

## La glándula pineal como transductor neuroendocrino

F. J. HERNÁNDEZ DÍAZ, J. J. SÁNCHEZ, P. ABREU GONZÁLEZ y R. ALONSO SOLIS

Laboratorio de Neurobiología Celular. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Campus de Ciencias de la Salud. La Laguna. Tenerife.

La glándula pineal de los mamíferos funciona como una interfase neuroendocrina, transformando los cambios de luz ambiental en un mensaje hormonal: la síntesis y liberación nocturna de melatonina. La noradrenalina, liberada desde las terminaciones nerviosas simpáticas procedentes del ganglio cervical superior, interactúa con los receptores  $\beta$ - y  $\alpha_1$ -noradrenérgicos situados en la membrana del pinealocito, iniciando una serie de acontecimientos que culminan en la síntesis de melatonina. La estimulación del receptor  $\beta$  activa la adenilato ciclasa, produciendo un rápido incremento en los valores intracelulares de adenosin monofosfato complementario (AMPc), la activación de una proteína cinasa dependiente de AMPc y la fosforilación del factor de transcripción CREB. La interacción del CREB fosforilado con las secuencias específicas en el ADN induce la expresión de la serotonina N-acetil transferasa (SNAT), enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de melatonina. El CREB fosforilado también activa la expresión de una proteína represora que bloquea la transcripción de la SNAT. El receptor  $\alpha_1$  potencia la respuesta  $\beta$ -noradrenérgica activando una proteína cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y de la hidrólisis de fosfatidilinositol. Además del control nervioso, se ha demostrado que la biosíntesis de melatonina se ve afectada por las oscilaciones de los valores circulantes de esteroides gonadales. En células pineales, las hormonas sexuales regulan directamente la respuesta a la estimulación adrenérgica y, de forma recíproca, la noradrenalina regula la cinética del receptor de estrógenos. En otras áreas del sistema nervioso se han descrito interacciones similares entre hormonas y neurotransmisores, lo que podría representar un mecanismo básico en los procesos de integración neuroendocrina a escala celular. La glándula pineal constituye un modelo extremadamente útil para la disección de los componentes de tales mecanismos.

**Palabras clave:** Glándula pineal. Melatonina. Esteroides gonadales. Receptores de esteroides gonadales. Catecolaminas. Receptores alfaadrenérgicos. Receptores betaadrenérgicos. AMPc.

### PINEAL GLAND AS A NEUROENDOCRINE TRANSDUCTORS

The mammalian pineal gland is as a neuroendocrine interface that converts environmental lighting conditions into a humoral message: the nocturnal synthesis and release of melatonin. Norepinephrine released from postganglionic sympathetic nerve terminals arising from the superior cervical ganglia, acts on  $\beta$ - and  $\alpha_1$ -noradrenergic receptors in the pinealocyte membrane and initiates a series of events leading to melatonin synthesis.  $\beta$ -adrenoceptor stimulation activates adenyl cyclase resulting in a rapid increase in intracellular cAMP levels, activation of cAMP-dependent protein kinase, and phosphorylation of cAMP-response element binding protein (CREB). The interaction of phosphorylated CREB with a cAMP-response element induces the expression of serotonin N-acetyltransferase (SNAT), the enzyme that catalyses the rate limiting step in melatonin synthesis. Phosphorylated CREB also activates the expression of an inducible cAMP early repressor which represses cAMP-induced SNAT transcription.  $\alpha_1$  adrenoceptor activation potentiates  $\beta$ -action through a  $\text{Ca}^{+2}$ -phospholipid-dependent protein kinase. In addition to this neural control, it has been shown that physiological oscillations of gonadal steroids, or those induced by experimental manipulations, also affect pineal melatonin synthesis and secretion. Gonadal steroids directly regulate pineal adrenoceptor responsiveness. In addition, the levels of cytoplasmic estrogen receptor and its translocation to the nucleus are under control of sympathetic nerves via norepinephrine and  $\beta$ -adrenoceptor-mediated mechanisms. This type of interactions have been described in other parts of the nervous system, suggesting that they may represent a basic regulatory mechanism of neuroendocrine integration at the cellular level. Therefore, the rat pineal gland may constitute an extremely useful model to dissecting the different components of such mechanisms.

**Key words:** Pineal gland. Melatonin. Gonadal steroids. Gonadal steroid receptor. Catecholamines. Alpha-adrenergic receptors. Beta-adrenergic receptors.

La glándula pineal es un órgano situado en el cerebro, con una ubicación y características funcionales que varían en relación con la especie y su grado evolutivo. La pineal humana tiene una localización de tipo profundo, y se encuentra adosada al techo del tercer ventrículo, mientras que la de la rata es de tipo superficial y está situada debajo del cráneo<sup>1</sup>. Su

Correspondencia: Dr. F.J. Hernández. Laboratorio de Neurobiología Celular. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Campus de Ciencias de la Salud. 38200. La Laguna. Tenerife. Correo electrónico: fjhernandez@navegalia.es

Manuscrito recibido el 19-4-2001; aceptado para su publicación el 23-7-2001.

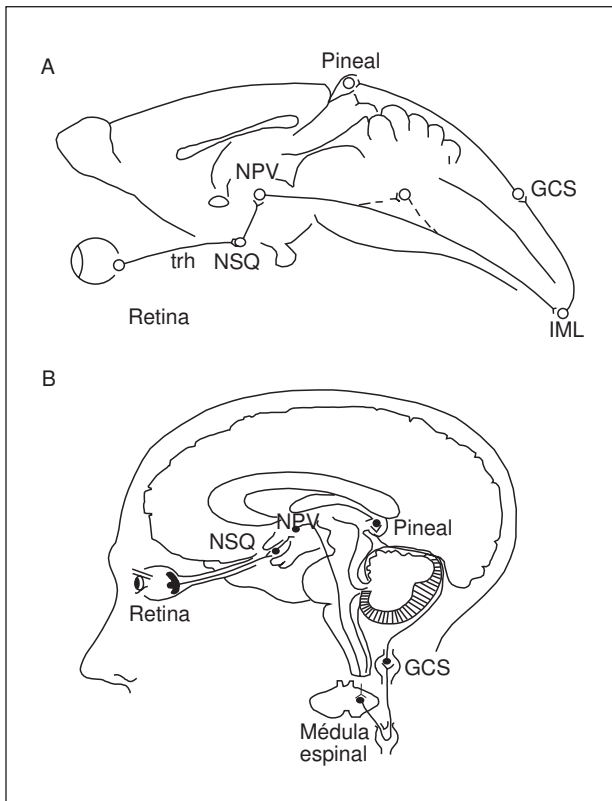


Fig. 1. Las conexiones neurales entre la retina y la pineal son similares en todos los mamíferos, incluido el hombre. A) Inervación simpática periférica de la glándula pineal de rata (modificada de Bittman, 1984). B) Inervación simpática periférica de la glándula pineal humana (tomada de Alonso, 1992). NSQ: núcleo supraquiasmático; NPV: núcleo paraventricular; IML: columna intermediolateral; GCS: ganglio cervical superior; trh: tracto retinohipotalámico.

función evidencia una evolución filogenética y se comporta como una estructura fotosensible en peces, anfibios y aves, y como un órgano neuroendocrino en mamíferos. En este último caso una señal nerviosa procedente de la retina, a través de una vía aferente noradrenérgica, regula la producción y liberación de la melatonina, la hormona pineal producto del metabolismo del triptófano. La biosíntesis de melatonina presenta un ritmo de naturaleza circadiana, siendo máxima durante la fase de oscuridad y mínima en presencia de luz<sup>2</sup>. De esta forma la hormona es responsable de la adaptación circadiana y estacional de toda una serie de procesos fisiológicos, como por ejemplo la actividad reproductora<sup>3</sup>. Existen, además, toda una serie de evidencias experimentales que conducen a considerar la glándula pineal como un punto de integración de señales nerviosas y endocrinas y, por tanto, un excelente modelo donde estudiar los mecanismos celulares involucrados en tales procesos.

## ANATOMÍA E INERVACIÓN DE LA GLÁNDULA PINEAL DE RATA

### Anatomía

La glándula pineal es un órgano impar con forma de cono. En la especie humana está situada en la región de la comisura posterior y ocupa la depresión que existe entre los tubérculos cuadrigéminos del mesencéfalo. En la rata pre-

senta una localización superficial, consecuencia de la migración en sentido dorsocaudal de las células pineales durante el desarrollo embrionario. En el encéfalo la pineal ocupa un espacio delimitado rostralmente por el ángulo que forman la corteza cerebral retrosplenial y estriada de cada hemisferio, y dorsalmente por los lóbulos 4 y 5 del cerebelo. La glándula se encuentra recubierta por la piamadre y conectada al diencéfalo mediante un pedúnculo constituido por vasos sanguíneos, fibras nerviosas y tejido conectivo.

### Inervación

Las fibras nerviosas simpáticas procedentes del ganglio cervical superior constituyen, sin duda, la inervación principal de la glándula. Forman parte de una vía multisináptica con origen en la retina y que conduce hasta la pineal la información lumínica procesada bajo la forma de impulsos nerviosos, siendo, por tanto, responsable del ritmo circadiano de la biosíntesis y liberación de melatonina. Las conexiones neurales entre la retina y la pineal son similares en todos los mamíferos, incluida la especie humana. Tal y como se ilustra en la figura 1 los impulsos nerviosos generados en las células fotorreceptoras de la retina son enviados hacia el hipotálamo anterior mediante un haz de fibras que constituyen el tracto retinohipotalámico<sup>4</sup>. En lo referente al quiasma óptico, estas fibras se separan del tracto óptico principal para dirigirse al núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior (NSQ), donde se inicia una vía multisináptica que hace escala en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y en la columna intermediolateral de la médula espinal torácica. Desde este núcleo espinal parten los axones preganglionares que proyectan hacia el ganglio cervical superior (GCS), cuyas fibras posganglionares alcanzan la glándula pineal<sup>5</sup>. Los terminales simpáticos liberan el neurotransmisor (noradrenalina [NA]) hacia el espacio intercelular sin llegar a establecer verdaderos contactos sinápticos con los pinealocitos<sup>6</sup>.

En diversas especies de roedores se han descrito conexiones de naturaleza neuronal entre ciertas regiones del sistema nervioso central (SNC) y la glándula pineal, lo que ha venido a denominarse inervación central o pinealopetal<sup>6</sup>. En su mayoría, estas vías tienen su origen en núcleos del hipotálamo e implican a neurotransmisores clásicos, como serotonina, acetilcolina y dopamina, o péptidos como la arginina vasopresina, vasotocina, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), NPY, somatostatina y TRH.

## LA GLÁNDULA PINEAL COMO ÓRGANO ENDOCRINO

El principal producto de secreción sintetizado por la glándula pineal es la melatonina (N-acetil-5 metoxitriptamina; fig. 2), hormona de naturaleza metoxiindólica derivada del triptófano. No obstante, las células pineales secretan otras indolaminas producidas como consecuencia del metabolismo indólico en la glándula (fig. 2). De esta forma, se ha observado que la serotonina (5-HT), cuya concentración en la glándula pineal excede a la de cualquier otro órgano corporal, no es un mero intermediario en la biosíntesis de melatonina. La 5-HT presenta variaciones circadianas en la mayoría de las especies, con valores más elevados durante las horas de luz y menores durante las horas de oscuridad, probablemente como resultado de cambios en su tasa de metabolización<sup>7</sup>. Algunos autores han demostrado que la glándula pineal es capaz de secretar 5-HT en respuesta a una estimulación con NA, efecto mediado por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos<sup>8,9</sup>, sugiriéndose un posible papel regulador de la 5-HT sobre la respuesta del pinealocito a la NA<sup>10</sup>. La 5-

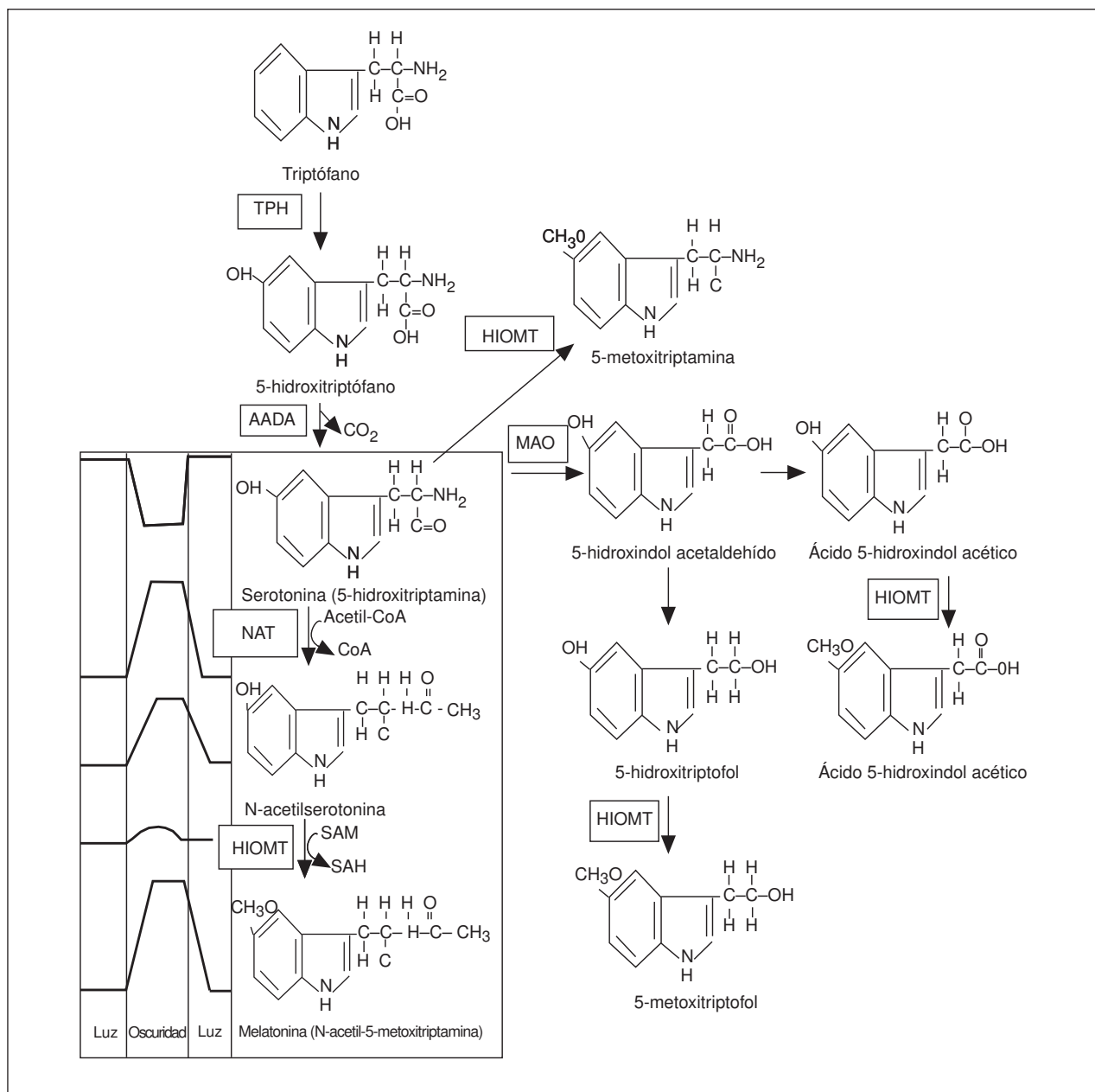


Fig. 2. Metabolismo indólico en la glándula pineal. El cuadro de la izquierda representa los principales pasos enzimáticos en la síntesis de melatonina, y evidencia esquemáticamente las variaciones diarias en la concentración de cada compuesto y en la actividad de las enzimas implicadas. AADA: aminoácido aromático descarboxilasa; CoA: coenzima A; HIOMT: hidroxindol-O-metil-transferasa; MAO: monoaminooxidasa; NAT: N-acetiltransferasa; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; TPH: triptófano hidroxilasa. (Tomada de Alonso, 1992.)

HT, además de ser transformada a melatonina, puede ser metabolizada a 5-hidroxitriptamina o a 5-metoxitriptofol (fig. 2), que es secretado a la circulación de acuerdo con un patrón circadiano<sup>11,12</sup>. De ambos compuestos se ha sugerido una hipotética actividad endocrina, aunque su función hormonal aún no ha sido aclarada. Además, en la glándula pineal han sido aislados una serie de péptidos, entre los que destaca la arginina vasotocina (AVT)<sup>13</sup> con una importante actividad sobre las funciones reproductivas y con una estructura similar a la vasopresina y oxitocina, también identificadas en la pineal.

### Biosíntesis de melatonina en la glándula pineal

La ruta de síntesis de toda la serie de hidroxi y metoxiindoles en la glándula pineal, tales como la serotonina y la propia melatonina, ha sido extensamente estudiada y descrita por varios autores<sup>11,14-16</sup>. Tal y como se ilustra en la figura 3 el primer paso en la biosíntesis de melatonina es la captación de su precursor, el triptófano, desde el torrente circulatorio. Este proceso se lleva a cabo en contra de un gradiente de concentración<sup>17</sup>. El triptófano es hidroxilado en la posición 5 del anillo indólico, reacción catalizada por la enzima

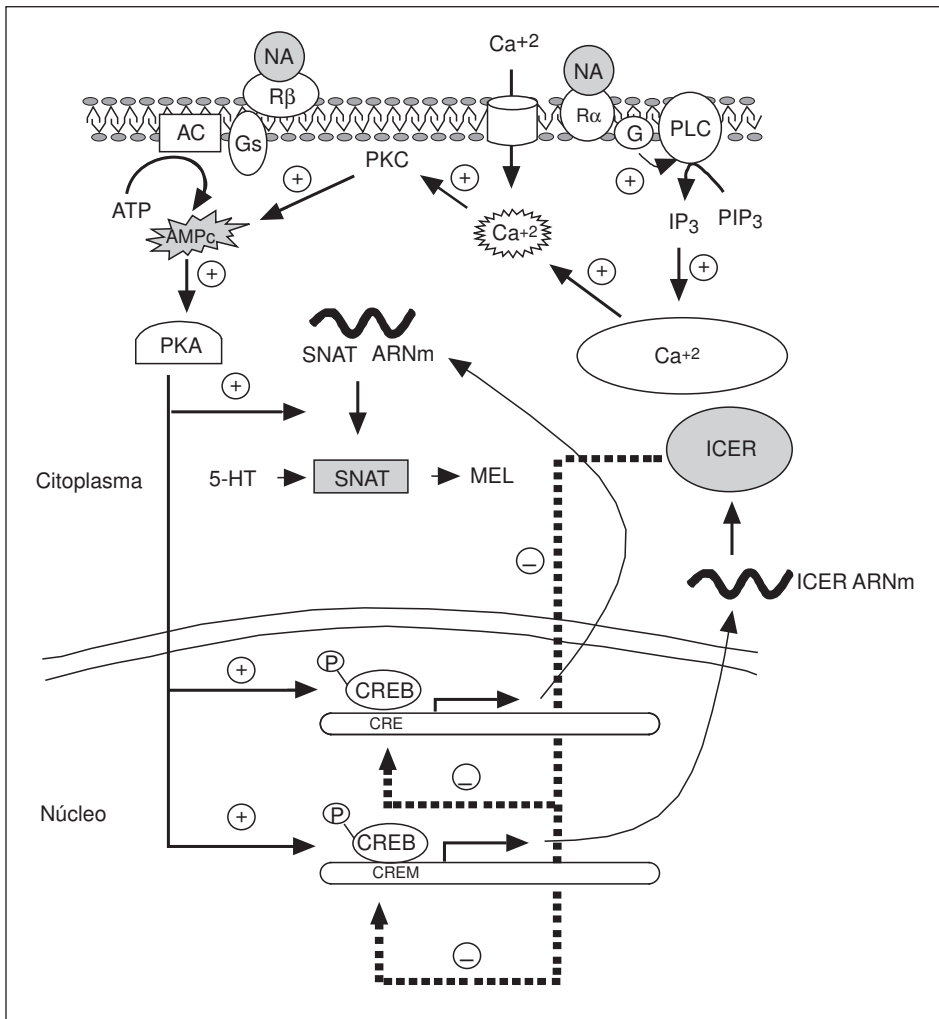


Fig. 3. Regulación noradrenérgica de la biosíntesis de melatonina en la glándula pineal. El esquema demuestra los mecanismos de segundos mensajeros activados por la interacción de la noradrenalina con los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta$ -adrenérgicos, así como la regulación de la expresión génica de la SNAT. NA: noradrenalina; R $\beta$ : receptor  $\beta$ -adrenérgico; AC: adenilato ciclasa; Gs: proteína fijadora de nucleótidos de guanina (proteína Gs); R $\alpha$ : receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico; PKC: proteína cinasa C; PLC: fosfatidilinositol fosfodiesterasa (fosfolipasa C); PIP $_3$ : fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato; IP $_3$ : inositol trifosfato; PKA: proteína cinasa A; CREB: proteína que se fija al elemento de respuesta a AMPc; CRE: elemento de respuesta a AMPc; CREM: elemento modulador de la respuesta a AMPc; ICER: represor temprano inducible por AMPc; 5-HT: serotonina; MEL: melatonina, SNAT: serotonina N-acetil transferasa.

triptófano hidroxilasa (TPH, E.C.1.14.3.b)<sup>18</sup>. El 5-hidroxitriptófano formado es rápidamente transformado a 5-HT mediante una descarboxilación llevada a cabo por la enzima L-aminoácido-aromático descarboxilasa (E.C.4.1.1.28). La 5-HT sufre una reacción de N-acetilación en su extremo amino catalizada por la enzima serotonina-N-acetil transferasa (SNAT; E.C.2.3.1.87), originando la 5-hidroxi-N-acetil serotonina (NAS), siendo éste el paso limitante en la biosíntesis de melatonina<sup>19,16</sup>. La SNAT presenta diferencias cinéticas y estructurales con la arilamina-N-acetil transferasa (NAT) existente en tejidos, como el hígado, sangre o la propia pineal<sup>20</sup>. La NAT pineal no acetila indolaminas, su actividad no es inducible por la noradrenalina (NA) y puede ser separada de la SNAT por HPLC. Finalmente la NAS es transformada en melatonina mediante una reacción de metilación del grupo hidroxilo situado en la posición 5 del anillo indólico, paso catalizado por la enzima hidroxindol-O-metil-transferasa (HIOMT, E.C.2.1.1.4)<sup>21</sup>.

### Variaciones circadianas en el metabolismo pineal

Teniendo en cuenta que la biosíntesis de melatonina pineal está regulada por el fotoperíodo, no es de extrañar que, tanto las actividades enzimáticas como los productos de las reacciones que catalizan, sufran variaciones circadianas. En

todas las especies estudiadas, tanto de actividad diurna como nocturna, la producción y secreción de melatonina es mínima durante el día y se incrementa de forma brusca durante las horas de oscuridad. La sincronización entre la biosíntesis de la hormona y el ciclo luz-oscuridad ambiental se realiza fundamentalmente a través de la inervación periférica simpática. El peso específico de dicha vía neural sobre el control circadiano del metabolismo pineal ha sido puesto de manifiesto por diversos autores<sup>4,22</sup>. Así, se ha descrito un incremento nocturno en la concentración de NA liberada desde los terminales simpáticos durante la fase oscura del ciclo<sup>23</sup>, una pérdida del ritmo circadiano en la actividad SNAT y valores de melatonina pineal tras la ablación de la ruta neural que se inicia en la retina<sup>24</sup>, o la evocación del mismo mediante la estimulación eléctrica de las neuronas del GCS<sup>25</sup>.

Durante la noche, el NSQ envía una señal nerviosa a la glándula pineal a través de la vía que, tras hacer sinapsis en el GCS, alcanza la glándula mediante las neuronas posganglionares simpáticas, que descargan NA de forma masiva en las cercanías de las células pineales. El aumento en la liberación de NA durante las horas de oscuridad se ha confirmado recientemente a través de la monitorización de las concentraciones del neurotransmisor mediante técnicas de microdialisis<sup>26</sup>. El incremento en los valores nocturnos de



NA en la glándula pineal conduce a un aumento en la expresión y actividad de la SNAT<sup>27-29</sup>, y a una elevación en la síntesis y liberación de melatonina hacia la mitad de la fase oscura. Consecuencia de ello es que la 5-HT, sustrato de la SNAT, presenta un marcado ritmo circadiano, con valores máximos durante la fase de luz, que descienden bruscamente durante la noche<sup>30</sup>. Quizá como forma de paliar este déficit, la TPH, enzima limitante en la biosíntesis de la 5-HT<sup>31</sup>, también incrementa su actividad durante la fase oscura<sup>32,33</sup>, reduciendo de igual forma las concentraciones nocturnas de triptófano<sup>17</sup>. Aunque existen evidencias de una activación noradrenérgica de la HIOMT<sup>34, 35</sup>, y los primeros estudios demostraron la existencia de un ritmo circadiano en la actividad de la enzima similar al de la SNAT<sup>36,37</sup>, intentos más recientes emprendidos por otros laboratorios con el objeto de confirmar este resultado han sido infructuosos<sup>38</sup>. Sin embargo, Gauer en 1996 describió una variación rítmica en los niveles del ARNm de la enzima<sup>39</sup>, que el autor atribuye a un reloj interno de la pineal, ya que dicho ritmo persiste en animales mantenidos en oscuridad continua.

El ciclo luz-oscuridad también afecta a la expresión de los receptores de NA presentes en el pinealocito<sup>40</sup>. En este sentido, se ha descrito un ritmo circadiano en valores de ARNm de los receptores  $\beta_1$ <sup>41,42</sup> y  $\alpha_1$ -adrenérgicos<sup>43</sup>, con máximos hacia la mitad de la fase oscura, coincidiendo con los valores más elevados de unión para el receptor  $\beta_1$ <sup>44</sup>. Durante el día, las señales nerviosas procedentes de la retina alcanzan el NSQ a través del tracto retinohipotalámico y deprimen su actividad, disminuyendo de esta forma la producción y liberación de melatonina hasta las concentraciones basales.

#### Regulación de la biosíntesis y secreción de melatonina por la noradrenalina

La NA liberada desde los terminales simpáticos interactúa con los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos situados en la membrana del pinealocito (fig. 3)<sup>40</sup>. Los mecanismos de transducción de la señal noradrenérgica presentes en las células pineales son esencialmente idénticos a los observados en otras áreas del sistema nervioso, como el hipotálamo y la corteza<sup>45</sup>.

#### La estimulación $\beta$ -adrenérgica

La estimulación del receptor  $\beta$  se traduce en una activación de la adenilato ciclasa (AC), a la que se encuentra acoplado mediante una proteína fijadora de nucleótidos de guanina (proteína Gs). Ello conduce a un rápido incremento, de unas 60 a 100 veces, en los valores intracelulares de AMPc producido por la AC a partir de ATP<sup>45,46</sup>.

#### La estimulación $\alpha$ -adrenérgica

Sin embargo, la máxima respuesta se produce cuando la NA interactúa simultáneamente con los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Aunque la estimulación aislada del receptor  $\alpha$  no tiene efecto alguno sobre los valores basales de AMPc, potencia de forma sinérgica la producción de este segundo mensajero inducida por el receptor  $\beta$  (sinergismo  $\alpha$ - $\beta$ )<sup>47</sup>. Estudios farmacológicos realizados en este sentido indican que el receptor implicado pertenece al subtipo  $\alpha_1$ <sup>35,47</sup>, que se encuentra acoplado mediante una proteína G a la enzima fosfatidilinositol fosfodiesterasa (fosfolipasa C, PLC). De esta forma la activación de dicho receptor induce la hidrólisis del fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (PIP<sub>2</sub>) a inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG)<sup>48,49</sup>. Mediante el IP<sub>3</sub> formado, la NA incrementa la concentración intracelular de calcio ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) a través de la movilización de los reser-

rios citoplasmáticos de este ion<sup>50,51</sup>, que conduce a una traslocación hacia la membrana plasmática y posterior activación de la proteína cinasa dependiente de calcio [Ca<sup>2+</sup>] (proteína cinasa C [PKC])<sup>52,53</sup>. Sin embargo, en el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por la NA también está involucrada la entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el medio externo<sup>50,51</sup>. Este flujo de Ca<sup>2+</sup> desde el medio extracelular se lleva a cabo a través de canales de membrana cuya señal de apertura es precisamente el aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> debida a la movilización de los reservorios intracelulares del ion por el IP<sub>3</sub><sup>50</sup>. Se trata de un fenómeno denominado *mecanismo de entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup>* que conecta la vía de los inositoles fosfato con la entrada de Ca<sup>2+</sup> mediada por la activación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico<sup>54</sup>. De esta manera, la corriente de entrada de Ca<sup>2+</sup>, caracterizada electrofisiológicamente como I<sub>CRAC</sub> (*calcium release-activated calcium current*), se produce con posterioridad a la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los almacenes intracelulares, y su función principal es amplificar la duración de la señal de Ca<sup>2+</sup> en respuestas tónicas y mantenidas, como la biosíntesis de una hormona<sup>54</sup>. En pinealocitos de aves también se han obtenido pruebas de la existencia de corrientes capacitativas de Ca<sup>2+</sup> evocadas por el vaciamiento de los reservorios intracelulares de este ion<sup>55</sup>. Toda una serie de evidencias experimentales señalan a la PKC como la responsable, en último término, del sinergismo  $\alpha_1$ - $\beta$ . En este sentido cabría señalar que: a) el incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es estímulo suficiente para la activación de la enzima<sup>52</sup>, y b) la potenciación de la respuesta a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica puede ser simulada incubando las células pineales con isoproterenol (ISO, agonista  $\beta$ -adrenérgico) junto con agentes ionóforos que elevan el [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub><sup>56</sup>, o junto con activadores directos de la PKC, como los ésteres del forbol y diacilglicerol sintéticos<sup>57,49,58</sup>. Los mecanismos que subyacen en tal potenciación aún no han sido aclarados. Aunque en membranas obtenidas a partir de plaquetas humanas se ha descrito una supresión del efecto inhibitorio de las proteínas Gi sobre la AC tras su fosforilación por la PKC<sup>59</sup>, este fenómeno ha sido descartado en pinealocitos<sup>60</sup>, y se ha sugerido una fosforilación directa sobre las proteínas Gs o la propia AC.

Por otro lado, la interacción de la NA con los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta$ -adrenérgicos, provoca una hiperpolarización en el pinealocito<sup>61,62</sup>. Este efecto es debido a una corriente de salida de potasio a través de canales dependientes de Ca<sup>2+</sup>. La inducción de esta corriente está provocada por el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediado por el receptor  $\alpha_1$ , siendo además potenciada por la estimulación simultánea del receptor  $\beta$ . El significado fisiológico de esta hiperpolarización podría residir en favorecer la entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el medio externo gracias al aumento en el gradiente eléctrico provocado por dicho fenómeno. Las células pineales poseen además canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, cuya apertura incrementa la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> al permitir su entrada desde el medio externo. Estos canales pueden ser activados despolarizando la membrana del pinealocito con K<sup>+</sup>, efecto que es inhibido por el nifedipino, lo que prueba que se trata de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje del tipo L<sup>56,63,64</sup>.

#### La señal de AMPc: regulación de la expresión génica de SNAT

La elevación en los valores intracelulares de AMPc se traduce en la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (proteína cinasa A [PKA]). La PKA a través de reacciones de fosforilación incrementa la actividad enzimática de la SNAT induciendo la transcripción del gen que la codifica y la posterior traducción del ARNm formado, además de estabilizar directamente la propia proteína una vez

formada (fig. 3). De esta forma el sinergismo existente entre los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta$ -adrenérgicos sobre la señal de AMPc también se hace patente en la actividad SNAT que, tanto *in vivo* como *in vitro*, alcanza sus valores máximos tras la estimulación simultánea de ambos receptores<sup>35</sup>. Además de valores elevados de AMPc, la activación de la SNAT necesita de la hiperpolarización del pinealocito producida por la NA<sup>62</sup>.

El incremento en la actividad SNAT mediado por el AMPc requiere como primer paso el aumento en su expresión génica. Prueba de ello es que alcanzar la máxima actividad enzimática requiere de 5-6 h de estimulación con NA o agonistas  $\beta$ -adrenérgicos<sup>35</sup>, siendo este efecto bloqueado por inhibidores de la transcripción como la actinomicina D<sup>65</sup>. Las subunidades catalíticas de la PKA, activada por el AMPc, se traslocan al núcleo celular, donde fosforilan los residuos de serina de un factor de transcripción denominado CREB (*cAMP responsive element binding protein*)<sup>66</sup>. La forma fosforilada del CREB (p-CREB) regula la transcripción de los genes CRE (*cAMP responsive element*) y CREM (*cAMP-responsive element modulator*)<sup>66</sup>. La interacción del p-CREB con el CRE conduce a un aumento en la transcripción del gen de la SNAT<sup>67</sup>. La posterior traducción del ARNm formado y la estabilización de la enzima, ambos procesos favorecidos directamente por la PKA, se traduce en el incremento nocturno en la actividad SNAT y, en consecuencia, en la biosíntesis de melatonina. De forma simultánea, la interacción del p-CREB con el gen CREM induce la expresión y síntesis del factor de transcripción ICER (*inducible cAMP early repressor*), que es un potente represor de los genes inducibles por AMPc, uniéndose con una afinidad muy elevada a la secuencia CRE<sup>66,68</sup>. El ICER ejerce efectos de carácter inhibitorio, reprimiendo tanto la expresión de la SNAT como su propia transcripción. La importancia del papel que desempeña el ICER en el declive que experimentan tanto la cantidad como la actividad SNAT hacia el final de la fase oscura ha sido bien establecida. En primer lugar, su transcripción está regulada por la inervación noradrenérgica procedente del ganglio cervical superior<sup>68</sup>. En segundo lugar, la expresión del ICER presenta un claro ritmo circadiano muy similar al de la SNAT, con un máximo entre las 4-6 h previas al inicio de la fase luminosa del ciclo luz-oscuridad<sup>68</sup>. En tercer lugar, la ausencia del dominio de fosforilación aminoterminal en el ARNm del ICER pone en evidencia la inexistencia de un proceso de regulación postranscripcional y relaciona directamente su grado de expresión con su actividad<sup>68</sup>. Por último, hacia el final de la fase oscura, el ICER inhibe su propia transcripción, siendo imposible su inducción en presencia de luz, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Aunque es evidente el papel del promotor CRE referente a la regulación de la expresión de la SNAT, recientemente se ha descubierto un nuevo promotor denominado CCAAT, que es activado por miembros de una familia de proteínas denominada CATBP. El CCAAT actuaría de forma combinada con el CRE en la inducción transcripcional de la enzima<sup>67</sup>.

#### Mecanismos no genómicos de control de la SNAT

Hacia el final de la fase oscura del ciclo, la brusca disminución en la actividad SNAT se produce de forma simultánea con el declive en la cantidad de la enzima y su ARNm<sup>29,69</sup>. Ello sugiere que, además de la inhibición en su expresión, debe existir algún mecanismo postranscripcional de inactivación rápida de la enzima. En este sentido Gastel et al<sup>69</sup> han demostrado que la elevación nocturna en la actividad y cantidad de la SNAT puede ser impedida de forma

inmediata tras el bloqueo de la señal neural procedente del GCS mediante una exposición corta a la luz o tras 15 min de la administración de propranolol, un antagonista  $\beta$ -adrenérgico. *In vitro*, el efecto del propranolol es bloqueado por la presencia del dibutiril-AMPc o inhibidores de la proteólisis. Estos datos evidencian una regulación rápida ejercida por el AMPc sobre la SNAT, e impiden las reacciones de proteólisis y favorecen, de este modo, la estabilidad de la enzima. En ausencia de luz, este mecanismo actuaría de forma complementaria con la inducción transcripcional de la enzima mediada por el AMPc. Al finalizar la fase nocturna del ciclo, el efecto represor del ICER junto con la proteólisis de la enzima, activada tras la caída de los valores de AMPc (debido al descenso en la descarga de NA), serían los elementos responsables en la disminución de la SNAT hasta sus valores basales diurnos.

Por último, en experimentos realizados *in vitro* se ha podido constatar la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por la PKC sobre la ruta de segundos mensajeros asociada al receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico<sup>70</sup>. En este sentido, una exposición previa de las células pineales a ésteres del forbol, ejerce un efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> y la entrada de Ca<sup>2+</sup> producidos tras la estimulación con NA o fenilefrina (PHE, agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico).

#### REGULACIÓN HORMONAL DE LA FUNCIÓN PINEAL

Tal y como se ha descrito hasta el momento, la biosíntesis de la melatonina se encuentra controlada principalmente por la inervación periférica noradrenérgica. Sin embargo, se sabe que la melatonina regula la fisiología del resto del sistema endocrino y es la responsable de sus adaptaciones circadianas y estacionales en relación con el fotoperíodo<sup>2</sup>. No es de extrañar, por tanto, que los valores de hormonas circulantes modifiquen a su vez la síntesis de la hormona pineal<sup>5</sup>. Ello le confiere un doble carácter de a) transductor neuroendocrino, transformando una señal nerviosa constituida por la liberación de NA en otra endocrina mediante la síntesis de melatonina, y b) de transductor endocrino-endocrino, detectando cambios en la secreción de diversas hormonas que modifican la producción de melatonina. Especial atención merecen los esteroides gonadales debido a la fuerte influencia de la melatonina sobre la fisiología de la reproducción, actuando sobre el eje hipotálamo-adenohipofisario-gonadal de un modo generalmente inhibitorio. De la misma manera, las hormonas sexuales regulan las concentraciones circulantes de melatonina, actuando directamente sobre la pineal o modificando diversos aspectos funcionales de la vía neural que la inerva. Los cambios en los valores séricos de melatonina durante el ciclo del estro en la rata hembra constituyen un buen ejemplo de tales efectos. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio, así como los aportados por otros autores, señalan a las hormonas ováricas, estradiol (E<sub>2</sub>) y progesterona (Pg), como potentes agentes reguladores del metabolismo pineal<sup>71,72</sup>.

#### Efectos de las hormonas ováricas sobre el metabolismo pineal

La presencia de receptores para hormonas ováricas ha sido ampliamente documentada desde la década de los setenta en estudios realizados por Cardinali. Mediante ensayos de unión empleando E<sub>2</sub> y Pg marcadas con tritio, se identificaron receptores para ambas hormonas que presentaban una cinética de activación con características similares a las observadas en otros tejidos, tales como el útero u ovario<sup>73,74</sup>. Por otra parte, un estudio reciente ha demostrado la

presencia en la glándula pineal del ARNm correspondiente al subtipo  $\beta$  del receptor de estrógenos (RE)<sup>72,75</sup>.

### Cambios en la bioquímica pineal durante el ciclo del estro

Las variaciones más bruscas que afectan al metabolismo pineal durante el ciclo ovárico suceden durante la fase de proestro de la rata, momento en el que las concentraciones plasmáticas de  $E_2$  y Pg son máximas. Varios autores han descrito una disminución en los niveles nocturnos de melatonina pineal<sup>76-78</sup>, así como en su excreción urinaria<sup>79</sup> durante esta fase. También se ha encontrado un descenso en la actividad de la SNAT pineal en las primeras horas de la noche del proestro<sup>80</sup>, así como un descenso en la cantidad de serotonina<sup>78</sup> y en la actividad HIOMT<sup>81</sup>. En relación a la HIOMT, Morton y Forbes han aportado evidencias de una inhibición competitiva de la misma ejercida por el  $E_2$  y Pg a concentraciones que se encuentran dentro del rango fisiológico<sup>82</sup>; asimismo, durante esta fase disminuye el contenido de fosfolípidos<sup>83</sup>, proteínas<sup>76</sup>, arginina vasopresina<sup>78</sup> (AVP) y de péptido vasointestinal<sup>84</sup> (VIP). También se ha encontrado una reducción en la actividad AC y contenido de AMPc en glándulas obtenidas de ratas en proestro e incubadas *in vitro* con NA<sup>85,86</sup>. En sintonía con estos resultados, en nuestro laboratorio hemos observado que la estimulación *in vitro* de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico es incapaz de potenciar la respuesta  $\beta$  en pinealocitos procedentes de ratas hembras en fase de proestro<sup>87</sup>.

### Efecto de la ovariectomía y la administración de hormonas ováricas

Con el objeto de confirmar si los efectos anteriormente descritos están mediados por los esteroides ováricos, se han estudiado las consecuencias de su eliminación mediante ovariectomía bilateral (OVX) y su posterior reposición en forma de implantes subcutáneos o inyecciones de  $E_2$  y Pg. La OVX afecta a la glándula pineal desde un punto de vista morfológico y funcional. Esta manipulación quirúrgica produce un incremento en el peso de la glándula<sup>88,89</sup>, así como claras evidencias de hipertrofia<sup>89,90</sup>. Los cambios en la bioquímica pineal que acompañan a la OVX son diversos y señalan, al igual que las evidencias reseñadas en el apartado anterior, hacia una regulación de carácter inhibitorio ejercida por las hormonas ováricas. Tras la OVX se produce un incremento en la producción nocturna de melatonina<sup>79,91</sup>, en la actividad SNAT<sup>92</sup>, en la actividad HIOMT<sup>93</sup>, en el contenido de fosfolípidos<sup>83</sup>, en la actividad AC en respuesta a la estimulación con NA<sup>85</sup>, y en los valores de AMPc producidos en respuesta a la estimulación  $\alpha_1$ - $\beta$ -adrenérgica<sup>87</sup>. Utilizando otra estrategia experimental, en nuestro laboratorio hemos abordado el estudio de la regulación esteroidea de la función pineal antagonizando químicamente las acciones del  $E_2$  y Pg, y observando posteriormente su efecto sobre la respuesta del pinealocito a la estimulación adrenérgica<sup>87</sup>. Con este fin se cuantificaron los valores de AMPc producidos tras la estimulación adrenérgica de células pineales procedentes de ratas hembra en proestro tratadas con el antiestrógeno tamoxifeno (Tx) y el antiprogéstágeno RU486. Los resultados obtenidos evidenciaron que la administración de Tx o RU486 incrementó la respuesta  $\beta$  o  $\alpha_1$ - $\beta$ -adrenérgica, existiendo potenciación  $\alpha_1$ - $\beta$  únicamente cuando se antagonizó la acción de ambas hormonas ováricas con la combinación Tx + RU486<sup>87</sup>.

Con respecto a los efectos producidos tras la administración de  $E_2$  y Pg a animales OVX, los datos aportados por diferentes autores son contradictorios debido a las diferencias en las dosis y pautas de tratamiento utilizadas<sup>71</sup>. La adminis-

tración de  $E_2$  abole la hipertrofia producida por la OVX<sup>89</sup>, reduce los valores nocturnos de melatonina y actividad HIOMT<sup>91,93</sup>, y reduce la actividad SNAT incrementada tras la OVX<sup>92</sup>. El tratamiento con  $E_2$  de ratas OVX bloquea el incremento en los valores de melatonina y serotonina pineal inducidos por la administración de ISO<sup>78</sup>, así como los valores séricos de melatonina y la excreción urinaria de su principal metabolito, la 6-sulfatoximelatonina, tras el mismo tratamiento<sup>94</sup>. Asimismo, el estrógeno administrado *in vivo* inhibe la activación de la AC y el aumento en las concentraciones de AMPc en pineales estimuladas *in vitro* con NA<sup>85</sup>. Por último, cabe reseñar que se han aportado datos referidos a una reducción en la densidad de receptores  $\alpha_1$  y  $\beta$  adrenérgicos en la glándula pineal tras la administración de  $E_2$  a ratas OVX<sup>95,96</sup>.

En cuanto al papel que desempeña la progesterona, existen evidencias de que podría ejercer un efecto modulador de carácter inhibitorio sobre el metabolismo pineal. En esta dirección apuntan la disminución en la producción de melatonina en ratas OVX tratadas con Pg o con  $E_2$  + Pg<sup>97</sup>, así como el bloqueo en la síntesis de serotonina y melatonina inducido por la administración de ISO a animales OVX e inyectados con el esteroide<sup>78</sup>. Sin embargo, datos recientes señalan que, al menos durante la etapa peripuberal, la Pg parece no tener efecto alguno sobre la función pineal<sup>91</sup>.

Los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, así como los aportados por otros autores, nos condujeron a plantear la hipótesis de que, en ratas ciclantes, la reducción en el pico nocturno de melatonina observada durante la fase de proestro podría ser la consecuencia de una acción reguladora de carácter inhibitorio sobre el metabolismo pineal ejercida por los esteroides ováricos, y realizada, entre otros mecanismos, a través de la regulación directa de la sensibilidad del pinealocito a la estimulación adrenérgica. Con el fin de verificar la veracidad de esta hipótesis, procedimos a la incubación de células pineales, procedentes de ratas OVX, en presencia de concentraciones fisiológicas de  $E_2$ , estudiando el efecto de tal exposición sobre varias respuestas del pinealocito a la estimulación con agonistas noradrenérgicos<sup>72</sup>. Observamos que el tratamiento directo con  $E_2$  provoca una disminución en la biosíntesis y liberación de melatonina inducidas por la estimulación  $\beta$  o  $\alpha_1$  +  $\beta$ -adrenérgica<sup>72</sup>. Este efecto es debido a que el estrógeno provoca una disminución tanto en la acumulación de AMPc como en la hidrólisis de fosfatidilinositol, que se producen en respuesta a la activación de los receptores  $\beta$ - y  $\alpha_1$ -adrenérgicos respectivamente<sup>72</sup>. Además, encontramos que la incubación con  $E_2$  disminuye sensiblemente el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la estimulación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico o por una despolarización con potasio<sup>72</sup>. Por otro lado, la atenuación de la respuesta  $\beta$ -adrenérgica ejercida por el estradiol involucra un mecanismo anterior a la activación de la AC, y que es independiente de modificaciones en la expresión de proteínas G. Prueba de ello es que la acumulación de AMPc provocada por la estimulación directa de la AC con forskolina, o por la incubación de las células con toxina colérica, no se ven afectadas por la presencia de estradiol en el medio de cultivo<sup>72</sup>. De forma alternativa, el estradiol podría regular la expresión de los receptores adrenérgicos, o bien sus mecanismos de acoplamiento con la AC o la proteína G. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que la modulación de la respuesta de los receptores adrenérgicos producida por el estrógeno se lleva a cabo a través de un mecanismo de naturaleza genómica. En este sentido, hemos identificado la presencia de los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de estradiol en las células pineales. Además, hemos observado que el efecto ejercido por el estrógeno precisa de una latencia de 48 h, y que es necesario el acceso



de la hormona al interior del pinealocito, puesto que la regulación de la sensibilidad de las células pineales a la estimulación adrenérgica no se reproduce cuando se bloquea el paso del E<sub>2</sub> a través de la membrana plasmática mediante su acoplamiento a albúmina bovina.

### Regulación noradrenérgica del receptor de estrógenos (RE) en la glándula pineal

Tal y como demuestran las evidencias descritas hasta el momento, las hormonas ováricas son capaces de modular la sensibilidad del pinealocito a la estimulación noradrenérgica. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de una regulación mutua entre la NE y los esteroides sexuales. En este sentido, una serie de evidencias experimentales aportadas por Cardinali<sup>98-100</sup> indican que la NE liberada desde los terminales simpáticos modula la cinética del RE. Según el modelo clásico aceptado como mecanismo de acción del E<sub>2</sub>, la hormona, una vez que atraviesa la membrana plasmática, interacciona con sus receptores citoplasmáticos, dando origen a un complejo estrógeno-receptor que posteriormente se dirige al núcleo donde ejerce sus efectos mediante la interacción con las secuencias específicas de ADN. En glándulas pineales privadas de la presencia de NE debido a la degeneración de los terminales noradrenérgicos provocada por la GCSx, se ha observado una disminución en la cantidad del RE presente tanto en citoplasma como en el núcleo, así como una inhibición de la síntesis de proteínas inducida por el E<sub>2</sub>. Este efecto es revertido por la administración de NE a animales ganglionectomizados. Además, mediante estudios realizados utilizando agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos, se ha probado que es precisamente el receptor β el principal involucrado en la modulación de la sensibilidad de la glándula pineal a la acción de los estrógenos. Así, la administración de propranolol, un antagonista β-adrenérgico, bloquea totalmente el paso del RE desde el citoplasma hacia el núcleo del pinealocito.

### LA GLÁNDULA PINEAL: UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS DE INTEGRACIÓN NEUROENDOCRINA

Las hormonas esteroideas ejercen sus efectos neuromoduladores sobre el sistema nervioso a través de mecanismos que implican acciones tanto a nivel presináptico, regulando los procesos de biosíntesis y liberación de neurotransmisores, como postsinápticamente, modificando la sensibilidad de las células nerviosas a los mismos<sup>101</sup>. Este último tipo de efectos comprenden acciones sobre el número y/o estado de activación de los receptores neuronales, así como sobre los sistemas intracelulares de transducción de las distintas señales nerviosas. La neurotransmisión noradrenérgica se ofrece como un excelente modelo para el estudio de las modificaciones ejercidas por los esteroides sobre la respuesta a los neurotransmisores. Se trata de un sistema ampliamente estudiado, donde se han caracterizado los tipos de receptores implicados, los distintos mecanismos de señalización intracelular asociados a los mismos y los procesos de intercomunicación entre ellos<sup>102,103</sup>. Por otro lado, numerosas evidencias experimentales indican que los valores circulantes de hormonas ováricas modulan el funcionamiento de los circuitos noradrenérgicos cerebrales pre y postsinápticamente, y que están implicados en la fisiología reproductiva<sup>104</sup>. Para abordar el estudio a escala celular de los mecanismos que subyacen en tales efectos, el pinealocito se ofrece como un buen modelo puesto que: a) una vez dispersas, las células pineales constituyen una preparación postsináptica pura<sup>105</sup>; b) dispone de un sistema de transducción noradrenérgico

con características idénticas a las observadas en otros lugares del sistema nervioso, tales como hipotálamo y corteza<sup>45</sup>; c) dispone de receptores intracelulares para E<sub>2</sub> y Pg; d) se han aportado pruebas de que la biosíntesis y liberación de melatonina pineal se encuentra regulada por las hormonas ováricas<sup>72,78</sup>, y e) existen evidencias de que tales acciones pueden ser ejercidas a escala postsináptica mediante la modulación de la respuesta del pinealocito a la estimulación noradrenérgica<sup>71,87</sup>.

### AGRADECIMIENTO

El trabajo realizado en el laboratorio de los autores ha sido financiado por DGESIC (PB97-1472-C03-01) y DGESIC-Comisión Europea (1FD97-1065-C03-01). Además ha recibido financiación parcial de Lilly S.A., Astra-Zeneca, ITC y CEPESA. El trabajo de Francisco Javier Hernández Díaz y Juan José Sánchez han sido financiados a través de becas de investigación concedidas por la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno Autónomo de Canarias y Laboratorios Lilly S.A., respectivamente.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Pévet P. Anatomy of the pineal gland of mammals. En: Relkin R, editor. The pineal gland. Nueva York: Elsevier, 1983; 1-75.
2. Reiter RJ. Pineal gland: interface between the photoperiodic environment and endocrine system. *T Endocrinol Metab* 1991; 2: 13-29.
3. Alonso R. La glándula pineal. En: Tresguerras JAF, editor. Fisiología médica. Madrid: Ed. Interamericana McGraw-Hill, 1999; 891-901.
4. Moore RY. The supraquiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. *Trends Neurosci* 1982; 5: 404-406.
5. Reiter RJ. Pineal melatonin production. Photoperiodic and hormonal influences. En: Reiter RJ, editor. Advances in pineal research. Londres: John Libbey, Co., Ltd, 1986; 77-78.
6. Korf HW, Moller M. The innervation of the mammalian pineal gland with especial reference to the central pinealoptal projections. En: Reiter JR, editor. Pineal research reviews. Nueva York: Alan R. Liss, 1984; 41-86.
7. Quay WB. Circadian rhythm in the rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol* 1963; 3: 473-479.
8. Aloyo VJ, Walker RF. Noradrenergic stimulation of serotonin release from rat pineal glands in vitro. *J Endocrinol* 1987; 114: 3-9.
9. Aloyo VJ, Walker RF. Alpha-adrenergic control of serotonin release from rat pineal glands. *Neuroendocrinology* 1988; 48: 61-66.
10. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989; 45: 922-932.
11. Wurtman RJ, Ozaki Y. Physiological control of melatonin synthesis and secretion: Mechanisms generating rhythms in melatonin, methoxytryptophol, and arginine vasotocin levels and effects on the pineal of endogenous catecholamines, the estrous cycle, and environmental lighting. *J Neural Transm* 1978; 13: 59-70.
12. Mullen PE, Linsell CR, Leone RM, Silman RE, Smith I, Hooper RJ et al. Melatonin and 5-methoxytryptophol, the 24 hour pattern of secretion in man. *Adv Biosci* 1981; 29: 337-342.
13. Milcu SM, Pavel S, Neacsu C. Biological and chromatographic characterization of a polypeptide with pressor and oxytocic activities isolated from bovine pineal gland. *Endocrinology* 1963; 72: 563-566.
14. Quay WB. Pineal Chemistry in Cellular and Physiological Mechanism. En: Thomas CC, editor. Pineal Chemistry. Springfield: 1974; 175-192.
15. Klein DC. Circadian rhythms in the pineal gland. En: Krieger D, editor. Endocrine rhythms. Nueva York: Raven Press, 1979; 203-223.
16. Ebadi M. Regulation of synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. En: Reiter RJ, editor. The pineal gland. Nueva York: Raven Press, 1984; 1-37.
17. Sugden D. Circadian changes in the rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem* 1979; 33: 811-820.
18. Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylation: Measurement in pineal gland, brainstem and carcinoid tumor. *Science* 1967; 155: 217-219.
19. Klein DC, Berg GR. Pineal gland: Stimulation of melatonin production by norepinephrine involves cyclic AMP-mediated stimulation of N-acetyltransferase. *Adv Biochem Physicopharmacol* 1970; 3: 241-263.
20. Voisin P, Namboodiri MA, Klein DC. Arylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem* 1984; 259: 10913-10918.
21. Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 1960; 131: 1312.
22. Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 1996; 73: 125-130.



23. Wurtman RJ, Axelrod J. A 24-hour rhythm in the control of norepinephrine in the pineal and salivary glands of the rat. *Life Sci* 1974; 5: 665-666.
24. Reiter RJ, Rudden PK, Banks AF, Rollag MD. Acute effects of unilateral or bilateral superior cervical ganglionectomy on rat pineal N-acetyltransferase and melatonin content. *Experientia* 1979; 35: 691-692.
25. Chang YS, Cheung YM, Pang SF. Pulsatile release of pineal melatonin in the rabbit. En: Reiter RJ and Pang SF, editor. *Advances in Pineal Research*. Londres: John Libbey, 1989; 185-188.
26. Drijfhout WJ, Van der Linde AG, Kooi SE, Grol CJ, Westering BHC. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by *in vivo* microdialysis. *J Neurochem* 1996; 66: 748-755.
27. Rudden PK, Reiter RJ, Vaughan MK. Pineal serotonin-N-acetyltransferase in four mammalian species. *Neurosci Lett* 1975; 1: 225-229.
28. Klein DC, Schaad NL, Namboodori L, Yu L, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem Soc Transact* 1992; 20: 299-304.
29. Borigin J, Wang MM, Snyder S. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 1995; 378: 783-785.
30. King TS, Steger RW, Steinlechner S, Reiter RJ. Day-night differences in estimates rates of 5-hydroxytryptamine turnover in the rat pineal gland. *Exp Brain Res* 1984; 54: 432-436.
31. Ichiyama A, Nakamura S, Nishizuka Y, Hayaishi O. Enzymatic studies on the biosynthesis of serotonin in mammalian brain. *J Biol Chem* 1970; 245: 1699-1709.
32. Sitaram BR, Lees GL. Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem* 1978; 42: 1183-1185.
33. Hernández FJ, Abreu P, Díaz Cruz AT, Alonso R. Simultaneous HPLC analysis of tryptophan hydroxylase activity and serotonin metabolism in rat pineal gland: determination of its kinetics properties. *J Liquid Chromatogr* 1994; 13: 2939-2950.
34. Sugden D, Klein DC. Adrenergic stimulation of rat hydroxyindole-O-methyltransferase. *Brain Res* 1983; 265: 348-351.
35. Klein DC, Auerbach DA, Namboodiri MA, Wheler GH. Indole metabolism in the mammalian pineal gland. En: Reiter RJ, editor. *The pineal gland, Volume I, Anatomy and Biochemistry*. Boca Raton: CRC Press, 1981; 199-227.
36. Axelrod J, Wurtman R, Snyder SH. Control of hydroxyindole-O-methyl transferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. *J Biol Chem* 1965; 240: 949-955.
37. Yang H, Neff NH. Hydroxyindole-O-methyltransferase: an immunohistochemical study of the neuronal regulation of the pineal enzyme. *Mol Pharmacol* 1976; 12: 433-439.
38. Sugden D, Ceña V, Klein DC. Hydroxyindole-O-methyltransferase. *Meth Enzymol* 1987; 142: 590-596.
39. Gauer F, Craft CM. Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res* 1996; 737: 99-109.
40. Pangerl B, Pangerl A, Reiter RJ. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm* 1990; 81: 17-29.
41. Carter DA. Up-regulation of  $\beta$ 1-adrenoreceptor messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland: nocturnally through a  $\beta$ -adrenoreceptor-linked mechanism, and *in vitro* through a novel posttranscriptional mechanism activated by specific protein synthesis inhibitors. *Endocrinology* 1993; 133: 2263-2268.
42. Moller M, Pujito PP, Morgan KC, Badiu C. Localization and diurnal expression of mRNA encoding the  $\beta$ 1-adrenoreceptor in the rat pineal gland: an *in situ* hybridization. *Cell Tissue Res* 1997; 288: 279-284.
43. Coon SL, McCune SK, Sugden D, Klein DC. Regulation of pineal  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA: day/night rhythm  $\beta$ -adrenergic receptor/cyclic AMP control. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 551-557.
44. González-Brito A, Jones DJ, Ademe RM, Reiter RJ. Characterization and measurement of [<sup>125</sup>I]-iodopindol binding in individual rat pineal glands: existence of a 24-h rhythm in  $\beta$ -adrenergic receptor density. *Brain Res* 1988; 738: 108-114.
45. Ho AK, Chik CL. Post-receptor mechanism in dual receptors regulation of second messengers in rat pineal gland. *Prog Comp Endocrinol* 1990; 139-145.
46. Klein DC, Auerbach DA, Wellwe JL. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3', 5'-monophosphate may be signal for "turn off". *Science* 1978; 199: 309-311.
47. Vanecek J, Sugden D, Weller J, Klein DC. Atypical synergistic  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 1985; 116: 2167-2173.
48. Ho AK, Klein DC. Phosphatidylinositol phosphodiesterase (Phospholipase C) activity in the pineal gland: characterization and photoneural regulation. *J Neurochem* 1987; 48: 1033-1038.
49. Ho AK, Chik CL, Klein DC. Permissive role of calcium in  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation of pineal phosphatidylinositol phosphodiesterase (Phospholipase C) activity. *J Pineal Res* 1988; 5: 553-564.
50. Schomerus S, Laedtke E, Korf H. Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem Int* 1995; 27: 163-175.
51. Marín A, Ureña J, Tabares L. Intracellular calcium release mediated by noradrenaline and acetylcholine in mammalian pineal cells. *J Pineal Res* 1996; 21: 15-28.
52. Ho AK, T TP, Chik CL, Anderson WB, Klein DC. Protein kinase C: subcellular redistribution by increased Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem* 1988; 263: 9292-9297.
53. Sugden D. Ontogeny of pineal protein kinase C activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 701-706.
54. Putney JW. Excitement about calcium signaling in unexcitable cells. *Science* 1993; 262: 676-678.
55. D'Souza T, Dryer SE. Intracellular free calcium in dissociated cells of the chick pineal gland: regulation by membrane depolarization, second messengers and neuromodulator, and evidence of intracellular calcium stores. *Brain Res* 1994; 656: 85-94.
56. Sugden LA, Sugden D, Klein DC. Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *J Biol Chem* 1986; 261: 11608-11612.
57. Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas PT, Anderson WB. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 1985; 314: 359-361.
58. Sugden D, Klein DC. Activators of protein kinase C act at postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. *J Neurochem* 1988; 50: 149-155.
59. Katada T, Gilman AG, Watanabe Y, Bauer S, Jakobs KH. Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppress its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem* 1985; 151: 431-437.
60. Sugden D. Pertussis toxin does not inhibit  $\alpha$ 1-adrenergic potentiation of  $\beta$ -adrenergic stimulation of cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 871-877.
61. Castellano A, López-Barneo J, Armstrong CM. Potassium current in dissociated cells of the rat pineal gland. *Pflügers Arch* 1989; 413: 644-650.
62. Ceña V, Halperin JJ, Yeandle S, Klein DC. Norepinephrine stimulates potassium efflux from pinealocytes: evidence for involvement of biochemical "AND" gate operate by calcium and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 1991; 128: 559-569.
63. Sugden LA, Sugden D, Klein DC.  $\alpha$ 1-adrenoreceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem* 1987; 262: 741-745.
64. Letz B, Schomerus C, Maronde E, Korf HW, Korbmacher C. Stimulation of a nicotinic ACH receptor causes depolarization and activation of L-type calcium channels in rat pinealocytes. *J Physiol* 1997; 499: 329-340.
65. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 1996; 137: 3033-3045.
66. Stehle JH. Pineal gene expression: Dawn in a dark matter. *J Pineal Res* 1995; 18: 179-190.
67. Baler R, Covington S, Klein DC. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. *J Biol Chem* 1997; 272: 6979-6985.
68. Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pévet P, Corsi-Sassone P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 1993; 365: 314-320.
69. Gastel JA, Rosenboom PH, Rinaldi P, Weller JL, Klein DC. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 1998; 279: 1358-1360.
70. Sugden D, Ho AK, Sugden AL, Klein DC. Negative feedback mechanisms: evidence that desensitization of pineal  $\alpha$ 1-adrenergic responses involves protein kinase C. *Endocrinology* 1988; 123: 1425-1432.
71. Alonso R, Abreu P, Fajardo N. Steroid influences on pineal melatonin production. En: Reiter RJ and Hing-Sing Yu, editor. *Melatonin, physiological effects, and clinical applications*. Londres: CRC Press, 1993; 73-105.
72. Hernández-Díaz FJ, Sánchez JJ, Abreu P, López-Coviella I, Tabares L, Prieto L et al. Estrogen modulates alpha1/beta-adrenoreceptor-induced signaling and melatonin production in female rat pinealocytes. *Neuroendocrinology* 2001; 73: 111-122.
73. Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM. Gonadal steroids as modulators of the function of the pineal gland. *Gen Comp Endocrinol* 1975; 26: 50-58.
74. Vacas MI, Lowenstein PR, Cardinali DP. Characterization of a cytosol progesterone receptor in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology* 1979; 29: 84-89.
75. Shughrue PJ, Lane MV, Merenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1997; 388: 507-525.
76. Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM. Effects of estradiol on melatonin and protein synthesis in the rat pineal organ. *Horm Res* 1974; 5: 304-310.

77. Johnson LY, Vaughan MK, Richarson BA, Petterborg LJ, Reiter RJ. Variation in pineal melatonin content during the estrous cycle of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982; 169: 416-419.
78. Moujir F, Sánchez-Franco F, Santana C, Cacicedo L, Alonso R. Immunoreactive levels of pineal arginine vasopressin change during the rat estrous cycle. *J Pineal Res* 1990; 8: 359-366.
79. Ozaki Y, Wurtman RJ, Alonso R, Lynch HJ. Melatonin secretion decreases during the proestrous stage of the rat estrous cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 531-534.
80. Alonso R, Abreu P, Fajardo N, Sánchez-Criado JE. Progesterone does not mediate the inhibition of pineal melatonin production during the rat proestrous night. *Neurosci Lett* 1993; 151: 150-152.
81. Daya S, Potgieter B. Effects of sex steroids on pineal enzymes. *South Afr J Sci* 1982; 78: 174-174.
82. Morton DJ, Forbes HJ. Inhibition of the catalytic activity of the bovine pineal gland hydroxyindole-O-methyltransferase (EC 2.1.14) by estradiol, progesterone and testosterone but not pteridines. *J Pineal Res* 1989; 6: 259-265.
83. Zweens J. Influences of the estrous cycle and ovariectomy on the phospholipid content of the pineal gland in the rat. *Nature* 1963; 197: 1114-1115.
84. Moujir F, Lorenzo MJ, Alonso R, Santana C, Cacicedo L, Sánchez-Franco F. Pineal vasoactive intestinal peptide is reduced during proestrous stage of the rat estrous cycle. *Peptides* 1991; 12: 529-533.
85. Weiss B, Crayton J. Gonadal hormones as regulators of pineal adenyl cyclase activity. *Endocrinology* 1970; 87: 527-532.
86. Davis G. The response of adenosine 3', 5'-monophosphate to norepinephrine in the hypothalamus and pineal organ of female rats in proestrus or diestrus. *Endocrinology* 1978; 103: 1048-1053.
87. Alonso R, Abreu P, Fajardo N, Hernández F, Díaz-Cruz A, Hernández G et al. Ovarian hormones regulate  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoreceptor interactions in female rat pinealocytes. *NeuroReport* 1995; 6: 345-348.
88. Fiske VM, Pound J, Putnam J. Effect of light on the weight of the pineal organ in hypophysectomized, gonadectomized, adrenalectomized or thiouracil-fed rats. *Endocrinology* 1962; 71: 130-133.
89. Sahu A, Chakraborty S. Estradiol modulation of pineal gland activity in the wild bandicoot rat, *Bandicota bengalensis*. *Acta Anat* 1986; 125: 1-5.
90. Das Gupta TD. Cellular hypertrophy in rat pineals after castration. *J Endocrinol* 1968; 41: 607-608.
91. Okatani Y, Watanabe K, Morioka N, Hayashi K, Sagara Y. Nocturnal changes in pineal melatonin synthesis during puberty: relation to estrogen and progesterone levels in female rats. *J Pineal Res* 1997; 22: 33-41.
92. Okatani HK, Watanabe K, Morioka N, Sagara Y. Estrogen modulates the nocturnal synthesis of melatonin in peripubertal female rats. *J Pineal Res* 1998; 24: 224-229.
93. Alexander B, Down AJ, Wolfson A. Effects of prepubertal hypophysectomy and ovariectomy on hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the female rat. *Endocrinology* 1970; 86: 1166-1168.
94. Yie S, Brown GM. Effects of sex hormones on the pineal response to isoproterenol and pineal beta-adrenergic receptors. *Neuroendocrinology* 1995; 62: 93-100.
95. Weiland N, Wise PM. Estrogen alters the diurnal rhythm of  $\alpha$ 1-adrenergic receptor densities in selected brain regions. *Endocrinology* 1987; 121: 1751-1758.
96. Weiland N, Wise PM. Diurnal rhythmicity of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in ovariectomized, ovariectomized estradiol-treated and proestrous rats. *Neuroendocrinology* 1989; 50: 655-662.
97. Wilkinson M, Arendt J. Effects of oestrogen and progesterone on rat pineal N-acetyl transferase activity and melatonin production. *Experientia* 1978; 34: 667-669.
98. Cardinali DP, Gejman PV, Ritta MN. Further evidence of adrenergic control of translocation and intracellular levels of estrogen receptors in rat pineal gland. *Endocrinology* 1983; 112: 492-498.
99. Cardinali DP, Rita MN, Vacas MI, Lowenstein PR, Geyman PV, González-Solveyra C et al. Molecular aspects of neuroendocrine integrative processes on the pineal gland. En: Reiter RJ, editor. *The pineal gland and superior cervical ganglia*. Nueva York: Raven Press, 1984; 83-107.
100. Cardinali DP, Vacas MI, Keller MI, Etchejoyn GS, Pereyra EN, Chuluyan HE. Neuroendocrine integrative mechanism in mammalian pineal gland: effects of steroids and adenohipophysial hormones on melatonin synthesis in vitro. *J Steroid Biochem* 1987; 27: 565-570.
101. Alonso R, López-Coviella I. Gonadal steroids and neuronal function. *Neurochem Res* 1998; 23: 679-692.
102. Petitti N, Etgen AM. Protein kinase C and phospholipase C mediate  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -adrenoreceptor intercommunication in rat hypothalamic slices. *J Neurochem* 1991; 56: 628-635.
103. Roger J, Lynne RM. Adrenoreceptors and their second messenger systems. *J Neurochem* 1993; 60: 10-23.
104. Etgen AM, Ungar S, Petitti N. Estradiol and progesterone modulation of norepinephrine neurotransmission: implications for the regulation of the female reproductive behavior. *J Neuroendocrinol* 1992; 4: 255-271.
105. Buda M, Klein DC. A suspension culture of pinealocytes: regulation of N-acetyltransferase activity. *Endocrinology* 1978; 103: 1483-1492.