

Caracterización de receptores de melatonina en membranas de linfocitos caprinos

Carmen Inés Gutiérrez¹, Guillermo José Carrillo², †, Omaira Urbina-Guanipa³

¹ Doctor en Ciencias Fisiológicas, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" (UNEFM), Coro, Estado Falcón, Venezuela.

², † Doctor en Ciencias Fisiológicas, Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAGRO), UNEFM.

³ MsC en Biología Celular y Microbiana y PhD en Biología, CIB – UNEFM.

Correspondencia: Dra. Carmen Inés Gutiérrez. Dirección: Edificio Salud Mental, Planta Baja, oficina Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB). Avenida El Tenis, Coro estado Falcón, Venezuela, código postal 4101. Telfax 0268-2516090. e-mail: cinesgutierrez@gmail.com

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), Venezuela. Subvención S1-2000000535.

Recibido: 15/01/2007

Aceptado: 24/02/2007

Resumen

Los sistemas neuroendocrino e inmunológico están conectados estructural y funcionalmente. La neurohormona melatonina juega un papel importante en la regulación del sistema inmunológico, lo cual se basa en la existencia de sitios de unión en las células linfoides, sistema nervioso y órganos periféricos. Las cabras son animales domésticos con baja susceptibilidad a infecciones y cáncer. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar receptores de melatonina en membranas de linfocitos de sangre periférica de caprinos, a través de estudios de ligadura con iodomelatonina tritiada. La unión fue dependiente del tiempo, temperatura y concentración celular, además fue estable, reversible y saturable. Los ensayos de saturación demostraron un sitio de alta afinidad ($K_d = 3,61 \pm 0,21$ nM) y baja capacidad ($B_{max} = 350,11 \pm 18,5$ fmol/mg). Cuando los animales fueron mantenidos bajo luz constante por 10 días la capacidad aumentó significativamente. Los resultados indican que los linfocitos de cabras adultas poseen receptores de alta afinidad que cambian con la exposición prolongada a la luz, lo cual confirma interacción y comunicación entre la glándula pineal y el sistema inmune.

Palabras clave: melatonina, cabras, linfocitos, ligadura, receptores.

Abstract

Neuroendocrine and immunological systems are structural and functionally connected. The melatonin neurohormone plays an important role in immune regulation, which is supported by the existence of melatonin specific binding sites in lymphoid cells, central nervous system and peripheral organs. Goats are domestic animals with reduced carcinoma incidence and lower infection susceptibilities. The aim of this work was to characterize the melatonin receptor in goat lymphocyte membranes obtained from peripheral blood using binding studies with [³H]iodomelatonin. Melatonin binding was time, temperature and cellular concentration dependent, also stable, reversible and saturable. Saturation assays demonstrated a high affinity binding site ($K_d = 3,61 \pm 0,21$ nM) and low capacity ($B_{max} = 350,11 \pm 18,5$ fmol/mg). When the animals were submitted to continuous light for 10 days, the capacity significantly increased. The results indicate that adult goats have high affinity receptors for melatonin in lymphocytes which are altered after prolonged exposure to light, confirming interaction and communication between the pineal gland and the immune system.

Key words: melatonin, goat, lymphocyte, binding, receptor.

Introducción

La melatonina o N-acetil-5-metoxi-triptamina (MT) es una hormona producida principalmente por la glándula pineal en los vertebrados. Entre sus funciones destacan la regulación del sueño, señalización antiapoptótica, antioxidante, protector celular, modulación del sistema inmunitario y oncostática^{1,2}. La MT es sintetizada a partir del aminoácido triptófano, es liberada al torrente sanguíneo y en su paso por el hígado (metabolismo de primer paso) es conjugada y posteriormente eliminada principalmente por la orina en forma de 6-sulfomelatonina¹.

La MT ejerce sus acciones a través de receptores de alta y baja afinidad. Estos pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, que han sido identificados y caracterizados en una variedad de tejidos por autorradiografía y ensayos de ligadura con iodomelatonina (iodoMT)^{3,4,5,6}. En mamíferos, los receptores de MT (MTr) se encuentran en la pars tuberalis y distalis de la hipófisis, en el núcleo supraquiasmático y el área preóptica del hipotálamo, los núcleos paraventricular y anteroventral talámicos, el hipocampo, la corteza cerebral y cerebelar, el área postrema

y la retina⁷. Además, se ha descrito señalización intracelular, tanto por vía del AMPc como del GMPc, lo que sugiere que el polimorfismo es una característica general de la familia de receptores melatoninérgicos⁸. Existen varios subtipos de receptores, MT_{1a}, que se expresa en el cerebro de mamíferos y aves, MT_{1b} en la retina de mamíferos y MT_{1c} en los melánoforos, el cerebro y la retina de anfibios y en el cerebro de peces y aves^{9,10,11}. Sin embargo, comúnmente se reconocen sólo dos subtipos, MT₁ y MT₂, cuyas diferencias farmacológicas se basan en la potencia de inhibición de los compuestos según la presencia o no de núcleo indólico¹².

Los MTr se han descrito en algunas especies animales a través de técnicas autoradiográficas¹³. En caprinos, esta técnica demostró la presencia de sitios de unión para 2-iodoMT en la pars tuberalis, el núcleo supraquiasmático, el área pre-óptica, el septum lateromedial, el fornix, el hipocampo y la corteza cerebral³. Hasta ahora no se han descrito MTr en células del sistema inmunitario de caprinos ni tampoco se han caracterizado bioquímica o farmacológicamente los encontrados en el cerebro. Aunque ya se han estudiado en los linfocitos de ratas¹⁴ y humanos⁴, así como en macrófagos de ratones¹⁵ y en el timo y el bazo de ratas^{16,17}.

Existe evidencia que demuestra inequívocamente una comunicación entre los sistemas inmunitario, endocrino y nervioso, lo que ha modificado las concepciones fisiopatológicas de las enfermedades autoinmunes, infecciosas, alérgicas y los desórdenes psiquiátricos^{18,19,20}. La mayoría de estas interacciones obedecen a la presencia de receptores en las células inmunitarias. La inmunomodulación ejercida por la MT podría ser por vía indirecta, estimulando la liberación de endorfinas y otras hormonas²¹ o directamente a través de los receptores en las células inmunocompetentes²². Por lo tanto, es necesario demostrar la presencia de MTr en células inmunitarias y caracterizarlos, razón por la cual el objetivo general de esta investigación fue caracterizar los receptores de MT en los linfocitos de sangre periférica de caprinos, un modelo animal poco estudiado pese a ser un animal fotoperiódico, resistente a las enfermedades, incluso neoplasias, con gran capacidad para adaptarse a situaciones diversas y a suministros alimenticios variables, hasta en ambientes donde el ganado vacuno y ovino no pueden sobrevivir²³.

Materiales y métodos

Reactivos. MT^[3H] 84Ci/mmol de Radiochemical batch analysis (Amersham, UK). Heparina sódica (1000U/ml). De Tocris Cookson Inc. (Ballwin, MO, USA): luzindol, DH97, 4-P-PDOT, 8-M-PDOT, 2-iodoMT. De Sigma Chemicals Company (St. Louis, MO, USA): azul de tripano, L-triptófano, 5-HT, MT, Histopaque 1083, cóctel LSC acuoso, cóctel LSC no acuoso.

Animales. Caprinos machos (*Capra hircus*) de un año de edad, según cronología dentaria, mantenidas en corrales bajo condiciones controladas de luz y oscuridad (12:12), alimentadas con pacas de heno, alimento concentrado para rumiantes y agua *ad libitum*, los cuales fueron divididos en dos grupos de cinco animales cada uno: 1) animales controles con ciclos de luz de 12 horas y 2) caprinos expuestos a diez días de luz continua (200 Watt, 17,6 lm/W, 3520 lúmen).

Aislamiento de linfocitos en sangre periférica de caprinos y preparación de membranas. Se obtuvo sangre por punción de la vena yugular externa mediante el uso de una inyectadora heparinizada, se colocó en tubos estériles y se procedió de acuerdo con el método de Boyun²⁴ modificado por Sempere y col.²⁵. Se utilizó Histopaque 1.083 g/l, para obtener el gradiente^{26,27}, y para eliminar las células adherentes (monocitos) se utilizó la adherencia al plástico²⁵. El precipitado celular obtenido se resuspendió en solución Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y se guardó a -70°C hasta realizar los experimentos. Para preparar las membranas se tomaron las células resuspendidas en solución Tris-HCl, se homogenizaron en un Tissumizer (Tekmar, OH) y se centrifugaron en una centrifuga refrigerada a 38000 g por 15 minutos. Se lavaron dos veces con 5 ml de solución Tris-HCl, se resuspendieron en 1 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y se procedió a realizar los ensayos de ligadura^{16,28}.

Ensayos de ligadura con MT^[3H]. *Ensayos de saturación:* Estos ensayos permitieron determinar las características cinéticas del receptor, la capacidad máxima o número de sitios de unión (Bmax) y la constante de afinidad (Kd), a través del programa BINDBIG²⁹. Se prepararon 8 concentraciones de MT^[3H], de 0,1 a 10 nM³⁰. Para cada curva se prepararon 8 tubos de unión total y 8 tubos de unión inespecífica (por duplicado), se agregaron 400 µl de solución de incubación, 50 µl de preparación de membranas, de la cual se conservó una alícuota para determinar proteínas por el método de Lowry y col³¹ y por último se añadieron 50 µl de la concentración correspondiente del ligando, para un volumen final de 500 µl. Se incubaron a 25°C en un baño de agua, en agitación constante por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se procedió a detener la reacción al colocar los tubos en un baño de agua helada. Inmediatamente se filtró el contenido de los tubos en papel de filtro (Whatman GF/C). Se lavó dos veces con 5 ml de solución de incubación fría³⁰. Los filtros se colocaron en viales de centelleo líquido y se secaron en estufa a 70°C. Una vez secos se agregó 4 ml de líquido de centelleo, cóctel LSC no acuoso (Sigma, USA) a cada vial y se procedió a contarlos en un contador de centelleo líquido (Packard, Tri-Carb®, USA). Para definir la unión específica se colocaron 50 µl de 2-iodoMT frío 100 µM a los tubos de unión inespecífica³⁰.

Ensayos de inhibición: Estos experimentos se realizaron con la finalidad de determinar la concentración de diferentes drogas que inhiben el 50% (CI₅₀) de la unión de MT^[3H] a membranas de linfocitos de sangre periférica de caprinos. La selectividad de la interacción se determinó por incubación de las membranas en presencia de 9 concentraciones (0,1 nM a 1 mM) de las siguientes drogas: 2-iodoMT, MT y 8-M-PDOT que son agonistas de los receptores melatoninérgicos; luzindol, DH97 y 4-P-PDOT, antagonistas de los receptores de MT y L-triptófano y serotonina (5-HT) que son precursores en las síntesis de MT. Cada curva constaba de 36 tubos, dos por cada concentración, 2 tubos de unión total y 2 de unión inespecífica. La unión específica se definió con 2-iodoMT, concentración final 100 µM. A cada tubo de la curva se añadieron 350 µl de solución de incubación, 50 µl de la preparación de membranas, 50 µl de la correspondiente concentración del inhibidor y 50 µl del ligando, concentración final 2 nM, para un volumen final de 500 µl. Se incubaron por 30 minutos a 25°C, se detuvo la reacción y se procedió como se describió

para los ensayos de saturación. La selectividad de la unión permitió confirmar si los sitios marcados se correspondían a receptores de MT³⁰.

Ensayos de regulación: siguiendo el mismo protocolo descrito para los ensayos de saturación se utilizaron membranas de linfocitos de caprinos controles o mantenidos bajo luz continua por 10 días, pinealectomía funcional (Pxf), al cabo de los cuales se tomó la muestra de sangre³².

Análisis de los datos. Para el análisis de la información obtenida en los ensayos de ligadura se utilizó el programa BINDBIG²⁵ y para el análisis estadístico se usó el análisis de varianza de una vía y las pruebas de comparación múltiple de Tukey-Kramer y “t” de Student^{33,34}. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (E.E.M.).

Resultados

Concentración de membranas. La ligadura de MT^[3H] a las membranas de linfocitos caprinos fue lineal hasta una concentración de 700 µg/ml (Figura 1). En los ensayos de saturación e inhibición realizados se utilizó una concentración de proteínas de 500 µg/ml.

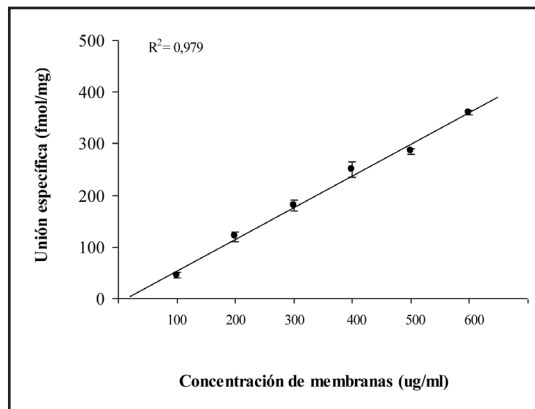


Figura 1. Correlación entre la concentración de proteínas de las membranas de linfocitos caprinos y la unión específica de melatonina^[3H]. Se incubaron seis concentraciones de membranas en presencia de melatonina^[3H], 2 nM, durante 30 minutos, a 25°C. La unión específica se definió con 2-iodo-melatonina, 100 µM, n = 4, por duplicado.

Temperatura. La unión de MT^[3H] a las membranas de los linfocitos de cabras fue dependiente de la temperatura y del tiempo de incubación. En la figura 2 se puede observar que la ligadura a 37°C alcanzó su máximo valor a los 15 minutos de incubación y descendió rápidamente, en cambio a 25°C alcanzó el equilibrio aproximadamente a los 20 minutos y se mantuvo estable mientras duró el experimento. A 10°C la unión fue muy escasa. De esta forma se escogió realizar los ensayos a 25°C incubando por 30 minutos.

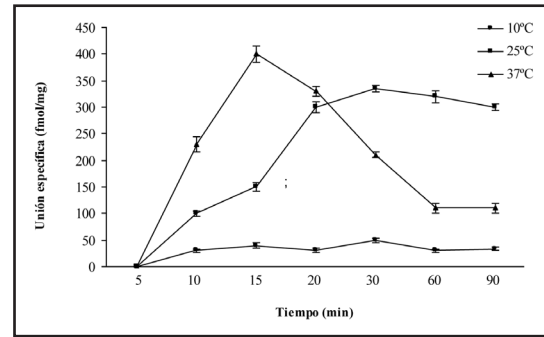


Figura 2. Efecto del tiempo de incubación y la temperatura sobre la ligadura de melatonina^[3H] en membranas de linfocitos caprinos. La unión específica fue definida con Luzindol, 100 µM. Cada punto representa el promedio de tres experimentos por duplicado, n = 3, por duplicado.

Selectividad de la unión. En la Tabla I se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición. La 2-iodo-MT fue más potente en inhibir la unión de MT^[3H] a las membranas de linfocitos caprinos. MT y Luzindol inhibieron con una potencia similar, seguidos por 8-M-PDOT, DH 97 y 4-P-PDOT. El pseudo n_H fue muy cercano a la unidad para las mismas. La serotonina y el triptófano no inhibieron la unión ($CI_{50} > 100000$ nM). La figura 3 muestra una curva de inhibición representativa en la cual el luzindol, un antagonista de los receptores melatoninérgicos, desplazó la MT^[3H] de los sitios de unión en un 94% aproximadamente.

Tabla 1. Inhibición de la unión de melatonina^[3H] a membranas de linfocitos caprinos

Drogas	CI ₅₀ (nM)	Pseudo nH
2-Iodo-melatonina	9 ± 0,1	-0,97 ± 0,16
Melatonina	53 ± 0,11	-0,96 ± 0,13
Luzindol	55 ± 3,12	-0,91 ± 0,11
8-M-PDOT	89 ± 10,15	-0,93 ± 0,15
DH 97	92 ± 21,87	-0,97 ± 0,21
4-P-PDOT	143 ± 25,13	-0,91 ± 0,26
5-HT	> 100000	
D-Triptófano	> 100000	

La potencia de la inhibición se determinó incubando las membranas con melatonina^[3H] 2 nM en presencia de 9 concentraciones de la droga correspondiente (0,1 nm a 1 mM). La unión específica se definió con 2-iodo melatonina 100µM, excepto para la inhibición con éste, que se definió con Luzindol 100 µM. Los resultados se expresan como la media ± E.E.M., n = 5, por duplicado.

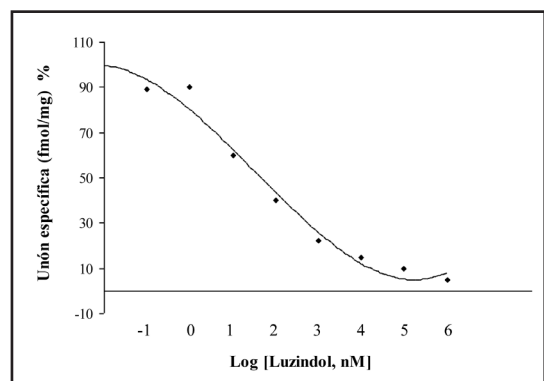


Figura 3. Curva representativa de la inhibición de la unión de melatonina^[3H] por luzindol (0,1 nM a 1 mM) a membranas de linfocitos caprinos. La unión específica fue definida con 2-iodo-melatonina, 100 µM. R² = 0,9786. n = 5, por duplicado.

Ensayos de saturación. La unión específica (unión total menos unión inespecífica definida con 2-iodoMT, 100 μ M) *versus* la concentración del ligando (0,1 a 10 nM) desplegó una curva en forma de hipérbola saturable (Figura 4). Para estas curvas se encontró un n_H de $0,98 \pm 0,2$. Mediante el análisis de Scatchard se obtuvo una B_{max} de $350,11 + 18,5$ fmol/mg y una K_d de $3,61 + 0,21$ nM (Figura 5).

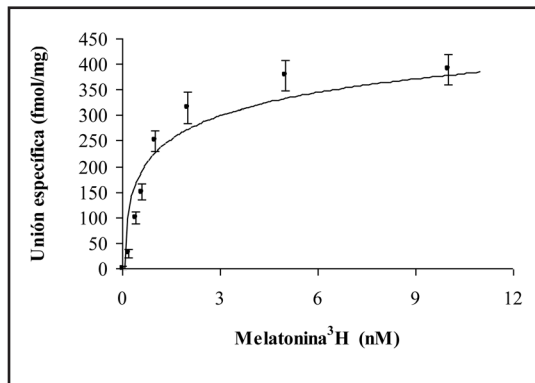


Figura 4. Curva de saturación de la unión de melatonina³H a membranas de linfocitos caprinos. La unión específica se definió con 2-iodo-melatonina 100 μ M. $R^2 = 0,97$. $n = 5$, por duplicado.

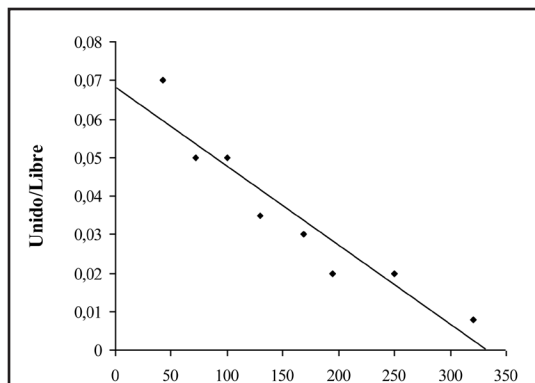


Figura 5. Gráfico de Scatchard correspondiente a una curva de saturación representativa de la unión de melatonina³H a membranas de linfocitos caprinos. Unión específica definida con 2-iodo-melatonina, 100 μ M.

Efecto de la pinealectomía funcional sobre la ligadura de MT³H. En la Tabla 2 se pueden observar los parámetros cinéticos obtenidos en las cabras sometidas a Pxf. Se puede apreciar el incremento significativo de la capacidad de unión en las membranas de linfocitos provenientes de los animales que se mantuvieron bajo luz continua.

Tabla 2. Efecto de pinealectomía funcional sobre la afinidad y la capacidad de los receptores de melatonina ³ H en cabras		
Condición	Kd (nM)	Pseudo nH
Control	$3,61 \pm 0,21$	$350,11 \pm 18,5$
Luz continua	$3,87 \pm 0,32$	$428,21 \pm 17,3$ **

Los resultados se expresan como la medias \pm E.E.M., $n = 5$ por grupo, ** $p < 0,01$ vs control.

Discusión

Los resultados demuestran la existencia de receptores de MT en los linfocitos de cabras adultas. La unión entre el ligando, MT³H y dichos receptores fue dependiente de la temperatura, del tiempo y de la concentración de las membranas. También fue reversible, saturable y de alta afinidad, además de altamente específico, lo cual llena los criterios para ser considerados sitios de unión o receptores de MT.

De acuerdo con los ensayos de ligadura iniciales, se escogió la concentración óptima de proteínas de membrana para los experimentos siguientes (Figura 1), así como el tiempo y la temperatura a la cual realizar los experimentos (Figura 2). Aun cuando se han realizado experimentos de ligadura en linfocitos de ratas¹⁴ y humanos⁴, así como en macrófagos de ratones¹⁵, en el timo y el bazo de ratas^{16,17}, no existe en la literatura ensayos de ligadura en linfocitos caprinos, por lo que en el presente estudio se procedió a la estandarización de las condiciones experimentales como requisito previo.

En los ensayos de saturación se utilizaron concentraciones crecientes del ligando y como se observa en la figura 4, se obtuvo saturación a partir de 2 nM aproximadamente. La interpretación del análisis de Scatchard permitió la linealización de las hipérbolas y la estimación de la K_d y B_{max} ³⁵. La figura 5 muestra un gráfico de Scatchard, en promedio la B_{max} correspondió a $350,11 + 18,5$ fmol/mg y la K_d , la cual es igual a la $-1/\text{pendiente}$ de la recta³⁰, fue de $3,61 \pm 0,21$ nM, valor este que corresponde a un receptor de alta afinidad. Nuestros resultados son similares en rango a los reportados en la literatura. En efecto, García-Pergañeda y col.,¹⁵ encontraron una K_d de 0,45 nM y una B_{max} de 7,8 fmol/mg en membranas de linfocitos humanos. Pelletier y col.,³⁶ reportan valores de B_{max} en la pars tuberalis de la hipófisis de ovejas de $43,2 \pm 4,4$ y $75,4 \pm 8,4$ fmol/mg usando MT¹²⁵I]. Mediante técnicas autoradiográficas Gauer y col.,³⁷ reportan valores de B_{max} de $46,9 \pm 2,8$ y $5,12 \pm 0,30$ fmol/mg en la pars tuberalis y núcleo supraquiasmático. En relación a la K_d , también López-González y col.,¹⁶ la describieron en el rango nanomolar bajo a la afinidad de los receptores de MT en membranas del timo de la rata, señalando la existencia de dos sitios de unión, uno de alta ($K_d = 1,72 \pm 0,25$ nM) y otro de baja afinidad ($K_d = 1226 \pm 325$ nM). Aunque nuestros resultados se encuentran en el mismo rango al reportado hasta ahora, se debe considerar que estos estudios fueron realizados utilizando MT marcada con ¹²⁵I y no con tritio, como en el estudio actual, lo cual explicaría las diferencias.

Al evaluar la selectividad de la unión, se encontró 2-iodo-MT > MT > luzindol > 8-M-PDOT > DH97 > 4-P-PDOT. La 2-iodo-MT fue más potente en inhibir la unión de MT³H al receptor, seguido de su ligando endógeno y luzindol que es un antagonista de los receptores melatoninérgicos; después siguieron 8-M-PDOT, agonista, y finalmente DH97 y 4-P-PDOT que también son antagonistas. Para diferenciar el sistema marcado de otros receptores o transportadores, se evaluaron otras drogas en los ensayos de inhibición. Sin embargo, los precursores en la síntesis de MT, la serotonina y el triptófano, no inhibieron la unión de MT³H a las membranas de los linfocitos caprinos. El coeficiente de Hill obtenido fue muy cercano a la unidad, lo cual confirma que las reacciones seguían el principio de acción de masas en el equilibrio³⁸.

En relación al efecto que la pinealectomía funcional ejerce sobre la unión de la MT a sus receptores, se encontró que al mantener las cabras bajo luz constante durante 10 días se produjo una Pxf como ha sido señalado³². Los receptores encontrados en las membranas de los linfocitos de los chivos con Pxf presentaron un aumento en la capacidad de unión, Bmax, como se evidencia en la Tabla II. Los resultados sugieren que la exposición a la luz induce cambios en el número de receptores para MT y no en la afinidad. Hallazgos similares fueron encontrados por Raffi-El-Idrissi y col.,¹⁷ cuando mantuvieron ratas Wistar expuestas a la luz por 5 días y encontraron aumento de la Bmax. Por su parte, Tenn y Niles³⁹ señalan que la ligadura de iodo-MT en el núcleo supraquiasmático es más elevada durante la fase de luz que durante la oscuridad y además, de día existe un sitio de alta afinidad y de noche uno de alta y otro de baja afinidad. También Laitinen y col.,⁴⁰ describieron un incremento en la Bmax en el núcleo supraquiasmático de ratas durante el pico de luz diurna. Estos hallazgos confirman la hipótesis formulada por Reiter y col. en la década de los 80⁴¹, que indica que la sensibilidad de los receptores de MT estar inversamente correlacionada con los niveles circulantes de la hormona, es decir, en el día y bajo luz en forma continua, aumenta la sensibilidad del receptor. Igualmente, los hallazgos permiten apoyar el concepto de papel regulatorio que tiene la luz sobre los receptores de MT^{17,33} en contraposición a otros estudios⁴². En resumen, los hallazgos sugieren la existencia de receptores de alta afinidad en las membranas de los linfocitos de cabras macho adultas, los cuales modifican sus características bajo condiciones luminosas, demostrándose la existencia de interacción y comunicación entre la glándula pineal y el sistema inmune en estos animales.

Agradecimientos: Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) de Venezuela por la subvención S1-200000535 y al Laboratorio de Neuroquímica del IVIC, especialmente a la Dra. Lucimey Lima, porque los conocimientos recibidos permitieron la realización del presente trabajo.

Referencias

1. Brzezinski A: Melatonin in humans. *New Eng J Med.* 1997, 336:186-195.
2. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R: Melatonin. *FEBS J.* 2006, 273(13):2813-2838.
3. Devenson S, Howarth J, Arendt J, Forsyth I: In vitro autoradiographical localization of melatonin binding sites in the caprine brain. *J Pineal Res.* 1992, 13:6-12.
4. González-Haba M, García-Mauriño S, Calvo J, Goberna R, Guerrero J: High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). *FASEB J.* 1995, 9:1331-1335.
5. Bayarri MJ, Garcia-Allegue R, Muñoz-Cueto JA, Madrid JA, Tabata M, Sánchez-Vasquez FJ, Iigo M: Melatonin binding sites in the brain of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Zoolog Sci.* 2004, 21(4):427-434.
6. Ekmekcioglu C: Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother.* 2006, 60(3):97-108.
7. Vanecek J: Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998, 78:687-721.
8. Brydon L, Petit L, de Coppet P, Barret P, Morgan PJ, Strosberg AD, Jockers R: Polymorphism and signaling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev.* 1999, 39(3):315-324.
9. Reppert S, Godson C, Mahle C, Weaver D, Slaugenhaupt S, Gussella J: Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel (1b) melatonin receptor. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1995, 92:8734-8738.
10. Reppert S, Weaver D, Ebisawa T, Mahle C, Kolakowski L: Cloning of melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett.* 1996a, 386:219-224.
11. Reppert S, Weaver D, Godson C: Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 1996b, 17:100-102.
12. Morgan P, Barret P, Howell H, Hellinwell R: Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int.* 1994, 24:101-146.
13. Poon A, Chow P, Mak A, Pang S: Autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J Pineal Res.* 1997, 23:5-14.
14. Pozo D, Delgado M, Fernández-Santos J, Calvo J, Gomariz R, Martín-Lacave I, Ortiz G, Guerrero J: Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J.* 1997, 11:466-473.
15. García-Pergañeda A, Guerrero J, Raffi-El-Idrissi M, Paz M, Pozo D, Calvo J: Characterization on membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neuroimmunol.* 1999, 95:85-94.
16. López-González M, Matin-Cacao A, Calvo J, Reiter R, Osuna C, Guerrero J: Specific binding of 2-[125I]iodomelatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J Neuroimmunol.* 1993, 45:121-126.
17. Raffi-El-Idrissi M, Calvo J, Pozo D, Harmouch A, Guerrero J: Specific binding of 2-[125I]iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production. *J Neuroimmunol.* 1995, 57:171-178.
18. Jafarian M, Hu Y, Marquette C, Dietrich H, Haour F, Wick G: Interleukin-1 receptor deficiency in brains from NZB autoimmune mouse. *J Neuroimmunol.* 1994, 53:91-99.
19. Undem B, Riccio M, Weinreich D, Ellis J, Myers A: Neurophysiology of mast cell-nerve interactions in the airways. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995, 107:199-201.
20. Haas H, Schauenstein K: Neuroimmunomodulation via limbic structures: the neuroanatomy of psychoimmunology. *Prog Neurobiol.* 1997, 51:195-222.
21. Maestroni G, Conti A: Immuno-derived opioids as mediators of the immuno-enhancing and anti-stress action of melatonin. *Acta Neurol.* 1991, 13:356-360.
22. Calvo J, Raffi-el-Idrissi M, Pozo D, Guerrero J: Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J Pineal Res.* 1995, 18:119-126.
23. Devendra C, McLeroy G: Producción de cabras y ovejas en los trópicos. Editorial El Manual Moderno. México, 1986, pp 75-84.
24. Boyun A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968, 21:51.
25. Sempere T, Urbina M, Lima L. 5-HT_{1A} and β -adrenergic receptors regulate proliferation of rat blood lymphocytes. *Neuroimmunomodulation.* 2004, 11:307-315.
26. Banks K, Greenlee A. Lymphocyte subpopulation of the goat: isolation and identification. *Am. J. Vet. Res.* 1982, 43: 314-317.
27. Lichtensteiger C, Cheevers W, Davis C. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 1993, 74: 2111-2116.

28. Lima L, Schmer C, Urbina M. 8-³H]Hydroxy-2-(Di-n-Propilamino) Tretalin binding sites in goldfish retina. *Neurochem Res.* 1994, 19(3):249-255.
29. Barlow R. *Biodata handling with microcomputers.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1983.
30. Bylund D, Yamamura H. *Methods in receptors binding.* In: *Methods in neurotransmitter receptor analysis.* Raven Press, New York. 1990.
31. Lowry o, Rosenbrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folinphenol reactive. *J Biol Chem.* 1951, 193:265-275.
32. John T, Brown M, Wideman L, Brown G: Melatonin replacement nullifies the effect of light-induced functional pinealectomy on nociceptive rhythm in the rat. *Physiol Behav.* 1994, 55: 735-739.
33. Sokal R, Rohlf F: *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.* H Blume Ediciones, Madrid. 1979.
34. Unnerstall J: Computer-assisted analysis of binding data. In: *Methods in neurotransmitter receptor analysis.* Raven Press, New York. 1990.
35. Scatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann New York Acad Sci.* 1949, 51:660-672.
36. Pelletier J, Bodin L, Hanocq E, Malpoux B, Teyssier J, Thimonier J, Chemineau P: Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel(1a) receptor in the ewe. *Biol Reprod.* 2000, 62(4):1096-101.
37. Gauer F; Masson-Pevet B, Pevet P: Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res.* 1993, 602(1):153-156.
38. Hill A: The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol.* 1910, 40:4-7.
39. Tenn C, Niles LP: Physiological regulation of melatonin receptors in rat suprachiasmatic nuclei: diurnal rhythmicity and effects of stress. *Mol Cell Endocrinol.* 1993,98(1):43-48.
40. Laitinen J, Castren E, Vakkuri O, Saavedra J: Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology.* 1989, 124: 1585-1587.
41. Reiter RJ, Petterborg LJ, Trakulrunsi C, Trakulrunsi WK: Surgical removal of the olfactory bulbs increases sensitivity of the reproductive system of female rats to the inhibitory effects of late afternoon melatonin injection. *J Exp Zool.* 1980, 212:47-52.
42. Amano M, Iigo M, Kitamura S, Amiya N, Yamamori K: Changes in melatonin binding sites under artificial light-dark, constant light and constant dark conditions in the masu salmon brain. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2006, 144(4):509-513.

Diseño gráfico

Comunicación visual



Imagen corporativa, libros, revistas, publicaciones, papelería, trípticos, folletos, volantes, encartes, afiches, carpetas, tarjetas de presentación

