporalmente con la variación en el contenido de melatonina. Las evidencias descritas llevan a postular que el GABA incrementa significativamente el contenido de melatonina a través del aumento en los niveles de GMPc.
11. Entre los efectos retinianos del metoxiindol se observa un incremento significativo en los niveles de GMPc retinianos, a través de la estimulación de la síntesis y la inhibición de la degradación del nucleótido. Este efecto podría ser resultado de la disminución inmediata en la captación de calcio inducida por la melatonina.
12. En condiciones de fotoperíodo normal, la actividad de guanilato ciclasa presenta variaciones diarias significativas, con valores máximos nocturnos. En contraste la actividad de fosfodiesterasa no muestra cambios diarios significativos.
13. La melatonina incrementa significativamente el "uptake" y liberación de ^3H -glutamato, así como la captación de calcio (al cabo de 20 min) a las 24.00 pero no a las 12.00 h. Estos efectos son reproducidos por análogos permeables de GMPc, sugiriendo que la acción de la melatonina podría estar mediada a través del aumento en los niveles del nucleótido.
14. Los efectos de la melatonina son dependientes de la hora del día. En cambio, los efectos inducidos por análogos de GMPc sobre los mismos parámetros ocurrieron tanto a las 12.00 como a las 24.00 h.
15. Se describieron sitios de unión específicos a 2-[^{125}I]melatonina, de alta afinidad, que podrían estar acoplados a una proteína G inhibitoria. En este sentido, la melatonina disminuye significativamente la acumulación de AMPc. El AMPc podría actuar como un segundo mensajero de la melatonina y/o regular su síntesis por un mecanismo de retroalimentación negativa.
16. Los sitios de unión específicos de alta afinidad a 2-[^{125}I]melatonina presentan variaciones diarias significativas, con un máximo a la medianoche y un mínimo al mediodía, horarios de alta y baja susceptibilidad retiniana a la acción del metoxiindol respectivamente.

17. La variabilidad horaria de la unión a 2-[¹²⁵I]melatonina, podría deberse a cambios significativos en la densidad de los sitios receptores, que probablemente resulten de mecanismos de "up y down regulation" inducidos por el ligando endógeno.

Yauwuf

JRE

ay

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, A., Hasehawa, M., and Ebihara, S. Measurement of circadian rhythms of ocular melatonin in the pigeon by in vivo microdialysis. *NeuroReport*. 7:286-288. 1995.
- Adam-Vizi, V. External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J. Neurochem*. 58:395-405. 1992.
- Agardh, E., Ehinger, B., and Wu, J. Y. GABA- and GAD-like immunoreactivity in the primate retina. *Histochemistry*. 86:485-490. 1987.
- Ahmad, I., Leinders-Zufall, T., Kocsis, J., Shepherd, G., Zufall, F., and Barnstable, C. Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activable by nitric oxide donors. *Neuron*. 12:155-165. 1994.
- Aldous, M., Francey, C., Wright, J., and Adrendy, J. Plasma concentration of melatonin in man following oral absorption of different preparations. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 19: 517. 1985.
- Alonso, R., Abreu, P. and Fajardo, N. Steroid influences on pineal melatonin production. Chapter 4. In Yu, H-S. and Reiter, R. J. (eds.). *Melatonin. Biosynthesis, Physiological effects, and clinical applications*. CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida. 1993.
- Alonso-Gómez, A. and Iuvone, P. Melatonin biosynthesis in cultured chick retinal photoreceptor cells: calcium and cyclic AMP protect serotonin N-acetyltransferase from inactivation in cycloheximide-treated cells. *J. Neurochem*. 65: 1414-1419. 1995.
- Arendt, J. Role of the pineal gland and melatonin in circadian rhythms. In Chapman and Hall (eds.). *Melatonin and the mammalian pineal gland*. University Press. Cambridge. 190-192. 1995.
- Armstrong, S. and Redman, J. In Yu, H-S. and Reiter, R. J. (eds.). *Melatonin and circadian rhythmicity*. *Melatonin. Biosynthesis, Physiological effects, and clinical applications*. CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida. 187-224. 1993.
- Attwell, D., Barbour, B., and Szatkowski, M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*. 11:401-407. 1993.
- Avendano, G., Butler, B., and Iuvone, P. K^{+} -evoked depolarization induces serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched retinal cell cultures. Involvement of calcium influx through L-type calcium channels. *Neurochem. Int*. 17:117-126. 1990.
- Axelrod, J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*. 184:1341. 1974.

- Axelrod, J., Quay, W. and Baker, P. Enzymatic synthesis of the skin-lightening agent, melatonin, in amphibians. *Nature*. 208:386. 1965.
- Baker, P. and Hoff, K. Melatonin localization in the eyes of larval *Xenopus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 39: 879-881. 1971.
- Baker, P. Development of 5-hydroxytryptophan decarboxylase in the brain, eye, and whole embryo of *Xenopus laevis*. *Neuroendocrinology*. 1:257-264. 1966.
- Baker, P., Quay, W. and Axelrod, J. Development of hydroxyindol-O-methyltransferase activity in the eye and brain of the amphibian *Xenopus laevis*. *Life Sci.* 4:1981-1987. 1965.
- Barnstable, C.J. Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3:520-525. 1993.
- Baylor, D. A. and Fuortes, M. G. F. Electrical responses of single cones in the retina of the turtle. *J. Physiol.* 207: 77-92. 1970.
- Baylor, D. A. Photoreceptor signals and vision. Proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 34-49. 1987.
- Baylor, D. and Fettiplace, R. Transmission from photoreceptors to ganglion cells in turtle retina. *J. Physiol.* 271:391-424. 1977.
- Beck, O. and Pévet, P. Analysis of melatonin, 5-methoxytryptophol and 5-methoxyindoleacetic acid in the pineal gland and the retina of hamster by capillary column gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 311:1-8. 1984.
- Benítez-King, G., and Anton-Tay, F. Binding of ³H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53:201-207. 1993.
- Bernasconi, R., Bittiger, H., Heid, J., Martin, P. Determination of GABA levels by a ³H-muscimol radioreceptor assay. *J. Neurochem.* 34:614-618. 1980.
- Besharse, J. and Dunis, D. Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: Activation of rod shedding. *Science*. 219:1341-1343. 1983.
- Besharse, J. and Iuvone, P. Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature*. 305:1341. 1983.
- Besharse, J. and Iuvone, P. Is dopamine a light-adaptive or a dark-adaptive modulator in retina? *Neurochem. Int.* 20:193-199. 1992.
- Besharse, J., Dunis, D. and Iuvone, P. Regulation and possible role of serotonin N-acetyltransferase in the retina. *Fed. Proc.* 43:2704-2708. 1984.

- Besharse, J., Iuvone, P., and Pierce, M. Regulation of rhythmic photoreceptor metabolism: A role for post-receptoral neurons. In *Progress in Retinal Research*. Osborne and Chader (eds.). Oxford, Pergamon Press. 21-61. 1988.
- Binkley, S. Circadian rhythms of pineal functions in rats. *Endocrinol. Rev.* 4:255. 1983.
- Binkley, S. Rhythms in ocular and pineal N-acetyltransferase: A portrait of an enzyme clock. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A:123-129. 1983.
- Binkley, S., Hryshchyshyn, M., and Reilly, K. N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland. *Nature.* 381:479-481. 1979.
- Binkley, S., Reilly, K. and Hryshchyshyn, M. N-acetyltransferase in the chick retina. I. Circadian rhythms controlled by environmental lighting are similar to those in the pineal gland. *J. Comp. Physiol.* 139:103-108. 1980.
- Blask, D. and Hill, S. Melatonin and cancer: basic and clinical aspects. In *Melatonin-Clinical Perspectives*. Miles, Philbrick, and Thompson (eds.). Oxford, University Press, New York. 128. 1988.
- Blazynski, C. and Dubocovich, M. Localization of 2[¹²⁵I]melatonin binding sites in mammalian retina. *J. Neurochem.* 56:1873-1880. 1991.
- Blazynski, C., Ferrendelli, J., and Cohen, A. Indoleamine-sensitive adenylate cyclase in rabbit retina: characterization and distribution. *J. Neurochem.* 45:4440. 1985.
- Boatright, J. and Iuvone, P. GABA and the regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in amphibian retina. I. Effects of GABA agonists and antagonists. *Neurochem. Int.* 15:541-547. 1989a.
- Boatright, J. and Iuvone, P. GABA and the regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in amphibian retina. II. The role of dopamine. *Neurochem. Int.* 15:549-554. 1989b.
- Boatright, J. and Iuvone, P. Regulation of endogenous dopamine release from frog retina by GABA-receptor agonists and antagonists. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31:334. 1990.
- Boatright, J., Hoel, M., and Iuvone, P. Evidence that light stimulates endogenous dopamine release and metabolism in retinas of frogs. *Soc. Neurosci. Abs.* 28: 1298. 1987.

- Boatright, J., Hoel, M., and Iuvone, P. Stimulation of endogenous dopamine release and metabolism in amphibian retina by light and K⁺-evoked depolarization. *Brain Res.* 482: 164-168. 1989.
- Boatright, J., Rubim, N., and Iuvone, P. Regulation of endogenous dopamine release in amphibian retina by gamma-aminobutyric acid and glycine. *Vis. Neurosci.* 11:1003-1012. 1994.
- Bok, D. Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions (Friedenwald Lecture), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 26, 1659. 1985.
- Bok, D. and Young, R. Phagocytic properties of the retinal pigment epithelium. In Zinn and Marmor (eds.). *The retinal pigment epithelium*. Boston, Harvard University. 148-174. 1979.
- Bolz, J., Frumkes, T., Voigt, T., and Wässle, H. Action and localization of gamma-aminobutyric acid in the cat retina. *J. Physiol. (London)*. 362:369-393. 1985.
- Bormann, J. and Feigenspan, A. GABAC receptors. *Trends Neurosci.* 18:515-519. 1995.
- Bormann, J. Electrophysiology of GABA A and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11:112-116. 1988.
- Bowery, N., Price, G., Hudson, A., Hill, D., Wilkin, G. and Turnbull, M. GABA receptor multiplicity. Visualization of different receptor types in the mammalian CNS. *Neuropharmacol.* 23:219-231. 1984.
- Brandon, C., Lam, D. M., and Wu, J. Y. The gamma-aminobutyric acid system in rabbit retina: Localization by immunocytochemistry and autoradiography. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 76:3557-3561. 1979.
- Bredt, D. and Snyder, S. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:682-685. 1990.
- Bubenik, G. and Purtil, R. The role of melatonin and dopamine in retinal physiology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58:1457-1462. 1980.
- Bubenik, G., Brown, G. and Grota, L. Differential localization of N-acetylated indolealkylamines in CNS and Harderian gland using immunohistology. *Brain Res.* 118:417-427. 1976.
- Bubenik, G., Brown, G., Uhlir, I. and Grota, L. Immunohistological localization of N-acetylindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Res.* 81:233-242. 1974.

- Bubenik, G., Purtil, R., Brown, G., and Grota, L. Melatonin in the retina and the harderian gland. Ontogeny, diurnal variations, and melatonin treatment. *Exp. Eye Res.* 27:323-333. 1978.
- Burnside, B. and Nagle, B. Retinomotor movements of photoreceptors and retinal pigment epithelium: mechanism and regulation. In *Progress in Retinal Research*. Osborne and Chader (eds.). Pergamon Press. New York. 67. 1983.
- Cahill, G. and Besharse, J. Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: Limitation by serotonin availability. *J. Neurochem.* 54:716-719. 1990.
- Cahill, G. and Besharse, J. Light-sensitive melatonin synthesis by *Xenopus* photoreceptors after destruction of the inner retina. *Vis. Neurosci.* 8:487-490. 1992.
- Cahill, G. and Besharse, J. Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2-dopamine receptors. *J. Neurosci.* 11:2959. 1991.
- Cahill, G., Grace, M., and Besharse, J. Rhythmic regulation of retinal melatonin : metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and the ocular circadian clock. *Cell Mol. Neurobiol.* 11:529. 1991.
- Cardinali, D. and Rosner, J. Metabolism of serotonin by the rat retina *in vitro*. *J. Neurochem.* 18:1769. 1971a.
- Cardinali, D. and Rosner, J. Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology.* 89:301-303. 1971b.
- Cardinali, D. Molecular biology of melatonin: assessment of the "Microtubule Hypothesis of Melatonin Action". In *Advances in the Biosciences*. Birau and Schloot (eds.). Pergamon Press Oxford and New York. Vol 29. 1980.
- Cardinali, D., Larin, F. and Wurtman, R. Action spectra for effects of light on hydroxyindole-O-methyltransferase in rat pineal, retina and Harderian gland. *Endocrinology.* 91:877-886. 1972.
- Cardinali, D., Nagle, C. and Rosner, J. Periodic changes in rat retinal and pineal melatonin synthesis. *Acta Physiol. Latinoam.* 24:91-92. 1974.
- Cardinali, D., Ritta, M., Fuentes, A., Gimeno, M., and Gimeno, A. Prostaglandin E release by rat medial basal hypothalamus *in vitro*. Inhibition by melatonin at submicromolar amounts. *Eur. J. Pharmacol.* 67:151-153. 1980.
- Cardinali, D., Rosenstein, R., Golombek, D., Chuluyan, H., Kanterewicz., B., Del Zar, M., and Vacas, I. Melatonin binding sites in brain: single or multiple? In

- Advances in Pineal Research. Arendt and Pévet (eds.). J. Libbey, London. 5: 159-166. 1991.
- Cardinali, D., Vacas, I., and Viter, E. Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology*. 105:437-441. 1979.
- Carlberg, C., Wiesenberg, I., and Schröder, M. Nuclear signal of melatonin. 2nd Locarno Meeting on: Neuroendocrinology Therapeutic Potential of the Pineal Hormone Melatonin. Abstracts. p.16. 1996.
- Carlson, L., Weaver, D., and Reppert, S. Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylate cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology*. 125: 2670-2676. 1989.
- Carr, R. E. and Siegle, I. M. , The retinal pigment epithelium in ocular albinism. In *The retinal pigment epithelium*. Zinn and Marmor (eds.), Harvard University Press. Cambridge, 413. 1979.
- Cassone, V., Lane, R. and Menaker, M. Melatonin-induced increases in serotonin concentrations in specific regions of the chicken brain. *Neuroendocrinology*. 42:28. 1986.
- Cassone, V., Warren, W., Brooks, D., and Lu, J. Melatonin, the Pineal Gland, and Circadian Rhythms. *J. Biol. Rhythms*.8: 73-81. 1993.
- Cheng, Y. and Prussoff, W. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108. 1973.
- Chèze, G. and Ali, M. Rôle de l' épiphyse dans la migration du pigment épithélial rétinien chez quelques téléostéens. *Can. J. Zool.* 54:475-481. 1976.
- Chiou, G., Aimoto, T., and Chiou, L. Melatonergic involvement in diurnal changes of intraocular pressure in rabbit eyes. *Ophthalmic. Res.* 17:373. 1985.
- Chow, P., Pang, S. and Yu, H. Release of N-acetylserotonin by the pineal and retina of rats *in vitro* and the effect of norepinephrine. *The Physiologist*. 23:144. 1980.
- Clerk, A. and Bennett, N. Activated cGMP Phosphodiesterase of retinal rods. *J. Biol. Chem.* 267:6620-6627. 1992.
- Cohen, M., Roselle, D., Chabner, B., Schmidt, T., and Lippman, M. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature*. 274:894-895. 1978.
- Corey, D., Dubinsky, J., and Schwartz, E. The calcium current in inner segments of rods from the salamander (*Ambystoma tigrinum*) retina. *J. Physiol.* 354:557-575. 1984.

- Cote, R. and Brunnock, M. Intracellular cGMP concentration in rod photoreceptor is regulated by binding to high and moderate affinity cGMP binding sites. *J. Biol. Chem.* 268:17190-17198. 1993.
- Cremer-Bartels, G. The effects of pteridines on multiple forms of hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the retina and the pineal gland. *Prog. Brain Res.* 52:231-239. 1979.
- Crews, K., Rodriguez, E., Yu, H., Tsin, A., and Wong, C. Comparison of the antiproliferative effects of melatonin, 5-fluorouracil and daunomycin on cultured human fetal retinal pigment epithelial (RPE) cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33:1413. 1992.
- Davson, H. *Physiology of the eye*, 5th. ed., Pergamon Press, New York. 1990.
- Daw, N., Brunken, W., and Parkinson, D. The function of synaptic transmitters in the retina. *Annu. Rev. Neurosci.* 12:205-225. 1989.
- de Azeredo, F., Lust, W., and Passonneau, J. Light-induced changes in energy metabolites, guanine nucleotides and guanylate cyclase within frog retinal layers. *J. Biol. Chem.* 256:2731-2735. 1981.
- Dearry, A. and Burnside, B. Dopaminergic regulation of cone retinomotor movement in isolated teleost retinas. II. Modulation by gamma-aminobutyric acid and serotonin. *J. Neurochem.* 46:1022-1031. 1986.
- Dearry, A. and Burnside, B. Light-induced dopamine release from teleost retinas acts as a light adaptive signal to the retinal pigment epithelium. *J. Neurochem.* 53. 870-878. 1989.
- Djamgoz, M. B. Diversity of GABA receptors in the vertebrate outer retina. *Trends Neurosci.* 18:118-120. 1995.
- Domino, S., Tubb, D., and Garbers, D. Assay of Guanylyl Cyclase Catalytic Activity. *Methods Enzimol.* 195:345-355. 1991.
- Dowling, J. and Ehinger, B. Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 180:203-220. 1978.
- Dowling, J. E. Information processing by local circuits: The vertebrate retina as a model system. In *The Neurosciences: Fourth Study Program*. Schmitt and Worden (eds.). Cambridge, Mass. : MIT Press. 163-181. 1979.
- Dowling, J. E. *The Retina: An approachable part of the brain*. Harvad University Press, Cambridge, Mass. 1987.

- Dubocovich, M. and Takahashi, J. Use of 2-[¹²⁵I]-melatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:3916. 1987.
- Dubocovich, M. Characterization of a retinal melatonin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234:395. 1985.
- Dubocovich, M. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J. Pharm. Exp. Therap.* 246:902. 1988b.
- Dubocovich, M. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature.* 306:782-784. 1983.
- Dubocovich, M. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends in Pharmacol. Sci.* 16:50-56. 1995.
- Dubocovich, M. N-acetyltryptamine antagonizes the melatonin-induced inhibition of [³H]-dopamine release from retina. *Europ. J. Pharmacol.* 105:193-194. 1984.
- Dubocovich, M. Pharmacological characterization of melatonin binding sites. *Adv. Pineal Res.* 3: 167-173. 1991.
- Dubocovich, M. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 2:2765. 1988.
- Dubocovich, M. Role of melatonin in retina. In Osborne and Cheder (eds.) *Progress in Retinal Research.* Pergamon Press. Oxford. 8:129. 1988a.
- Dubocovich, M., Shankar, G., and Mickel, M. 2-[¹²⁵I]-melatonin labels sites with identical pharmacological characteristics in chicken brain and chicken retina. *European J. of Pharmacol.* 162:289-299. 1989.
- Duncan, M., Takahashi, J., and Dubocovich, M. 2-[¹²⁵I]-melatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology.* 122:1825. 1988.
- Duncan, M., Takahashi, J., and Dubocovich, M. Characteristics and autoradiographic localization of 2-[¹²⁵I]melatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology.* 125:1011-1018. 1989.
- Ebadi, M. Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. Chapter 1. In *The Pineal Gland.* Reiter (ed.). Raven Press. New York. 1984.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M., and Reppert, S. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:6133-6137. 1994.

- Ehinger, B. and Dowling, J. Retinal neurocircuitry and transmission. In Bjoklund, Hokfelt, and Swanson (eds.). Handbook of Chemical Neuroanatomy. Elsevier science publishers. Amsterdam, New York. 5:389-446. 1987.
- Ehinger, B., Ottersen, O., Storm-Mathisen, J., and Dowling, J. Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:8321-8325. 1988.
- Eichler V. and Moore, R. 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. 1975.
- Eliasof, S. and Werblin, F. Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander. J. Neurosci. 13:402-411. 1993.
- Eliasof, S. and Werblin, F. GABA_A and GABA_B mediated synaptic transmission to cones in the tiger salamander retina. Invest. Ophthal. Vis. Sci. 30:163. 1989.
- Erickson, M. A., Robinson, P., and Lisman, J. Deactivation of visual transduction without Guanosine triphosphate hydrolysis by G protein. Science. 257:1255-1258. 1992.
- Fain, G., Gerschenfeld, H., and Quandt, F. Calcium spikes in toad rods. J. Physiol. Lond. 303:495-513. 1980.
- Feigenspan, A., Wässle, H., Bormann, J. Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. Nature. 361: 159-162. 1993.
- Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S, and Lyubarsky, A. L. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. Nature 313:310-313. 1985.
- Fonnum, F. Determination of transmitter amino acid turnover. In: Neuromethods, Amino Acids. Boulton, Baker, and Wood (eds.). 3:214-219. 1985.
- Fraser, S., Barrett, P., Djamgoz, M., and Morgan, P. Melatonin receptor mRNA expression in Xenopus oocytes: inhibition of G-protein activated response. Neurosci. Lett. 124:242-245. 1991.
- Freed, M., Nakamura, Y. and Sterling, P. Four types of amacrine in the cat retina that accumulate GABA. J. Comp. Neurol. 219:295-304. 1983.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M., and Pévet, P. Effect of constant light, pinealectomy and GTP-gamma-S on the density of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: A possible implication of melatonin action. J. Neuroendocrinol. 4:455-459. 1992b.

- Gauer, F., Masson-Pévet, M., and Pévet, P. Pinealectomy and constant light illumination increase the density of melatonin binding sites in the pars tuberalis of rodents. *Brain Res.* 575:32-38. 1992a.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M., Skene, M., Vivien-Roels, B., and Pévet, P. Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: Evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology.* 57:120-126. 1993.
- Gern, W. and Ralph, C. Melatonin synthesis by the retina. *Science.* 204: 183. 1979.
- Gern, W., Gorell, T., and Owen, D. Melatonin and pigment cell rhythmicity. *Adv. Biosci.* 29: 223-226. 1980.
- Gern, W., Owens, D. and Ralph, C. Persistence of the nycthemeral rhythm of melatonin secretion in pinealectomized or optic tract-sectioned trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Zool.* 205:371-376. 1978b.
- Gibson, C. A simple perfusion system for measuring endogenous retinal dopamine release. *J. Neurosci. Methods.* 32:75-79. 1990.
- Goldman, A. The pineal gland does not mediate phase shifts in the disc shedding rhythm of the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22:111-113. 1982.
- Goldman, A., Teirstein, P., and O' Brien. The role of ambient lighting in circadian disc shedding in the rod outer segment of the rat retina. *Invest. Ophthalmol.* 19:1257-1267. 1980.
- Gorczyca, W. A. Van Hooser, J. P., and Palczewski, K. Nucleotide inhibitors and activators of retinal Guanylyl Cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:855-861. 1994b.
- Gorczyca, W. A., Gray Keller, M. P., Detwiler, P. B., and Palczewski, K. Purification and physiological evaluation of a Guanylate Cyclase activating protein from retinal rods. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 9:4010-4018. 1994a.
- Grace, M., Cahill, G. and Besharse, J. Aryl acylamidase in ocular melatonin metabolism; distribution among vertebrate classes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:123. 1989.
- Grace, M., Cahill, G. and Besharse, J. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res.* 559:56. 1991.
- Graham, L. and Aprison, M. *Analyt. Biochem.* 15:487-497. 1966.

- Gray-Keller, M. and Detwiler, P. The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods. *Neuron*. 13:849-861. 1994.
- Grota, L. and Brown, G. Antibodies to indolealkylamines: Serotonin and melatonin. *Can. J. Neurochem.* 52:196-202. 1974.
- Grota, L., Holloway, W. and Brown, G. 24-hour rhythm of hypothalamic melatonin immunofluorescence correlates with serum and retinal melatonin rhythms. *Neuroendocrinology*. 34:363-368. 1982.
- Grünert, U. and Wässle, H. GABA-like immunoreactivity in the macaque monkey retina : A light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 297:509-524. 1990.
- Gurevich, V. V., Benovic, J. L. Visual Arrestin interaction with Rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light- activated phosphorylated Rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 268:11628-11638. 1993.
- Hall, F., Tengerdy, C., Morita, M., and Pautler, E. Determination of bovine retinal melatonin with HPLC-EC. *Curr. Eye Res.* 4:847. 1985.
- Hamm, H. and Menaker, M. Retinal rhythms in chicks: Circadian variations in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:4998-5002. 1980.
- Hauschild, D. and Laties, A. An indoleamine-containing cell in chick retina. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 12:537-540. 1973.
- Hertz, L. Functional interactions between neurons and astrocytes. 1. Turnover and metabolism of putative amino acid neurotransmitters. *Prog. Neurobiol.* 13:277-323. 1979.
- Hill, D. and Bowery, N. ³H-baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature (London)*. 290:149-152. 1981.
- Hollyfield, J. and Basinger, S. Photoreceptor shedding can be initiated within the eye. *Nature*. 274:794-796. 1978.
- Hsu, Y. T. and Molday, R. S. Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptors cells by Calmodulin. *Nature*. 361:76-79. 1993.
- Hubel, D. H. Eye, brain and vision. Scientific American Library, W. H. Freeman (ed.), serie # 22, New York. 1988.
- Iuvone, P. and Besharse, J. Cyclic AMP stimulates serotonin N-acetyltransferase activity in *Xenopus* retina *in vitro*. *J. Neurochem.* 46:33-39. 1986a.
- Iuvone, P. and Besharse, J. Dopamine receptor mediated inhibition of serotonin N-acetyltransferase activity in retina. *Brain Res.* 369:168. 1986b.

- Iuvone, P. and Besharse, J. Involvement of calcium in the regulation of serotonin N-acetyltransferase in retina. *J. Neurochem.* 46: 82-88. 1986c.
- Iuvone, P. and Besharse, J. Regulation of indoleamine N-acetyltransferase activity in the retina: effects of light and dark, protein synthesis inhibitors, and cyclic nucleotides analogs. *Brain Res.* 273:111. 1983.
- Iuvone, P. and Gan, J. Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures. *J. Neurochem.* 63:118-124. 1994.
- Iuvone, P. Dopamine: a light-adaptive modulator of melatonin synthesis in the frog retina. In *Dopaminergic mechanisms in vision*. Liss (ed.). New York. 95. 1988.
- Iuvone, P., Avendano, G., Butler, B. and Adler, R. 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. 1990.
- Iuvone, P., Boatright, J., and Bloom, M. Dopamine mediates the light-evoked suppression of serotonin N-acetyltransferase activity in retina. *Brain Res.* 418. 314-324. 1987.
- Iuvone, P., Gan, J., and Avendano, G. 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. 1991.
- Johnston, G., Curtis, D., Beart, P., Game, C., McCulloch, R. and Twitchin, B. Cis- and trans- 4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J. Neurochem.* 24:157-160. 1975.
- Kamp, C. and Morgan, W. GABA antagonists enhance dopamine turnover in the rat retina *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 69:273-279. 1981.
- Kamp, C. and Morgan, W. Some barbiturates enhance the effect of muscimol on dopamine turnover in the rat retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213:332-336. 1980.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. *Principles of Neural Science*. 3rd. ed., Appleton and Lange (eds.). Norwalk, Connecticut. 1991.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. Effects of γ -aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina. *J. Physiol. (London)*. 373: 443-461. 1986.
- Kano, R. and Miyachi, Y. Direct action of melatonin on testosterone and cyclic GMP production using rat testis tissue *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:969-975. 1976.

- Karn, C. An intensive investigation into the rhythmicity of melatonin in the trout retina (*Salmo gairdneri*) using immunohistochemistry and radioimmunoassay . Master thesis, University of Wyoming. Laramie. 1983.
- Kaupp, U. B. and Koch, K. W. Role of cGMP and Ca^{2+} in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* 54:153-175. 1992.
- Kawamura, S. and Murakami, M. Calcium-dependent regulation of cyclic GMP Phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. *Nature.* 349:420-423. 1991.
- Kawamura, S. and Murakami, M. In situ cGMP phosphodiesterase and photoreceptor potentials in Gecko retina. *J. Gen. Physiol.* 87:737-759. 1986.
- Kawamura, S. Rhodopsin Phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP Phosphodiesterase regulation by S-Modulin . *Nature.* 362:855-857. 1993.
- Kawamura, S., Hisatomi, O., Kayada S., Tokugana, F., Kuo C. Recoverin has S-Modulin activity in frog rods. *J. Biol. Chem.* 268: 14579- 14582. 1993.
- Kawamura, S., Takamatsu, K., and Kitamura, K. Purification and characterization of S-Modulin, a Calcium-dependent regulator on cGMP-Phosphodiesterase in frog rod photoreceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:411-417. 1992.
- Kazula, A., Nowak, J., and Iuvone, P. Regulation of melatonin and dopamine biosynthesis in chick retina: The role of GABA. *Vis. Neurosci.* 10:621-629. 1993.
- Kerr, D., Ong, J., Johnston, G., Abbenante, J. and Prager, R. Antagonism at GABA B receptors by saclofen and related sulphonic analogues of baclofen and GABA. *Neurosci. Lett.* 107:239-244. 1989.
- Kerr, D., Ong, J., Prager, R., Gynther, B. and Curtis, D. Phaclophen: A peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res.* 405: 150-154. 1987.
- Kitay, J. and Altschule, M. *The Pineal Gland.* Harvard University Press. Cambridge, MA. 56. 1954.
- Kiuchi, Y. and Gregory, D. Melatonin does not increase IOP in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33: 1116. 1992.
- Klein, D. Circadian rhythms in the pineal gland. In *Endocrine Rhythms.* Krieger (ed.). Raven Press. New York. 203-223. 1979.
- Klein, D. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In *Photoperiodism, melatonin and the pineal.* Chapter 38. Evered and Clark (eds.). Pitman, London. 1985.

- Koch, K. W. and Stryer, L. Highly cooperative feedback control of retinal rod Guanylate Cyclase by calcium ions. *Nature*. 334:64-66. 1988.
- Kolb, H. and Famiglietti, E. Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science*. 186:47-49. 1974.
- Kolb, H. and Nelson, R. Neural architecture of the cat retina. In *Progress in Retinal Res.* Osborne and Chader (eds.). Pergamon Press, Oxford. 3:21-60. 1984.
- Kondo, H. and Miller, W. Rod light adaptation may be mediated by acceleration of the phosphodiesterase-guanylate cyclase cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:1322-1326. 1988.
- Kopin, I., Pare, C. and Axelrod, J. 6-Hydroxylation, the major metabolic pathway for melatonin. *Biochem. Biophys. Acta*. 40:377. 1960.
- Kosaka, T., Kosaka, K., Hataguchi, Y., Nagatsu, I., Wu, J., Ottersen, O., Storm-Mathisen, J. and Hama, K. Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in various brain regions of the rat. *Exp. Brain Res*. 66:191-210. 1987.
- Koutalos, Y. and Yau, K. W. A rich complexity emerges in phototransduction. *Curr. Opin. Neurobiol*. 3:513-519. 1993.
- Kramer, S. Dopamine: A retinal neurotransmitter. I. retinal uptake, storage, and light-stimulated release of ³H-dopamine in vivo. *Invest. Ophthalm. Vis Sci*. 10:438-452. 1971.
- Krasovich, M. and Benson, B. Effects of melatonin on the retina of the golden Syrian hamster. *Anat. Rec*. 205. 102A. 1983.
- Krause, D. and Dubocovich, M. Melatonin receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 31:549-568. 1991.
- Krause, D. and Dubocovich, M. Regulatory sites in the melatonin system of mammals. *Trends Neurosci*. 13:464-470. 1990.
- Kuffler, S. W. Discharge patterns and functional organization of the mammalian retina. *J. Neurophysiol*. 16: 37-68. 1953.
- Kurenniy, D., Moroz, L., Turner, R., Sharkey, K., and Barnes, S. Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron*. 13: 315-324. 1994.
- La Vail, M. and Ward, P. Studies on the hormonal control of circadian outer segment disc shedding in the rat retina. *Invest. Ophthalmol*. 17:1189-1193. 1978.

- La Vail, M. Rod outer segment disc shedding in the rat retina: Relationship to cyclic lighting. *Science*. 194:1071-1073. 1976.
- Lagnado, L. and Baylor, D. Signal flow in visual transduction. *Neuron*. 8: 995-1002. 1992.
- Lagnado, L., Cervetto, L., and McNaughton, P. A. Calcium homeostasis in the outer segments of retinal rods from the Tiger Salamander. *J. Physiol. (Lond.)* 455:111-142. 1992.
- Laitinen J., and Saavedra, J. The chick melatonin receptor revisited: localization and modulation of agonist binding with guanine nucleotides. *Brain Res*. 528. 349-352. 1990a.
- Laitinen, J. and Saavedra, J. Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: Modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology*. 126:2110-2115. 1990b.
- Laitinen, J., Castren, E., Vakkuri, O., and Saavedra, J. Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nuclei. *Endocrinology*. 124:1585-1587. 1989.
- Lam, D., Lasater, E. and Naka, K. Gamma-aminobutyric acid : a neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75:6310-6313. 1978.
- Laudon, M. and Zisapel, N. Characterization of central melatonin receptors using [¹²⁵I]-melatonin. *FEBS Lett*. 197:9. 1986.
- Laudon, M. and Zisapel, N. Impact of circulating estradiol on melatonin binding sites in discrete areas of the female rat brain. *Brain Res*. 402:146-150. 1987.
- Lee, R. H., Ting, T. D., Lieberman B. S., Tobias, D. E., Lolley, R. N., Ho, Y. K. Regulation of retinal cGMP cascade by Phosducin in bovine photoreceptor cells. Interaction of Phosducin and Transducin. *J. Biol. Chem*. 267: 25104-25112. 1992.
- Leino, M., Aho, I., Kari, E., Gynther, J., Markkanen, S. Effects of melatonin and 6-methoxy-tetrahydro--carboline in light induced retinal damage: a computerized morphometric method. *Life Sci*. 35:1997-2001. 1984.
- Lerner, A. and Case, J. Pigment cell regulatory factors. *J. Invest. Dermatol*. 32:211. 1959.
- Lerner, A., Case, J. and Heinzelman, R. The structure of melatonin. *J. Am. Chem. Soc*. 81:6084. 1959.

- Lerner, A., Case, J., Takahashi, Y., Lee, T. and Mori, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80:2587. 1958
- Lipton, S. GABA-activated single channel currents in outside-out membranes patches from rat retinal ganglion cells. *Visual Neurosci.* 3:275-279. 1989.
- Long, K., Fisher, S., Fariss, R., and Anderson, D. Disc shedding and autophagy in the cone-dominant ground squirrel retina. *Exp. Eye Res.* 43:193. 1986.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., and Randall, R. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275. 1951.
- MacFarland, R., T. Molecular aspects of cyclic GMP signaling. *Zoological Science.* 12:151-163. 1995.
- Maguire, G., Maple, B., Lukasiewicz, P. and Werblin, F. Gamma-aminobutyrate type B receptor modulation of L-type calcium channel current at bipolar cell terminals in the retina of the tiger salamander. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:10144-10147. 1989.
- Marc, R. and Lam, D. Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:7185-7189. 1981.
- Marc, R., Liu, W., Kalloniatis, M., Raiguél, S., and Van Haesendonck, E. Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina. *J. Neurosci.* 10:4006-4034. 1990.
- Marc, R., Stell, W., Bok, D., and Lam, D. GABA-ergic pathways in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 182: 221-246. 1978.
- Margolis, D. and Lynch, R. Effects of daily melatonin injection on female reproduction in the white-footed mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44:530-537. 1981.
- Margulis, A., Sharma, R., and Sitaramayya, A. Nitroprusside-sensitive and insensitive guanylate cyclases in retinal rod outer segments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185:909-914. 1992.
- Masland, R. H. Amacrine cells. *Trends. Neurosci.* 11:405-410. 1988.
- Masland, R. H. Arquitectura funcional de la retina. *Investigación y Ciencia.* 125:56-66. 1987.
- Massey, S. and Redburn, D. Transmitter circuits in the vertebrate retina. *Prog. Neurobiol.* 28:55-96. 1987.

- Massey, S. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. In *Progress in retinal research*. Osborne and Chader (eds.). Oxford, England. Pergamon Press. 9:399-425. 1991.
- Massey, S., Blankenship, K. and Mills, S. Cholinergic amacrine cells in the rabbit retina accumulate muscimol. *Visual Neurosci.* 6:113-117. 1991.
- Matthews, G., Ayoub, G. and Heidelberger, R. presynaptic inhibition by GABA is mediated via two distinct GABA receptors with novel pharmacology. *J. Neurosci.* 14:1079-1090. 1994.
- Matthews, R. G., Hubbard, R., Brown, P. K. and Wald, G. Tautomeric forms of metarhodopsin. *J. Gen. Physiol.* 47:215-240. 1963.
- Maywood, E., Hastings, M., Max, M., Ampleford, E., Menaker, M., and Loudon, A. Circadian and daily rhythms of melatonin in the blood and pineal gland of free-running and entrained Syrian hamsters. *J. Endocrinol.* 136:65-73. 1993.
- McCord, C. and Allen, E. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 23:207. 1917.
- McNaughton, P. Light response of vertebrate photoreceptors. *Physiological Reviews.* 70:847-883. 1990.
- Menaker, M. The search for principles of physiological organization in vertebrate circadian systems. In *Vertebrate Circadian Systems, Structure and Physiology*. Aschoff, Daan, and Gross (eds.). Springer-Verlag. Berlin. 1. 1982.
- Menendez-Pelaez, A. and Reiter, R. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 15:59-69. 1993.
- Mennenga, K., Ueck, M., and Reiter, R. Immunocytochemical results with melatonin antiserum in the pineal gland and retina of the pigeon. In *Advances in Pineal Research*. Reiter and Lukaszyk (eds.). Libbey, London.4:69-74. 1990.
- Mennenga, K., Ueck, M., and Reiter, R. Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. *J. Pineal Res.* 10:159. 1991.
- Miller, A. and Schwartz, E. Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina. *J. physiol.* 334:325-349. 1983.
- Miller, L., Stier, M., and Lovenberg, W. Evidence for the presence of N-acetyltransferase in rat retina. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C:213. 1980.
- Moore, R. and Klein, D. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* 71:17. 1974.

- Moore, R. Organization of the primate circadian system. *J. Biol. Rhythms*. 8:3-9. 1993.
- Morgan, P., Lawson, W., Davidson, G., and Howell, H. Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology*. 50:359-362. 1989a.
- Morgan, P., Lawson, W., Davidson, G., and Howell, H. Melatonin inhibits cyclic AMP production in cultured ovine pars tuberalis cells. *J. Mol. Endocrinol.* 3:R5. 1989b.
- Mosinger, J. and Yazulla, S. Colocalization of GAD-like immunoreactivity and ³H-GABA uptake in amacrine cells of rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 240:396-406. 1985.
- Mosinger, J. and Yazulla, S. Double-label analysis of GAD- and GABA-like immunoreactivity in the rabbit retina. *Vision Res.* 27:23-30. 1987.
- Mull, D. and Ralph, C. A lightening factor in chicken retina. *Am. Zool.* 12:674. 1972.
- Mull, D. Chronobiochemical characterization of melatonin-like compounds in chicken and rats. Ph. D. dissertation, Univ. of Pittsburgh. 1975.
- Müller, B. Demonstration of neurons in the presumed rod pathway of the tree shrew retina. *J. Comp. Neurol.* 282:581-594. 1989.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E. and Watanabe, S. GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina. *Jpn. J. Physiol.* 32:927-935. 1982b.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E. and Watanabe, S. GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina. *Jpn. J. Physiol.* 32:911-926. 1982a.
- Nagle, C., Cardinali, D. and Rosner, J. Effects of castration and testosterone administration on pineal and retinal hydroxyindole-O-methyltransferases of male rats. *Neuroendocrinology*. 92:14-23. 1974.
- Nagle, C., Cardinali, D. and Rosner, J. Light regulation of rat retinal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) activity. *Endocrinology*. 91: 423-426. 1972.
- Nagle, C., Cardinali, D. and Rosner, J. Retinal and pineal hydroxyindole-O-methyltransferases in the rat: changes following cervical sympathectomy, pinealectomy or blinding. *Endocrinology*. 92: 1560-1564. 1973.

- Nakamura, Y., McGuire, B. and Sterling, P. Interplexiform cell in cat retina: identification by ^3H -aminobutyric acid and serial reconstruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:658-661. 1980.
- Nao-i, N., Nilsson, S., Gallemore, R., and Steimberg, R. Effects of melatonin on the chick retinal pigment epithelium: membrane potentials and light-evoked responses. *Exp. Eye Res.* 49:573. 1989.
- Nathans, J., and Hogness, D. S. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:4851-4855. 1984.
- Nawy, S. and Jahr, C. Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature.* 346:269-271. 1990.
- Neal, M., Cunningham, J., Hutson, P., and Semark, J. Calcium dependent release of acetylcholine and γ -aminobutyric acid from the rabbit retina. *Neurochem. Int.* 20:43-53. 1992.
- Newton, A. C. and Williams, D. S. Does Protein Kinase C play a role in Rhodopsin desensitization ? *Trends Biochem. Sci.* 18: 275-277. 1993.
- Nicholls, D. The glutamatergic nerve terminal. *Eur. J. Biochem.* 212:613-631. 1993.
- Nicholls, J. G., Martin, A. R., Wallace, B. G. *From Neuron to Brain*, 3rd. ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass. 1992.
- Niles, L. Melatonin inhibits adenylate cyclase activity in the rat brain, pineal, and retina. *J. Steroid. Biochem.* 20:1461. 1984.
- Niles, L., Wong, Y., Mishra, R., and Brown, G. Melatonin receptors in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 55:219-220. 1979.
- Niles, L., Ye, M., Pickering, D., and Ying, S. Pertussis toxin blocks melatonin - induced inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in the chick brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178:786-792. 1991.
- Noel, J. P., Hamm, H. E., Sigler, P. B. The 2.2 Å crystal structure of Transducin-complexed with GTPS. *Nature.* 366:654-663. 1994.
- Noell, W., Walker, V., Kang, B., and Berman, S. Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthal. Vis. Sci.* 5:450-473. 1966.
- Nowak, J. and Wawrocka, M. Intravitreal application of membrane-permeable analogs of cGMP increases serotonin N-acetyltransferase activity in retinas of light -exposed chicks. *Neurosci. Lett.* 162, 21-24. 1993.

- Nowak, J. and Zawilska, J. Signal transduction mechanisms related to melatonin biosynthesis and receptors in the vertebrate retina. In *Advances in Pineal Research*. Møller and Pévet (eds.). Libbey, London. 8:215-227. 1994.
- Nowak, J., Zurawska, E. and Zawilska, J. Melatonin and its generating system in vertebrate retina: circadian rhythm, effect of environmental lighting and interaction with dopamine. *Neurochem. Int.* 14:397-406. 1989.
- O' Hare, W. and Owen, W. Spatial organization of the bipolar cells receptive fields in the retina of the tiger salamander. *J. Physiol.* 421:223-245. 1990.
- O' Steen, W. and Lytle, R. Early cellular disruption and phagocytosis in photically-induced retinal degeneration. *Am. J. Anat.* 130:227-234. 1971.
- Ogino, N., Matsumura, M., Shirakawa, H., and Tsukahara, I. Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelial cells from chick embryo: inhibition by melatonin and cyclic AMP, and its reversal by taurine and cyclic GMP. *Ophthalmic Res.* 15:72. 1983.
- Ohguro H., Johnson, R. S., Ericsson, L. H., Walsh K. A., Palczewski K. Control of Rhodopsin multiple phosphorylation. *Biochemistry.* 33: 1023-1028. 1994.
- Olsen, R. and Venter, J. (eds.). *Benzodiazepine /GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties. Receptor Biochemistry and Methodology.* vol 5. A. R. Liss, New York. 1986.
- Olsen, R. W. and Tobin, A. Molecular biology of GABA A receptors. *FASEB J.* 4:1469-1480. 1990.
- Osborne, N. *In vitro* experiments on the metabolism, uptake, and release of 5-hydroxy-tryptamine in bovine retina. *Brain Res.* 184:283-297. 1980.
- Osborne, N., Nesselhut, T., Nicholas, D., Patel, S., and Cuello, A. Serotonin-containing neurones in vertebrate retinas. *J. Neurochem.* 39:1519-1528. 1982.
- Osborne, N., Patel, S., Beaton, D., and Neuhoff, V. GABA neurones in retinas of different species and their postnatal development in situ and in culture in the rabbit retina. *Cell Tissue Res.* 243:117-123. 1986.
- Pang, S., Liu, L., and Lee, P. The concept of direct sensori-hormonal transduction and melatonin secreting cells. In Reiter and Pang (eds.). *Advances in Pineal Research*. London. Libbey. 3:67-76. 1989.
- Pang, S. and Allen, A. Extra-pineal melatonin in the retina: its regulation and physiological function. *Pineal Res. Rev.* 4:55. 1986.

- Pang, S. and Yew, D. Pigment aggregation by melatonin in the retinal pigment epithelium and choroid of guinea-pigs, *Cavia porcellus*. *Experientia*. 35:231-232. 1979.
- Pang, S. Melatonin concentration on blood and pineal gland. In Reiter (ed.). *Pineal Research Reviews*. New York, Liss.3: 115-159. 1985.
- Pang, S., Brown, G., Campbell, S., Sniekus, V., de Silva, S., Young, S. and Grotta, L. Radioimmunoassay of N-acetylserotonin for biological tissues. *J. Immunoassay*. 2:263-276. 1981a.
- Pang, S., Brown, G., Grotta, L., Chambers, J., and Rodman, R. Determination of N-acetylserotonin and melatonin activities in the pineal gland, retina, Harderian gland, brain and serum of rats and chickens. *Neuroendocrinology*. 23:1-13. 1977.
- Pang, S., Chow, P., Wong, T. and Tso, E. Diurnal variations of melatonin and N-acetylserotonin in the tissues of quails (*Coturnix sp.*), pigeons (*Columba livia*), and chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 51:1-7. 1983.
- Pang, S., Lee, P., and Tang, P. Sensory receptors as a special class of hormonal cells. *Neuroendocrinology*. 53:2-11. 1991.
- Pang, S., Lee, P., Chan Y., and Ayre, E. Melatonin secretion and its rhythms in biological fluids. In Yu and Reiter (eds.). *Melatonin: Biosynthesis, Physiological effects, and Clinical applications*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 129-153. 1992.
- Pang, S., Ralph, C. and Reilly, D. Melatonin in the chicken brain: Its origin, diurnal variation, and regional distribution. *Gen. Comp. Endocrinol.* 22:499-506. 1974.
- Pang, S., Shiu, S. and Tse, S. Effect of photic manipulation on the level of melatonin in the retina of frogs (*Rana tigrina regulosa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 58:464-470. 1985.
- Pang, S., Woo, N., and Tang, P. Differential effects of bilateral enucleation on serum melatonin: Evidence for an endocrine retina in the fish and the hypothesis of a sensori-hormonal transducer. *Chinese J. Physiol. Sci.* 3:341-349. 1987.
- Pang, S., Yew, D. and Tsui, H. Photomechanical changes in the retina and choroids of guinea-pigs, *Cavia porcellus*. *Neurosci. Lett.* 10:221-224. 1978.
- Pang, S., Yu, H. and Tang, P. A diurnal rhythm of N-acetylserotonin in the retina of rats. *Neurosci. Lett.* 21:197-200. 1981b.
- Pang, S., Yu, H. and Tang, P. Regulation of melatonin in the retina of guinea-pigs: Effect of environmental lighting. *J. Exp. Zool.* 222:11-15. 1982.

- Pang, S., Yu, H., Suen, H. and Brown, G. Melatonin in the retina of rats. A diurnal rhythm. *J. Endocrinol.* 87:89-93. 1980.
- Pardridge, W. and Mietus, L. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 34:1761. 1980.
- Parkinson, D. and Rando, R. Evidence for a neurotransmitter role for 5-hydroxytryptamine in chick retina. *J. Neurosci.* 1: 1211-1217. 1981.
- Pévet, P., Balemans, M., Bary, F., Noordegraaf, E. The pineal gland of the mole (*Talpa europaea* L.) V. Activity of hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the formation of melatonin / 5-methoxytryptophol in the eyes and the pineal gland. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 18:259-264. 1978.
- Pévet, P., Balemans, M., de Reuver, G. The pineal gland of the mole (*Talpa europaea* L.) VII. Activity of hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the formation of 5-methoxytryptophan, 5-methoxytryptamine, 5-methoxyindole-3-acetic acid, 5-methoxytryptophol and melatonin in the eyes and the pineal gland. *J. Neural Transm.* 51:271-282. 1981.
- Pévet, P., Balemans, M., Legerstee, W., and Vivien-Roels, B. Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and Harderian gland of the golden hamster. *J. Neural Transm.* 49:229-245. 1980.
- Pierce, M. and Besharse, J. Circadian regulation of retinomotor movements. II. The role of GABA in the regulation of cone position. *J. Comp. Neurol.* 270: 279-287. 1988.
- Pierce, M. and Besharse, J. Melatonin and dopamine interactions in the regulation of rhythmic photoreceptor metabolism. In *Pineal and Retinal Relationships*. O'Brien and Klein (eds.). Academic Press. New York. 219. 1986.
- Pierce, M., Barker, D., Harrington, J., Takahashi, J. Cyclic AMP-dependent melatonin production in Y-79 human retinoblastoma cells. *J. Neurochem.* 53:307-310. 1989.
- Popova, J. and Dubocovich, M. Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J. Neurochem.* 64:130-138. 1995.
- Pourcho, R. and Goebel, D. Neuronal subpopulations in cat retina which accumulate the GABA agonist, ³H-muscimol: a combined Golgi and autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* 219:25-35. 1983.

- Pugh, E. and Lamb, T. Cyclic GMP and calcium: the internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors. *Vision Res.* 30:1923-1948. 1990.
- Pulido, O. and Clifford, J. Age-associated changes in the circadian rhythm of retinal N-acetylserotonin and melatonin in rats with pigmented eyes. *Exp. Gerontol.* 21:23. 1986.
- Quay, W. and McLeod, R. Melatonin and photic stimulation of cone contraction in the retina of larval *Xenopus laevis*. *Anat. Rec.* 160:491. 1968.
- Quay, W. Effects of melatonin in the eyes of male golden hamster. *Am. Zool.* 22:865. 1982.
- Quay, W. Increases in volume, fluid content, and lens weight of eyes following systemic administration of melatonin. *J. Pineal Res.* 1:3-13. 1984.
- Quay, W. Retinal and pineal hydroxyindole-O-methyltransferase activity in vertebrates. *Life Sci.* 4:983. 1965.
- Quian, H. and Dowling, J. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature.* 361:162-164. 1993.
- Ralph, C. Melatonin production by extra-pineal tissues. In Birau and Schloot (eds.). *Melatonin: current status and perspectives*. Pergamon Press. Oxford. 35-46. 1980.
- Redburn, D. and Mitchell, C. Darkness stimulates rapid synthesis and release of melatonin in rat retina. *Vis. Neurosci.* 3:391. 1989.
- Reiter, R. and Pang, S. *Advances in Pineal Research*. London. Libbey. 3. 1989.
- Reiter, R. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiologic interactions. *Endocr. Rev.* 12:151-180. 1991.
- Reiter, R. The melatonin message: Duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci.* 40:2119-2131. 1987.
- Reiter, R. The pineal gland. In DeGroot's *Endocrinology*. 2nd ed. DeGroot (ed.). Saunders, Philadelphia. 2:240. 1989.
- Reiter, R., Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Tan, D., Pablos, M., and Acuña-Castroviejo, D. The role of melatonin in the pathophysiology of oxygen radical damage. In Møller and Pévet (eds.) *Advances in Pineal Research*. 8: 403-412. 1994.
- Reiter, R., Richardson, B. and Hurlbut, E. Pineal, retinal and Harderian gland melatonin in a diurnal species, the Richardson's Ground Squirrel (*Spermophilus richardsonii*). *Neurosci. Lett.* 22:285-288. 1981.

- Reiter, R., Richardson, B., Matthews, S., Lane, S., and Ferguson, B. Rhythms in immunoreactive melatonin in the retina and Harderian gland of rats: persistence after pinealectomy. *Life Sci.* 32:1229-1236. 1983.
- Remé, C., Wirz-Justice, A., and Terman, M. The visual input stage of the mammalian circadian pacemaking system: I. Is there a clock in the mammalian eye? *J. Biol. Rhythms.* 6:5-29. 1991.
- Reppert, S. and Sagar, S. Characterization of the day-night variation of retinal melatonin content in the chick. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24:294-300. 1983.
- Reppert, S., Weaver, D., and Ebisawa, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 13:1177-1185. 1994.
- Reppert, S., Weaver, D., Rivkees, S., and Stopa, E. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science.* 242: 78-81. 1988.
- Rieke, F. and Schwartz, E. A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses. *Neuron.* 13:863-873. 1994.
- Rosenstein, R., Chuluyan, H., Pereyra, E. and Cardinali, D. Release and effect of γ -aminobutyric acid (GABA) on rat pineal melatonin production *in vitro*. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 9: 207-220. 1989.
- Roth, J., Gern, W., Roth, E., Ralph, C., and Jacobson, E. Non-pineal melatonin in the alligator (*Alligator mississippiensis*). *Science.* 210:548-550. 1980.
- Rudman, D. Injection of melatonin into cisterna magna increases concentration of 3', 5'- cyclic guanosine monophosphate in cerebrospinal fluid. *Neuroendocrinology.* 20:235-242. 1976.
- Rusak, B. The mammalian circadian system: Models and physiology. *J. Biol. Rhythms.* 4:121-134. 1989.
- Samples, J., Krause, G., and Lewy, A. Effect of melatonin on intraocular pressure. *Curr. Eye Res.* 7:649. 1988.
- Sarthy, P., Hendrickson, A., and Wu, J. L-glutamate: A neurotransmitter candidate for cone photoreceptors in the monkey retina. *J. Neurosci.* 6:637-643. 1986.
- Scatchard, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51:660-672. 1949.
- Schnapf, J. L. y Baylor, D. A. How photoreceptor cells respond to light. *Sci. Am.* 256 (4):40-47. 1987.

- Schütte, M. and Schlemmermeyer, E. Depolarization elicits, while hyperpolarization blocks uptake of endogenous glutamate by retinal horizontal cells of the turtle. *Cell. Tissue Res.* 274:553-558. 1993.
- Schwartz, E. Depolarization without calcium can release γ -aminobutyric acid from a retinal neuron. *Science.* 238: 350-355. 1987.
- Schwartz, J., Giros, B., Martres, M., and Sokoloff, P. The dopamine receptor family: molecular biology and pharmacology. *Neurosciences.* 4:99-108. 1992.
- Shiu, S. and Pang, S. Cold stress-induced changes in tissue melatonin levels of rodents. In Brown and Wainwright (eds.). *Pineal gland and its endocrine role.* Oxford Pergamon Press. 197-202. 1985.
- Sibley, D. and Lefkowitz, R. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature.* 317:124-129. 1985.
- Siuciak, J., Krause, D., and Dubocovich, M. Quantitative pharmacological analysis of 2-[125 I]-melatonin binding sites in discrete areas of the chicken brain. *J. Neurosci.* 11: 2855-2864. 1991.
- Skene, D. N-acetyltransferase and melatonin in the retina: regulation, function and mode of action. *Biochem. Soc. Transactions.* 20:2. 1992.
- Skene, D., Masson-Pévet, M., and Pévet, P. Characterisation of melatonin binding site in the pars tuberalis of the European hamster. *J. Neuroendocrinol.* 4:189-192. 1992.
- Slaughter, M. and Bai, S. Differential effects of baclofen on sustained and transient cells in the mudpuppy retina. *J. Neurophysiol.* 61:374-381. 1989.
- Slaughter, M. and Pan, Z. The physiology of GABA_A receptors in the vertebrate retina. Mize, Marc and Sillito (eds.). *Progress in Brain Res.* Elsevier Sciences publishers. 90:47-60. 1992.
- Stankov, B. and Reiter, R. Melatonin receptors: current status, facts and hypotheses. *Life Sci.* 46: 971-982. 1990.
- Stankov, B., Biella, G., Panara, C., Capsoni, S., Lucini, V., Fauteck, J., Cozzi, B., and Fraschini, F. Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system: using the rabbit cortex as a model. *Endocrinology.* 130: 2152-2159. 1992.
- Stankov, B., Fraschini, F., and Reiter, R. Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res.* 16:245-246. 1991.

- Steinberg, R., Wood, i., and Hogan, M. Pigment epithelial ensheathment and phagocytosis of extrafoveal cones in human retina. *Phil. Trans.* 277: 459. 1977.
- Stephenson, F. Understanding the GABA A receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem. J.* 249:21-32. 1988.
- Sterling, P., Freed, M., and Smith, R. Architecture of rod and cone circuits to the On-beta ganglion cell. *J. Neurosci.* 8:623-642. 1988.
- Stone, R., Laties, A., Raviola, E., and Wiesel, T. Increase in retinal vasoactive intestinal polypeptide after eyelid fusion in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:257-260. 1988.
- Stryer, L. and Bourne, H. R. G proteins: A family of signal transducers. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2: 391-419. 1986.
- Stryer, L. The molecules of visual excitation. *Sci. Am.* 257(1):42-50. 1987.
- Sudgen, D. and Chong, N. Pharmacological identity of 2-[¹²⁵I]-melatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res.* 539. 151-154. 1991.
- Sudgen, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 45:922. 1989.
- Suzuki, O., Noguchi, E., Miyake, S., and Yagi, K. Occurrence of 5-hydroxytryptamine in chick retina. *Experientia.* 33:927-928. 1977.
- Tachibana, M. and Kaneko, A. γ -aminobutyric acid acts at axon terminals of turtle photoreceptors: Difference in sensitivity among cell types. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:7961-7964. 1984.
- Tamai, M., Teirstein, P., Goldman, A., O' Brien, P., and Chader, G. The pineal gland does not control rod outer segment shedding and phagocytosis in the rat retina and pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 17:558-565. 1982.
- Tamarkin, K., Westrom, W., Hamill, L., and Goldman, B. Effect of melatonin on the reproductive systems of the male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology.* 99:1534-1541. 1976.
- Tang, P. and Pang, S. Changes in melatonin levels in the pineal, serum, and brain in male rats following the removal of the retina and retina plus Harderian gland. *Neurosci. Lett. (Suppl.)* 10:473. 1982.
- Taylor, A. and Wilson, R. Electrophysiological evidence for the action of light on the pineal gland of the rat. *Experientia.* 26:267. 1970.
- Teirstein, P., Goldman, A., and O' Brien, P. Evidence for both local and central regulation of rat rod outer segment disc shedding. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19:1268-1273. 1980.

- Textorius, O. and Nilsson, S. Effects of intraocular irrigation with melatonin on the c-wave of the direct current electroretinogram and on the standing potential of the eye in albino rabbits. *Docum. Ophthalmol. (Netherlands)*. 65:97. 1987.
- Thomas, K. and Iuvone, P. Circadian rhythm of tryptophan hydroxylase activity in chicken retina. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11:511-527. 1991.
- Thompson, W., Brooker, G., and Appleman, M. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterases with radioactive substrate. *Methods Enzymol.* 38:205-212. 1974.
- Tosini, G. and Menaker, M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*. 272:419-420. 1996.
- Underwood, H. and Siopes, T. Melatonin rhythms in quail: regulation by photoperiod and circadian pacemakers. *J. Pineal Res.* 2:133. 1985.
- Underwood, H., Binkley, S., Siopes, T., and Mosher, K. Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies, and blood of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 56:70-81. 1984.
- Underwood, H., Siopes, T., and Barrett, R. Does a biological clock reside in the eye of quail? *J. Biol. Rhythms.* 3:323-331. 1988.
- Vacas, M. and Cardinali, D. Diurnal changes in melatonin binding sites of hamster and rats brains: correlation with neuroendocrine responsiveness to melatonin. *Neurosci. Lett.* 15:259-263. 1979.
- Vacas, M., Berria, M., Cardinali, D., and Lascano, E. Melatonin inhibits β -adrenoceptor-stimulated cyclic AMP accumulation in rat astroglial cell cultures. *Neuroendocrinology.* 38:176-181. 1984.
- Vacas, M., Keller Sarmiento, M., and Cardinali, D. Melatonin increases cGMP and decreases cAMP levels in rat medial basal hypothalamus *in vitro*. *Brain Res.* 225:207-211. 1981.
- Vacas, M., Keller Sarmiento, M., and Cardinali, D. Pineal methoxyindoles depress calcium uptake by rat brain synaptosomes. *Brain Res.* 294:176-181. 1984a.
- Vaccaro, T., Cobcroft, M., Provis, J., and Mitrofanis, J. NADPH diaphorase reactivity in adult and developing cat retinae. *Cell. Tissue Res.* 265:371-379. 1991.
- Vanecek, J. and Klein, D. Mechanism of melatonin action on neonatal rat gonadotrophs. In Møller and Pévet (eds.). *Advances in Pineal Research.* 8. 363-370. 1994.

- Vanecek, J. Pavlek, A., and Illnerova, H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 435:359. 1987.
- Vivien-Roels, B. and Dubois, M. Immunohistochemical identification of melatonin in the pineal gland and the retina of lower vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 40:368. 1980.
- Vivien-Roels, B., Pévet, P., Dubois, M., Arendt, J., and Brown, G. Immunohistological evidence for the presence of melatonin in the pineal gland, the retina and the Harderian gland. *Cell. Tiss. Res.* 217:105-115. 1981.
- Wainwright, S. Development of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the retina of the chick embryo and young chick. *J. Neurochem.* 32:1099-1101. 1979.
- Wässle, H. and Chun, M. Dopaminergic and indolamine-accumulating amacrine cells express GABA-like immunoreactivity in the cat retina. *J. Neurosci.* 8:3383-3394. 1988.
- Wässle, H. and Chun, M. GABA-like immunoreactivity in the cat retina: light microscopy. *J. Comp. Neurol.* 279:43-54. 1989.
- Welsh, J. and Osborne, C. Diurnal changes in the retina of the catfish, *Ameiurus nebulosis*. *J. Comp. Neurol.* 66:349. 1937.
- White, M. and Fisher, L. Effects of exogenous melatonin on circadian disc shedding in the albino rat retina. *Vis. Res.* 29:167. 1989.
- Wiechmann, A. and Hollyfield, J. HIOMT-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. *Exp. Eye Res.* 49:1079. 1989.
- Wiechmann, A. and Wirsig-Wiechmann, C. Localization and quantification of high-affinity melatonin binding sites in *Rana pipiens* retina. *J. Pineal Res.* 10:174-179. 1991.
- Wiechmann, A., Bok, D., and Horowitz, J. Melatonin binding in the frog retina: autoradiographic and biochemical analysis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27:153. 1986.
- Wiechmann, A., Yang, X., Wu, S., and Hollyfield, J. Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Res.* 453:377. 1988.
- Woodruff, M. and Bownds, M. Amplitude, kinetics and reversibility of light-induced decrease in guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate in frog photoreceptor membranes. *J. of Gen. Physiol.* 73:429-453. 1979.

- Wu, S. M. Input-output relations of the feedback synapse between horizontal cells and cones in the tiger salamander retina. *J. Neurophysiol.* 65:1197-1206. 1991.
- Wulle, I. and Schnitzer, J. Distribution and morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the developing mouse retina. *Dev. Brain. Res.* 48:59-72. 1989.
- Yamamoto, R., Bredt, D., Snyder, S., and Stone, R. The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience.* 54:189-200. 1993.
- Yau, K. W. and Baylor, D. A. Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 12:289-327. 1989.
- Yau, K. W. Calcium and light adaptation in retinal photoreceptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1:252-257. 1991.
- Yazulla, S. Gabaergic mechanisms in the retina. In *Progress in Retinal Research.* Osborne and Chader (eds.). Pergamon Press, Oxford. 5:1-52. 1986.
- Yazulla, S., Studholme, K., Vitorica, J. and de Blas, A. Immunocytochemical localization of GABA A receptors in goldfish and chicken retina. *J. Comp. Neurol.* 280:15-26. 1989.
- Yeh, H., Lee, M. and Cheun, J. Properties of GABA-activated whole-cell currents in bipolar cells of the rat retina. *Visual Neurosci.* 4:349-357. 1990.
- Young, R. The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17:105. 1978.
- Young, R. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J. Cell Biol.* 33:61. 1967.
- Yu, H-S. and Reiter, R. J. (eds.). *Melatonin. Biosynthesis, Physiological effects, and clinical applications.* CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida. 1993.
- Yu, H-S. Melatonin in the eye: Functional implications. Chapter 14. In *Melatonin: Biosynthesis, physiological effects, and clinical applications.* Yu and Reiter (eds.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 365-393. 1993.
- Yu, H., Chow, P., Tang, P., and Pang, S. Effect of light and darkness on the *in vitro* release of N-acetylserotonin and melatonin by the retina of guinea-pigs. *Neuroendocrinology.* 34:265. 1982.
- Yu, H., Hernandez, V., and Wong, C. Effects of melatonin on SV-40 transformed human fetal retinal pigment epithelial (RPE) cells in culture. *In vitro.* 27:76A.

