



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“El efecto de la melatonina sobre el potencial de  
receptor de células retinulares del acocil  
*Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**BIOL. LEONOR MENDOZA VARGAS**

TUTORA:

DRA. BEATRIZ FUENTES PARDO

México, D.F.

2010.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).




El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PDCB/grad/120Jur/2009

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN**  
**ESCOLAR, UNAM**  
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 243a del 12 de agosto de 2009, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **LEONOR MENDOZA VARGAS**, con número de cuenta **50500818-5**, con la tesis titulada **"EL EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL POTENCIAL DE RECEPTOR DE LAS CÉLULAS RETINULARES DEL ACOCIL Procamburus clarkii EN UN CICLO DE 24 HORAS"**, dirigida por la Dra. Beatriz Fuentes Pardo.

Presidente: Dra. Carolina Escobar Briones  
Secretario: Dra. Beatriz Fuentes Pardo  
Vocal: Dr. Pablo Rudomin Zevnovaty  
Vocal: Dr. Rogelio Arellano Ostoa  
Vocal: Dra. Elia Martha Pérez Armendariz

Atentamente

*"Por mi raza hablará el espíritu"*

Cd. Universitaria, a 12 de agosto de 2009.

  
**DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL**  
**RESPONSABLE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado. UNAM  
Tutor (a) Dra. Beatriz Fuentes Pardo.  
Coordinación de PDCB.

MMF/YLV/evb

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 416 "Cronobiología" del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, y fue financiado por el apoyo concedido por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DEGAPA) a los proyectos IN206203-3 y IN200207 y al Apoyo Integral para la Formación de Doctores en Ciencia 2006 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Durante la realización de este trabajo la autora fue becaria del CONACyT (beca número 171372) y recibió un "*Travel Award for Outstanding Research in the Field of Melatonin*" por parte de FASEB Summer Research Conferences: Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics. Agosto 2008.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Fuentes Pardo por su tiempo y dedicación para la realización de este trabajo.

A mi comité tutor, Dra. Rocio Salceda Sacanelles y Dr. Frolán M. Gómez Lagunas, por sus valiosos consejos académicos.

A mi jurado de examen de grado por su tiempo para revisar este trabajo y por sus excelentes comentarios que me ayudaron a mejorar esta tesis:

Dra. Carolina Escobar Briones  
Dr. Pablo Rudomin Zevnovaty  
Dr. Rogelio Arellano Ostoa  
Dra. Martha Romano Pérez

A la Dra. Gloria A. Benitez King por su invaluable asesoría que enriqueció mi formación dentro del Programa de Doctorado.

A mi familia:

A mí adorada madre, eres la luz que ilumina mi camino para dar un paso adelante. Gracias por tu apoyo.

A mis hermanos y sus respectivas familias, Oscar, German, Monserrat, Octavio y Osvaldo, que me han llenado de alegría y que han sido parte de mi fortaleza.

A la memoria de mis seres queridos, Ruben<sup>†</sup>, Martha<sup>†</sup>, Cristina<sup>†</sup>, que seguiran presentes en mi corazón.

A Héctor por haber sido mi compañero en la cronobiología. "...hasta las lágrimas de un feliz hallazgo".

A todas aquellas personas tan maravillosos que de alguna u otra manera estuvieron presentes en esta etapa de mi formación académica; especialmente quiero agradecer a Rafa, Santa, Beto y Jorge por haberle inyectado vida a mi proyecto.

Gracias a todos.

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>SISTEMA VISUAL DEL ACOCIL</b> .....	14
Unidad funcional de la retina .....	14
La fototransducción y el potencial de receptor de la retina .....	17
<b>RITMOS CIRCADIANOS</b> .....	21
Ritmo circadiano en el sistema visual del acocil .....	23
<b>MELATONINA</b> .....	25
Melatonina en el acocil .....	28
<b>RECEPTORES MEMBRANALES A MELATONINA</b> .....	29
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	39
<b>HIPÓTESIS</b> .....	40
<b>OBJETIVOS</b> .....	40
Objetivo principal .....	40
Objetivos específicos .....	40
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	41
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	43
Animales .....	43
Registro electrofisiológico de las células retinulares .....	44

Diseño experimental .....	46
Análisis de datos .....	49
Unión de melatonina [ $I^{125}$ ] a las membranas de los tallos oculares .....	51
Preparación de las membranas .....	51
Determinación de la concentración de proteínas: Método de Lowry .....	52
Análisis de datos .....	54
Control de voltaje de las células retinulares .....	54
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
A) Potencial de receptor de las células retinulares .....	56
B) Efecto de la melatonina sobre el potencial de receptor de las células retinulares durante un ciclo de 24 horas .....	57
C) Efecto del agonista 8-MPODT y del antagonista DH97 sobre el potencial de receptor de las células retinulares .....	69
D) Determinación de la unión de melatonina [ $I^{125}$ ] en el tallo ocular del acocil ..	76
E) Efecto de la melatonina en las corrientes iónicas de las células retinulares activadas por la luz y en la oscuridad .....	78
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>84</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>95</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>97</b>
<b>APÉNDICE A.</b> Artículos originados de este trabajo de investigación .....	<b>107</b>



## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

1.- Mendoza-Vargas L., Solís-Chagoyán H., Benítez-King G., Fuentes-Pardo B., 2009. "MT<sub>2</sub>-like melatonin receptor modulates amplitude receptor potential in visual cells of crayfish during a 24-hour cycle". *Comp. Biochem. Physiol. A*. 154 486–492.

2.- Solís-Chagoyán, H., Mendoza-Vargas, L., Fuentes-Pardo, B., 2008. "Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish". *Comp. Biochem. Physiol. A* 149, 373–379.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- [Figura 1](#). Esquema de un omatidio típico del ojo compuesto del acocil
- [Figura 2](#). Esquema de la estructura del tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*
- [Figura 3](#). Potencial de receptor de las células retinulares del tallo ocular del acocil
- [Figura 4](#). Ritmo circadiano en la amplitud del electroretinograma del acocil
- [Figura 5](#). Esquema de la síntesis de melatonina
- [Figura 6](#). Secuencia de aminoácidos del receptor a melatonina del subtipo MT<sub>1</sub>
- [Figura 7](#). Esquema del sistema de registro del potencial de receptor de las células retinulares del acocil
- [Figura 8](#). Esquema de los tiempos de perfusión de los fármacos en el tallo ocular del acocil
- [Figura 9](#). Potencial de receptor de una célula retinular del tallo ocular de acociles
- [Figura 10](#). Efecto de diferentes concentraciones de melatonina en la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares
- [Figura 11](#). Curso temporal del efecto de la melatonina en la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares durante la fase de oscuridad
- [Figura 12](#). Curso temporal del efecto de la melatonina en la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares durante la fase de luz
- [Figura 13](#). La melatonina aumenta la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares durante un ciclo circadiano
- [Figura 14](#). Curso temporal del efecto de la melatonina en la duración del potencial de receptor de las células retinulares durante la fase de oscuridad
- [Figura 15](#). Curso temporal del efecto de la melatonina en la duración del potencial de receptor de las células retinulares durante la fase de luz
- [Figura 16](#). Efecto de la melatonina en la duración del potencial de receptor de las células retinulares durante un ciclo circadiano

**Figura 17.** 8-M-PDOT, agonista selectivo al receptor de melatonina MT<sub>2</sub>, imita el efecto de la melatonina en la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares

**Figura 18.** DH97, un antagonista selectivo al receptor MT<sub>2</sub> de melatonina, produce una reducción dependiente de la concentración en la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares

**Figura 19.** DH97 disminuye el efecto producido por la melatonina en la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares

**Figura 20.** La unión de [<sup>125</sup>I] melatonina a las membranas del tallo ocular del acocil fue saturable y de alta afinidad

**Figura 21.** La melatonina o el calcio extracelular aumentaron la corriente entrante de la membrana de las células retinulares obtenida por la luz

**Figura 22.** La melatonina o el calcio extracelular incrementan la conductancia de la fase de despolarización rápida transitoria del potencial de receptor

**Figura 23.** La melatonina incrementa la conductancia de las células retinulares obtenida en la oscuridad

## ABREVIATURAS

4P-PDOT	4-fenil-2-proionamidotetralina
8-M-PDOT	8-metoxi-propionamidotetralina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
BK <sub>Ca</sub>	canal de potasio activado por calcio
B <sub>max</sub>	Número total de sitios de unión
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
<i>Circa</i>	Del latín <<circa>> que significa “alrededor de”
DAG	Diacilglicerol
DH97	N-Pentanoil-2-benziltriptamina
<i>Diem</i>	Del Latin <<diano>> que significa “día”
DNAc	Ácido desoxiribonucleico codificante
E <sub>rev</sub>	Potencial de inversión
ERG	Electrorretinograma
ERK 1 y 2	Cinasas reguladas por señales extracelulares
G	Conductancia
GDP	Difosfato de guanosina
GIRK	canal de potasio rectificador entrante
GMPc	Monofosfato de guanidina cíclico
Gq	Proteína G del tipo q
GTP	Guanosin trifosfato
HDP	Hormona dispersora del pigmento
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico
HIOM	enzima hidroxindol-O-metiltransferasa
InsP3	1,4,5-trisfosfato
I-V	Relación corriente-voltaje
JNK	c-Jun Cinasa terminal N
K <sup>+</sup>	Ión potasio
KCL	Cloruro de potasio
K <sub>d</sub>	Constante de disociación
Kir	Canal de potasio rectificador entrante
MEK 1 y 2	Mitógenos activados por cinasas
MT <sub>1</sub>	Receptor a melatonina tipo 1
MT <sub>2</sub>	Receptor a melatonina tipo 2
Na <sup>+</sup>	Ión sodio
PIP2	fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PLC β	Fosfolipasa C β
PR	Potencial de receptor
R 1-8	Células retinulares de la 1 a la 8
TRP y TRPL	<i>Transient receptor potential (TRP) channels</i> tipo L

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

TC                      Tiempo circadiano  
VH                      Solución salina para crustáceos Van Harreveld

## RESUMEN

En el acocil *Procambarus clarkii*, las células retinulares están implicadas en la expresión del ritmo circadiano de sensibilidad a la luz o ritmo circadiano de amplitud del electroretinograma (ERG). Este ritmo persiste aun en tallos oculares aislados. En los tallos oculares de esta especie, la concentración de la melatonina aumenta durante la noche. Este indol actúa como un sincronizador no fótico del ritmo circadiano de la amplitud del ERG. En vertebrados, uno de los mecanismos de acción de melatonina es a través de su interacción con los receptores de membrana MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> acoplados a la proteína G. En invertebrados, los mecanismos de acción de la melatonina aún no se han reportado.

En esta tesis doctoral se determinó el efecto de la melatonina sobre la respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares, el potencial de receptor (PR), en un ciclo de 24 h, se examinó si este efecto de melatonina es regulado por receptores membranales y se inició el estudio del efecto de la melatonina sobre las corrientes iónicas que subyacen al PR.

Para probar si el efecto de la melatonina sobre el PR de las células retinulares depende de la hora de su aplicación, los tallos oculares fueron seccionados de los acociles cada dos horas, hasta completar un ciclo de 24 horas, y fueron perfundidos con melatonina. Para determinar si la acción de la melatonina en el

## Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

PR es regulada por receptores membranales, se probó el efecto de un agonista (8-M-PDOT) y un antagonista (DH97) específicos del receptor  $MT_2$  y se realizaron ensayos de unión de [ $I^{125}$ ] melatonina en la fracción membranal de los tallos oculares del acocil. El efecto de la melatonina sobre las corrientes iónicas que subyacen al PR de las células retinulares se determinó mediante registros intracelulares con control de voltaje.

La melatonina aumentó la amplitud del PR a lo largo del ciclo de 24 horas, y la magnitud del efecto fue dependiente de la hora de su aplicación. Durante las horas del día subjetivo, entre los tiempos circadianos (TC) 14 y 22, el efecto de la melatonina sobre la amplitud del PR fue mayor que durante las horas de la noche subjetiva. En cuanto a la duración del PR, la melatonina la aumentó durante las horas del día subjetivo pero la disminuyó durante la noche subjetiva. La aplicación del agonista específico a los receptores  $MT_2$  (8-M-PDOT) aumentó la amplitud del PR de manera semejante al aumento producido por la melatonina. Cuando se aplicó simultáneamente la melatonina o el agonista 8-M-PDOT con el antagonista específico a los receptores  $MT_2$  (DH97), se bloqueó el aumento de la amplitud del PR. Al aplicar únicamente el antagonista DH97 durante la noche, la amplitud del PR disminuyó de manera dependiente de la concentración aplicada del antagonista. La unión específica de [ $I^{125}$ ] melatonina a las membranas del tallo ocular del acocil fue saturable y con afinidad en los valores nanomolares. No se observó una variación en la afinidad ( $K_d$ ) entre los TC 6 y 18. Sin embargo, hubo una variación aunque no significativa, de la unión específica ( $B_{max}$ ) de la  $I^{125}$

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

melatonina en el tallo ocular entre los TC 6 y 18. Los primeros resultados obtenidos del efecto de la melatonina sobre las corrientes iónicas del PR, sugieren que la melatonina aumenta la amplitud de la corriente entrante de las células retinulares activada por la luz y aumenta la corriente saliente de las células retinulares activada en la oscuridad.

La melatonina provoca un aumento en el potencial de receptor de las células fotorreceptoras retinulares a través de receptores membranales con características farmacológicas similares a las del subtipo MT<sub>2</sub> de retina de vertebrados. Al parecer, la melatonina participa en la regulación de las corrientes iónicas activadas en la fotorrespuesta de las células retinulares.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que en el acocil, la melatonina es una señal química con la que el sistema circadiano indica a las estructuras efectoras como las células retinulares, el período de actividad del sistema. La melatonina no sólo actúa sobre el marcapaso del ritmo circadiano de la amplitud del ERG sincronizando el ritmo, sino también sobre los efectores aumentando su sensibilidad a la luz.



## INTRODUCCIÓN

### SISTEMA VISUAL DEL ACOCIL

#### Unidad funcional de la retina

En el siglo XIX se inició el estudio de la estructura y organización del ojo compuesto del acocil, lo que proporcionó las bases para entender la estructura receptiva a la luz llamada omatidio. El omatidio se localiza en los tallos oculares.

La retina de un acocil adulto contiene aproximadamente 6000 omatidios (Fig. 1; [Hafner y Tokarski, 1998](#)). Cada omatidio está formado por 16 células de cuatro tipos distintos: dos células corneágenas, cuatro células del cono cristalino, dos células pigmentarias distales, y ocho células retinulares fotorreceptoras (R1-8). Las células retinulares fotorreceptoras 1-7 presentan microvellosidades dispuestas de manera ortogonal formando un rabdomo. En el rabdomo se localiza el pigmento de rodopsina. Los axones de las células retinulares fotorreceptoras proyectan hacia la membrana basal. La célula retinular 8 (R8) está localizada entre la terminación del cono cristalino y la superficie del rabdomo formado por las células R1-8. La R8 tiene su propio rabdomo y su axón proyecta hacia la médula ([Shaw y Stowe, 1982](#)).

## Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

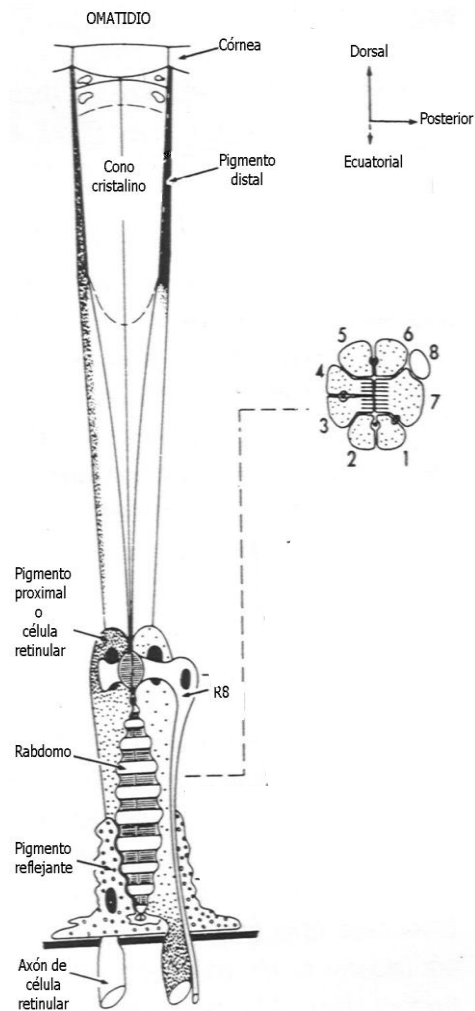


Fig. 1. Esquema de un omatidio típico del ojo compuesto del acocil. Figura tomada de [Shaw y Stowe, 1982](#).

El tallo ocular está formado por la retina y tres médulas, la externa, la interna y la terminal (Fig. 2). En la médula terminal se localiza un conjunto de células neurosecretoras que forman el principal órgano neurosecretor del tallo ocular conocido como órgano X-glándula sinusal. Este órgano está formado por, aproximadamente, 120 neuronas monopolares cuyos cuerpos celulares constituyen el órgano X y sus axones terminan en asociación con una región

vascular para formar la glándula sinusal. De este sistema neuroendócrino se han aislado diferentes hormonas, como la hormona concentradora del pigmento rojo (Ferland y Josefsson, 1972; Gauss y cols., 1990), la hormona dispersora del pigmento (HDP) (Ferland, 1976; Rao y Riehm, 1989; Löhr y cols., 1993), la hormona hiperglicemiante (Kleinholz y cols., 1967), la hormona inhibidora de la muda (Chung y cols., 1996) y la hormona inhibidora de la gónada (De Kleijn y cols., 1994; Soyez y cols., 1991). El sistema órgano X-glándula sinusal participa en el control de la muda, en la regulación de los niveles de azúcar en la hemolinfa, en la posición de los pigmentos de la retina y en la actividad locomotora (García y Aréchiga 1998). La actividad neuronal del órgano X está regulada por neurotransmisores, como el ácido-gama aminobutírico (GABA), la dopamina y la 5-hidroxitriptamina (serotonina) (García y Aréchiga, 1998; Alvarado-Alvarez y cols., 2000; 2005; Calderón-Rosete y cols., 2006). La serotonina es un precursor en la síntesis de melatonina. Se ha propuesto que esta monoamina regula el sistema neuroendócrino y los fotorreceptores del tallo ocular del acocil (Calderón-Rosete y cols., 2006).

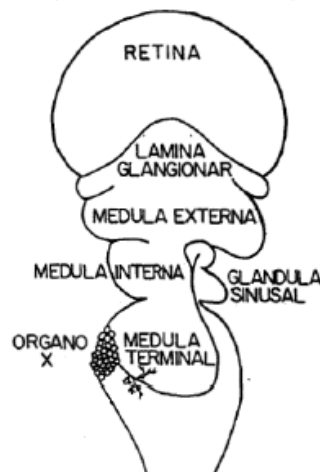


Fig. 2. Esquema de la estructura del tallo ocular del acocil *Procamburus clarkii*

### **La fototransducción y el potencial de receptor de la retina**

En las células retinulares, la luz incidente es absorbida por un pigmento visual unido a la membrana de las microvellocidades del rabadomo, la rodopsina.

La rodopsina es una molécula que consta de una proteína de siete dominios transmembranales, la opsina, y un pigmento derivado de la vitamina A, el 11-*cis*-retinal. La rodopsina es el primer componente celular que participa en la fototransducción. La absorción de un fotón por el 11-*cis*-retinal transforma a éste en el isómero *all-trans* retinal. Esto induce en la rodopsina una rápida secuencia de cambios conformacionales, hasta que se estabiliza en la forma de metarrodopsina, la cual activa a una proteína G. Como en todas las proteínas G, su activación implica un intercambio de nucleótido (GTP por GDP) y la subsecuente disociación de la subunidad alfa, la cual se mantiene activa hasta que el GTP es hidrolizado.

En muchos invertebrados, la activación de la proteína G activa, a su vez, a la enzima PLC $\beta$ , la cual tiene como productos de su acción enzimática al 1,4,5-trisfosfato de inositol (InsP3) y al diacilglicerol (DAG). Por medio de un mecanismo no bien conocido, lo anterior resulta en la activación de canales permeables a cationes (sodio y calcio) con lo que ocurre una despolarización de la membrana. En *Drosophila*, por ejemplo, se sabe que DAG está implicado en la apertura de

dos tipos de canales permeables a calcio y sensibles a la luz: TRP y TRPL (Hardie 2003). En *Limulus* el InsP3 promueve la liberación de calcio de las cisternas sensibles al InsP3 (Garger y col., 2004). La fototransducción en el acocil inicia cuando la luz activa a la rodopsina la que a través de la proteína-Gq activa a la PLC provocando la apertura de canales iónicos que inducen la despolarización de la célula retinular (Terakita y cols., 1998).

En los fotorreceptores de invertebrados, la luz produce potenciales despolarizantes de la membrana. Esta despolarización es producto de un aumento de la conductancia de la membrana a cationes. En acociles, la respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares, el potencial de receptor (PR), se inicia con una despolarización rápida o fase transitoria que depende de la intensidad del estímulo luminoso, seguida de una despolarización lenta sostenida o fase estable que depende de la duración del estímulo y finaliza con una repolarización (Fig. 3) (Naka y Kuwabara, 1959; Miller y Glantz, 2000).

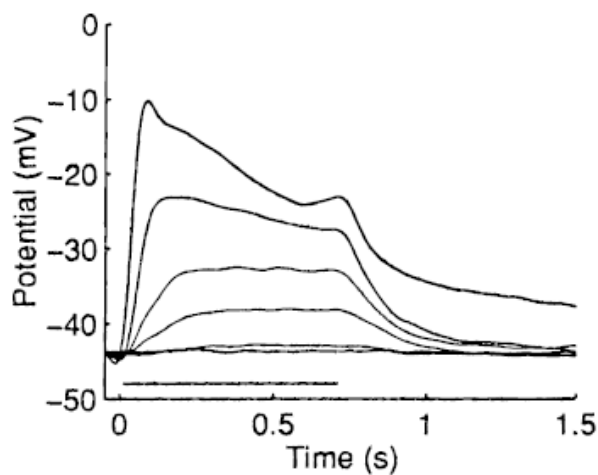


Fig. 3. Potencial de receptor de las células retinulares del tallo ocular del acocil. Las células retinulares fueron fotoestimuladas con diferentes intensidades de luz (escala logarítmica de la intensidad de luz: -4, -3.1, -2.5, -2, -1, 0). La barra indica la duración del pulso de luz. (Figura tomada de Miller y Glantz 2002).

Se ha propuesto que el PR de las células retinulares del acocil depende principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , así como de las condiciones de adaptación a la luz (Eguchi, 1965; Shaw y Stowe, 1982; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991; Terakita, y cols., 1998; Miller y Glantz, 2000). En acociles, el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Na}^+$  participan en la despolarización transitoria y el  $\text{K}^+$  está implicado en la fase de repolarización del PR (Shaw y Stowe, 1982; Fuentes-Pardo y cols., 1984; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991; Miller y Glantz, 2000). El  $\text{Ca}^{2+}$  promueve un influjo de iones de  $\text{Na}^+$  a través de la apertura de canales de sodio. La consecuencia de la interacción  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Na}^+$  es la despolarización de la membrana (Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991). También se sabe que esta interacción promueve la apertura de un canal de  $\text{K}^+$  dependiente de voltaje y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que tiene como consecuencia la repolarización de la célula fotorreceptora (Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991; Miller y Glantz, 2000). Al disminuir la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  o al sustituir éste por cobalto se observa una reducción en la amplitud de la fase transitoria y un incremento en la duración del PR. Cuando los fotorreceptores del acocil se sumergen en una solución libre de  $\text{Na}^+$  y enriquecida con  $\text{Ca}^{2+}$ , se observa un incremento en la amplitud de la fase transitoria y una caída abrupta después de una iluminación sostenida, lo que sugiere un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células fotorreceptoras; al regresar a la oscuridad se observa una recuperación en el PR (Fuentes-Pardo y cols., 1984; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991). Lo

## Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

anterior indica que en el acocil, el  $\text{Ca}^{2+}$  está asociado con el proceso de adaptación a la luz y a la oscuridad del sistema visual.

En los fotorreceptores de *Limulus*, la resistencia de la membrana es mayor en la luz que en la oscuridad. La inactivación de la bomba de sodio electrogénica ( $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ ATPasa}$ ) reduce la amplitud del PR (Smith y cols., 1968); este efecto es dependiente de la alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular por lo que cuando ésta es baja la respuesta del PR a la luz se atenúa. Tanto en el acocil como en el balano, la abeja y el pulpo, la conductancia iónica inducida por la luz aumenta (Brown y cols, 1970; Miller y Glantz, 2000). Se han registrado corrientes iónicas dependientes del voltaje que contribuyen a dar la forma al potencial de receptor de respuesta a la luz así como a una corriente temprana con componentes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en fotorreceptores ventrales de *Limulus* y en células retinulares del acocil, una corriente de  $\text{K}^+$  que se inactiva (parecida a la tipo A) y una corriente de K tipo rectificador tardío en las células retinulares (Lisman y Brown 1972; Lisman y col 1982; Miller y Glantz, 2000).

## RITMOS CIRCADIANOS

Los ritmos circadianos (del latín *circa*, cerca y *diem*, día) son variaciones periódicas de distintas funciones que se expresan en organismos unicelulares y multicelulares. Estas variaciones se pueden registrar lo mismo en condiciones ambientales naturales que en condiciones ambientales constantes. La diferencia entre las dos situaciones es que en la primera, la duración del periodo circadiano es la misma que la duración del día, mientras que en la segunda, el periodo es cercano a las 24 horas ([Aschoff, 1981](#)).

La expresión de los ritmos circadianos obedece a la presencia de un grupo de estructuras interconectadas que integran el sistema circadiano ([Pittendrigh, 1981](#)). Todos los sistemas circadianos están conformados por, al menos, un generador de ritmos o marcapaso, un grupo de elementos conocido como sistema sincronizador, el cual es capaz de detectar cambios cíclicos que ocurran en el ambiente exterior y de enviar esta información al marcapaso, y un grupo de estructuras efectoras en las que es expresada la actividad rítmica generada por el marcapaso ([Pittendrigh, 1981](#); [Aréchiga, y cols., 1993](#); [Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993](#)).



Debido a las interacciones humorales y nerviosas entre los componentes del sistema circadiano, las funciones en un organismo controladas por este sistema circadiano mantienen entre ellas una estrecha relación temporal mediante la cual los organismos adquieren un orden temporal interno que sincronizado por el ambiente exterior, posibilita un orden temporal externo. Debido a que los sistemas circadianos son sincronizados, en la naturaleza pueden observarse patrones temporales en los que los individuos de una población coinciden temporalmente manteniendo una actividad alta durante el día (especies diurnas), durante la noche (especies nocturnas) o durante el crepúsculo (especies crepusculares) (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993). La segregación espacial de la actividad de los organismos en patrones establecidos en la naturaleza es un mecanismo importante en la disminución de la competencia interespecífica al evitar que determinadas especies se encuentren en el recurso al mismo tiempo. Es posible que estos patrones espacio-temporales se vean igualmente afectados por la época del año.

En la retina de mamíferos se ha propuesto la presencia de un reloj circadiano (Tosini y Menaker 1998; Tosini, 2000; Ruan y cols., 2006; Tosini y cols., 2007). En la retina de *Xenopus* se ha sugerido que el sistema del reloj circadiano se localiza en las células fotorreceptoras (Cahill y Bersharse., 1993). En los ratones, las neuronas de la retina interna coexpresan el RNAm para diferentes genes reloj (Witkovsky y cols., 2003; Ruan y cols., 2006) los cuales también tienen un ritmo circadiano como es el caso de mPer2::LUC (Ruan y cols., 2006).

### **Ritmo circadiano en el sistema visual del acocil**

En el acocil, uno de los ritmos circadianos periféricos mejor caracterizados es el de la variación en la magnitud de la respuesta de las células retinulares a señales de luz aplicadas a lo largo del día (ritmo de la amplitud del electroretinograma, ERG). Este ritmo de la actividad eléctrica poblacional de las células retinulares muestra una fase de elevada sensibilidad en la noche y otra de baja en el día (Page y Larimer, 1974; Barrera-Mera, 1976; Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Larimer y Smith, 1981; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987; Moreno-Sáenz, y cols., 1992; Aréchiga y Rodríguez Sosa, 1998; Solís-Chagoyán, y cols., 2008). En la regulación del ritmo del ERG participa la hormona dispersora del pigmento (HDP), una neurohormona liberada principalmente desde la glándula sinusal, que de modo indirecto modula rítmicamente la cantidad de luz que alcanza a las células retinulares y por consiguiente influye en la amplitud de la respuesta de estas células a los pulsos de luz (Verde y cols., 2007).

El tallo ocular aislado presenta un ritmo circadiano de sensibilidad a la luz (Fig. 4; Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Moreno-Sáenz y cols., 1992; Aréchiga y Rodríguez Sosa, 1998), con un período de 22 h en oscuridad constante. La retina ha sido propuesta como un posible generador de la ritmicidad circadiana (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998). En la generación y regulación del ritmo circadiano de sensibilidad a la luz participan elementos localizados en el tallo

ocular y fuera del mismo. Se ha propuesto que en su generación participan estructuras localizadas en la retina (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998), el lóbulo óptico y el protocerebro lateral (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977) y fuera del pedúnculo en el ganglio cerebroide (Larimer y Smith, 1981; Barrera-Mera y Block, 1990; Hernández y Fuentes-Pardo, 2001).

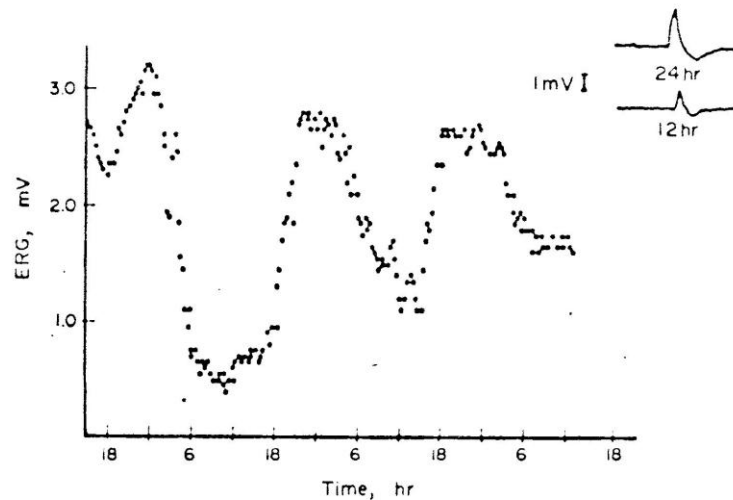


Fig. 4. Ritmo circadiano en la amplitud del electroretinograma (ERG). Este ritmo fue registrado del tallo ocular aislado del acocil en oscuridad constante. La frecuencia del estímulo de luz fue 1/240 s. Se muestran dos trazos del ERG a dos tiempos diferentes (lado superior de la gráfica). Gráfica tomada de Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977.

En el tallo ocular aislado no se observa la migración de los pigmentos proximales o distales, por lo que se ha propuesto que la actividad circadiana de la sensibilidad a la luz de las células retinulares pueda deberse a componentes intrínsecos, por ejemplo factores hormonales, la fototransducción y/o cambios en la conductancia de algunos iones. La inmunopositividad del gen *PER* en las células retinulares sugiere la posibilidad de que éstas sean intrínsecamente rítmicas (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998).

## MELATONINA

La melatonina (N-acetil-5 metoxitriptamina) es una indolamina sintetizada a partir del triptófano (Fig. 5). La vía principal de la biosíntesis de la melatonina inicia con la hidroxilación del triptófano por la enzima triptófano hidroxilasa, luego ocurre una descarboxilación, una *N*-acetilación de serotonina por la *N*-acetiltransferasa y una *O*-metilación de la *N*-acetilserotonina por la enzima hidroxiindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT; [Simonneaux y Ribelayga, 2003](#)).

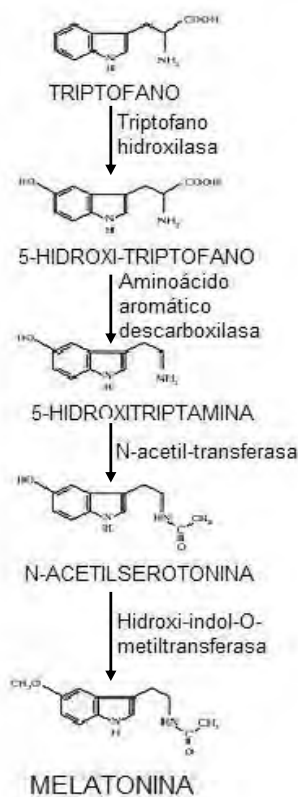


Fig. 5. Esquema de la síntesis de melatonina

La vía metabólica de la síntesis de melatonina en la retina es similar a la que ocurre en la glándula pineal. La primera descripción de la capacidad biosintética de melatonina en la retina de mamíferos fue realizada en 1971 por [Cardinali y Rosner \(1971 a y b\)](#), quienes describieron la presencia de la actividad de la enzima HIOMT y de la conversión de la serotonina en melatonina en la retina de la rata.

Se conoce que en la retina de vertebrados la melatonina es sintetizada y liberada ([Tosini y Menaker, 1998](#); [Bernard y cols., 1999](#); [Liu y cols., 2004](#); [Tosini y cols., 2007](#)). La melatonina es sintetizada en el epitelio ciliar y liberada al humor acuoso; las células de los lentes también son capaces de sintetizarla. En un cultivo de la capa de los fotorreceptores de la rata se demostró que la síntesis de melatonina persiste de manera circadiana ([Tosini y cols., 2007](#)). Se sabe que el reloj circadiano de la retina de *Xenopus*, localizado en las células fotorreceptoras, conduce el ritmo de producción de melatonina ([Cahill y Besharse, 1993](#))

En una gran variedad de organismos, incluyendo a los invertebrados, se ha reportado que la melatonina regula la función adaptativa a la luz del sistema visual ([Vivien-Roels y cols., 1984](#); [Balzer y cols., 1997](#); [Lampel y cols., 2005](#); [Maciel y cols., 2008](#); [Solís-Chagoyan y cols., 2008](#)). La melatonina de la retina no contribuye significativamente a los niveles circulantes de melatonina, por lo que es posible que tenga efectos locales en el tejido ocular como, por ejemplo, en la

variación diurna de la presión intraocular, la cual disminuye durante la noche (Liu y Dacus, 1991). Mediante registro eléctrico de campo de la retina, el electroretinograma se ha demostrado que la melatonina aumenta la sensibilidad de la retina a la luz (Semm y Vollrath, 1982; Wiechmann y cols., 1988; Balzer y cols., 1997; Reuss y Kieffer, 1998; Solís-Chagoyán y cols., 2008). En la retina de los vertebrados, la melatonina aumenta la respuesta a la luz cambiando la amplitud tanto de la onda-a (bastón fotorreceptor) como de la onda-b (célula retinal que responde a la señal del fotorreceptor) del electroretinograma. También regula el ritmo de disco del segmento externo protector de los bastones fotorreceptores (White y Fisher, 1989), provoca el alargamiento del cono (característico de la adaptación a la oscuridad) (Pierce y Besharse, 1985), y regula la liberación de dopamina de las células fotorreceptoras (Duvocovich, 1983); mientras que la melatonina es la señal química de la oscuridad y produce un proceso de adaptación a la oscuridad, la dopamina, es la señal química de la luz y produce un proceso fisiológico de adaptación a la luz, (Iuvone y Gan, 1995; Miranda-Anaya y cols., 2002).

Existen evidencias que indican que la melatonina regula conductancias iónicas. En particular, la melatonina se ha caracterizado como un regulador de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zisapel y Laudon, 1983; Vanecek, 1998; Prada y cols., 2005; Afeche y cols., 2006). Durante la noche, coincidente con la secreción de melatonina, se observa un canal catiónico  $I_{LOT}$  (*long open time*) permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  activado de manera espontánea en las células de la glándula pineal de aves (D'Souza y cols., 1996).

## Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

En el epitelio celular, la melatonina estimula una corriente selectiva a  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje y una corriente selectiva de  $\text{K}^+$  (Rich y cols., 1999). Por medio de un mecanismo regulado por receptores membranales, la melatonina estimula una conductancia selectiva a  $\text{K}^+$  (Jiang y cols., 1995). La actividad de varias conductancias iónicas en cultivos celulares muestra patrones circadianos, pero el mecanismo de señalización no se conoce. Por ejemplo, una conductancia de  $\text{K}^+$  sensible a tetraetilamonio en el nervio óptico de moluscos, disminuye antes del amanecer y aumenta al anochecer, coincidente con la variación circadiana de los niveles de melatonina (Michel y cols., 1993).

## Melatonina en el acocil

La melatonina es una indolamina que ha sido asociada con la oscuridad. En la mayoría de los animales, incluido el acocil *Procambarus clarkii* (Balzer y cols., 1996), en los que se ha estudiado su ritmo de síntesis, se ha encontrado que el nivel circulante de la melatonina aumenta en la noche, y que en los vertebrados y en la mayoría de invertebrados la luz inhibe su síntesis.

En el acocil *Procambarus clarkii*, la melatonina, junto con otras hormonas, aumenta la respuesta a la luz de las células fotorreceptoras, quizá alcanzando el “estado de adaptación a la oscuridad” así, por ejemplo la melatonina aumenta la amplitud de la oscilación del ritmo circadiano del ERG (Balzer y cols., 1997; Solís-

[Chagoyán y cols., 2008](#)). La melatonina y la hormona dispersora del pigmento (HDP) participan en la sincronización del ritmo circadiano del ERG; la melatonina como en el caso de los vertebrados, actúa como una señal química asociada con el comienzo del periodo de la oscuridad, mientras que la HDP actúa como una señal química que indica el término el mismo. La máxima producción de la HDP coincide con el inicio de la fase reposo del ritmo de amplitud del ERG ([Verde y cols., 2007](#); [Solís-Chagoyán y cols., 2008](#)).

## **RECEPTORES MEMBRANALES A MELATONINA**

La primera evidencia que sugirió la existencia de receptores a melatonina se originó de investigaciones realizadas en melanóforos de la piel del anfibio *Xenopus laevis*, donde se indujo la agregación de los pigmentos con melatonina y se estableció una relación entre la estructura y la actividad de los receptores de esta hormona ([Heward y Hadley, 1975](#)). Este reporte sugirió que la N-acetiltriptamina es un antagonista del putativo receptor a melatonina.

La caracterización farmacológica y la clonación de los receptores, el descubrimiento de ligandos específicos para cada receptor y la introducción de un ratón transgénico con selectiva supresión del receptor a melatonina MT<sub>1</sub> y/o MT<sub>2</sub> han permitido la caracterización funcional de cada receptor a melatonina.



La agregación del pigmento mediado por melatonina fue bloqueado por la toxina pertusis, lo que sugiere la activación de un receptor a melatonina acoplado a la proteína G (White y cols., 1987). La presencia del sitio de unión específica a  $^3\text{H}$ -melatonina en membranas del cerebro de oveja (Cardinali y cols., 1979) y la inhibición de la liberación de dopamina dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en la retina de conejo a concentraciones picomolares de melatonina (Dubocovich, 1983; Dubocovich, 1988) proporcionaron la evidencia de la presencia del receptor a melatonina con una función específica en mamíferos.

Los receptores a melatonina fueron originalmente clasificados en los subtipos ML1 y ML2 (Dubocovich, 1988; Dubocovich, 1995). El DNA que codifica para el receptor a melatonina con farmacología parecida al ML1 (Mel1a, Mel1b) fue clonado en varias especies de vertebrados incluyendo al ser humano (Reppert y cols., 1994; Reppert y cols., 1995a). Los receptores Mel1a y Mel1b son referidos como  $\text{MT}_1$  y  $\text{MT}_2$ , respectivamente (Dubocovich y cols., 2001; Alexander y cols., 2007).

La secuenciación de los genes que codifican para los receptores a melatonina confirma que esa familia de receptores tienen las principales características estructurales de los receptores acoplados a la proteína G. Esta familia presenta siete (I-VII) dominios transmembranales  $\alpha$ -helicoidales (Fig. 6). Sin embargo, varias regiones de secuencias altamente conservadas encontrados en todos los otros receptores acoplados a la proteína G clonados anteriormente, no están

presentes en los receptores a melatonina. Las regiones conservadas son D/ERY en la interfase del dominio transmembranal 3 y en la segunda asa intracelular de muchos receptores acoplados a la proteína G, la cual está reemplazada en el receptor a melatonina con la región NRY seguido por la secuencia CXXCH. Otra característica única de los receptores a melatonina fue el reemplazamiento del residuo conservado prolina con la región conservada NPXXY en el dominio transmembranal 7 con un residuo de alanina, dando la secuencia consenso NAXXY. Aunque la aspargina en la región NRY puede servir para conferir la estructura y las propiedades de la señalización de la proteína G, no se conoce la función de otras regiones.

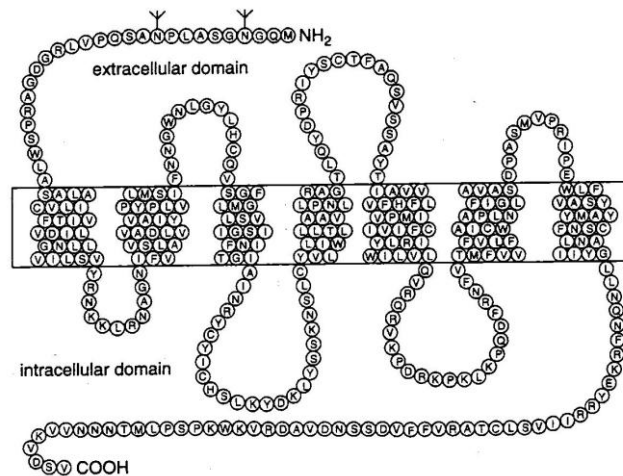


Fig. 6 Secuencia de aminoácidos del receptor a melatonina del subtipo MT<sub>1</sub> en seres humanos. Figura tomada de [Reppert y cols., 1996](#).

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

Los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> de mamíferos muestran un 60 % de homología a nivel de aminoácidos; estos subtipos son 60% idénticos a las secuencias de aminoácidos de los receptores a melatonina de *Xenopus*. Estos receptores contienen 350 y 362 aminoácidos, respectivamente, con un peso molecular de 39-40 kDa ([Reppert y cols., 1996](#); [Drew y cols., 1998](#)).

En el receptor MT<sub>1</sub>, Gli 20 (DM VI), Val 4 (DM IV), His 7 (DM IV), Ser 8 (DM III) y Ser 12 (DM III) son esenciales para la unión de melatonina ([Gubitz y Reppert, 2000](#); [Conway y cols., 2000](#); [Conway y cols., 2001](#).). En el receptor MT<sub>2</sub>, Cis 113 (en la asa extracelular 1) y Cis 190 (en la asa extracelular 2), dos residuos que son conservados en muchos receptores acoplados a la proteína G, son propuestos para formar una unión disulfida que es esencial por la alta afinidad de la unión a melatonina ([Mseeh y cols., 2002](#)).

En lo que se refiere a la distribución de los receptores a melatonina, el subtipo MT<sub>1</sub> se ha localizado en el cerebro de mamíferos y aves. El subtipo MT<sub>2</sub> ha sido localizado principalmente en la retina de humanos, conejos, aves, anfibios, peces ([Dubocovich y Takahashi 1987](#); [Reppert y cols., 1995a](#); [Reppert y cols., 1996](#); [Natesan y Cassone, 2002](#); [Isorna y cols., 2004](#); [Huang y cols., 2005](#)). Se ha sugerido que este subtipo participa en la regulación de los efectos de la melatonina sobre la sensibilidad a la luz del fotorreceptor ([Vanecek, 1998](#)).

Las células que expresan los receptores a melatonina en la retina son: células amacrinas, células horizontales, células ganglionares y fotorreceptores. También se localizan en el epitelio pigmentario retinal, el epitelio ciliar no pigmentario, el epitelio, endopitelio y el fibroblasto estromal de la córnea, las células del tejido conectivo de la esclerótica y las células de los lentes. El RNAm del receptor subtipo MT<sub>2</sub> fue localizado en la retina y en todo el cerebro y el hipocampo, aunque en cantidades pequeñas (Reppert y cols., 1994, 1995a; Mazzucchelli y cols., 1996; Weaver y Reppert, 1996; Al-Ghoul y cols., 1998; Uz y cols., 2005).

La co-expresión del receptor subtipo MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> se ha localizado en el hipotálamo del núcleo supraquiasmático (Reppert y cols., 1988), retina (Dubocovich, 1983; Dubocovich y Takahashi, 1987) y arterias (Krause y cols., 1995). Al parecer, en la retina de seres humanos, los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> expresados en células fotorreceptoras y ganglionares forman heterodímeros (Savaskan y cols., 2002). La tendencia de la formación del homodímero MT<sub>2</sub> es de 3 a 4 veces más baja que la formación de heterodímeros MT<sub>1</sub>/ MT<sub>2</sub> y del homodímero MT<sub>1</sub> (Ayoub y cols., 2004).

La expresión del receptor MT<sub>1</sub> en el núcleo supraquiasmático y en el par tuberalis de roedores es regulada de manera circadiana. Esos ritmos son regulados en el núcleo supraquiasmático por ciclos de luz-oscuridad aún en ratas pinealectomizadas (Masson-Pevet y cols., 1996) y por la melatonina en el par tuberalis (Guerrero y cols., 2000).

Los receptores a melatonina han sido identificados y caracterizados en el cerebro y la retina utilizando [ $^{125}$ ] melatonina (Vakkuri y cols., 1984) como un ligando de alta actividad específica. Los receptores a melatonina MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> se unen a [ $^{125}$ ] melatonina en el rango picomolar y nanomolar, respectivamente (Dubocovich, 1995; Dubocovich y cols., 1997).

El receptor MT<sub>2</sub> muestra una mayor selectividad que el MT<sub>1</sub> para la unión del antagonista basado en una estructura amidotetralina (Dubocovich y cols., 1997). El compuesto 4-fenil-2-proionamidotetralina (4P-PDOT), el cual tiene 300 veces mayor afinidad por el receptor MT<sub>2</sub> que por el MT<sub>1</sub>, fue utilizado para demostrar que el receptor MT<sub>2</sub> participa en la inhibición de la liberación de dopamina en la retina de conejo y en el adelanto de la fase del reloj circadiano en rebanadas del núcleo supraquiasmático de la rata (Dubocovich y cols., 1997; Hunt y cols., 2001). El compuesto N-Pentanoil-2-benzilriptamina (DH97), el cual tiene 89 veces mayor afinidad por el receptor MT<sub>2</sub> que por el MT<sub>1</sub>, fue utilizado para determinar que el receptor MT<sub>2</sub> bloquea el aumento del tono vascular de la arteria de la cola de la rata producido por la melatonina (Ting y cols., 1999).

Las afinidades del receptor MT<sub>1</sub> para melatonina y análogos relacionados es: 2-iodomelatonina > 6-cloromelatonina ≥ melatonina > N-acetil-serotonina > 5-melatonina-Luzindol > 4P-PDOT y para el receptor MT<sub>2</sub> 6-cloromelatonina ≥ 2-

Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

odomelatonina  $\geq$  *N*-acetil-serotonina > melatonina > 5-melatonina-Luzindol > 4P-PDOT (Dubocovich, 1988).

Por otro lado, la vía de señalización para los receptores a melatonina MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> se ha caracterizado en cultivos celulares primarios y tejidos así como en diferentes líneas celulares. La vía de señalización implica a la proteína G y es muy similar para los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>. El receptor MT<sub>1</sub>, y probablemente el receptor MT<sub>2</sub>, preferentemente está acoplado a la proteína G<sub>q/11</sub>, aunque en un menor grado (Brydon y cols., 1999 a y b; Jarzynka y cols., 2006). La activación de la proteína G del receptor MT<sub>1</sub> modula varias vías de señalización.

La activación del receptor MT<sub>1</sub> o MT<sub>2</sub> por la melatonina inhibe la formación de AMPc con una subsecuente disminución en la proteína cinasa A activada (Morgan y cols., 1994; Witt-Enderby y cols., 1998) y una disminución en la fosforilación de la proteína CREB (Witt-Enderby y cols., 1998; McNulty y cols., 1994). La activación del receptor MT<sub>1</sub> también aumenta la fosforilación de mitógenos activados por la proteína cinasa 1 y 2 (MEK1 y MEK2), la señal por cinasa 1 y 2 (ERK1 y ERK2) (Witt-Enderby y cols., 2000) y c-Jun Cinasa terminal N (JNK) (Chan y cols., 2002).

La activación del receptor MT<sub>2</sub> inhibe la producción de AMPc (Reppert y cols., 1995a; Mackenzie y cols., 2002), estimula JNK (Chan y cols., 2002) y el recambio de fosfoinositol (PI) (Mackenzie y cols., 2002). Hay diferencias específicas en las

vías de señalización de los receptores  $MT_1$  y  $MT_2$ , por ejemplo, El receptor  $MT_2$  inhibe la formación de GMPc a través de la vía guanilato ciclasa en células HEK293, pero el receptor  $MT_1$  no actúa de esta manera (Brydon y cols., 1999a y b; Petit y cols., 1999). También, la activación de PKC en el núcleo supraquiasmático ocurre a través de los receptores  $MT_2$  y no por el receptor  $MT_1$ , a pesar de que ambos receptores se encuentran expresados en ese sitio (Hunt y cols., 2001).

El receptor  $MT_1$  también puede regular el flujo iónico y canales iónicos específicos. El receptor  $MT_1$  inhibe el canal de potasio activado por calcio ( $BK_{Ca}$ ) (Geary y cols., 1997, 1998). El bloqueo de este canal puede disminuir la vía AMPc-proteína cinasa A que fosforila el canal  $BK_{Ca}$ . El canal de potasio rectificador entrante (Kir 3) es otro blanco potencial para la melatonina. Los receptores  $MT_1$  expresados en ovocitos de *Xenopus* (Nelson y cols., 1996) o en células AtT20 (Nelson y cols., 2001) activan el canal de potasio rectificador entrante (GIRK) a través de un mecanismo sensible a la proteína pertusis en donde pueden estar implicadas las subunidades beta y alfa de la proteína  $G_i/G_o$ . La activación de los canales Kir 3 mediada por melatonina aumentan la conductancia de potasio (Jiang y cols., 1995) e inhiben el disparo neuronal en el núcleo supraquiasmático (Brown y Piggins, 2007).

Poco se conoce sobre los mecanismos celulares que regulan a los receptores a melatonina. Se ha propuesto que la sensibilidad de los receptores a melatonina

fluctua a lo largo del ciclo de 24 horas; este cambio de sensibilidad podría estar regulado por la melatonina misma, por la señal fotoperiódica y/o por otras hormonas (Gauer y cols.,1993a; Gauer y cols., 1993b; Vanecek, 1998; Witt-Enderby y cols., 2003)

En experimentos *in vivo* realizados en neuronas del núcleo supraquiasmático de la rata ha sido mostrado que cuando las células son expuestas a niveles farmacológicos de melatonina durante  $\leq 1$  hora, el receptor MT<sub>1</sub> no presenta desensibilización (Ying y cols., 1998). Sin embargo, la exposición crónica de los receptores MT<sub>2</sub> a melatonina expresados en células CHO o NIH3T3 (MacKenzie y cols., 2002; Gerdin y cols., 2004) y en la línea celular SCN2.2 (Gerdin y cols., 2004), tanto a niveles fisiológicos como farmacológicos, desensibiliza a los receptores MT<sub>2</sub>, al parecer sin afectar la sensibilidad de los MT<sub>1</sub>. Esta desensibilización del receptor MT<sub>2</sub> posiblemente se lleve a través de la internalización del receptor (Cajochen y cols., 2003; Gerdin y cols., 2004). Después de ser internalizados, los receptores acoplados a la proteína G, son un blanco a endosomas para ser degradados o reciclados a la superficie celular (Sibley y cols., 1987; Haussdorff y cols., 1990).

El fotoperiodo podría regular la densidad de los receptores a melatonina. Por ejemplo, en el núcleo supraquiasmático de la rata, la densidad de los receptores varía con el ciclo luz-oscuridad. Los niveles de los receptores son bajos durante la noche, es decir están fuera de fase con el nivel de melatonina (Ligo y cols., 2003;



[Witt-Enderby y cols., 2003](#)). Esta fluctuación ocurre aun cuando la rata es pinealectomizada. También se ha visto que a una señal luminosa de 1 hora durante la noche, induce en ratas pinealectomizadas un aumento de la unión de  $I^{125}$  melatonina en el núcleo supraquiasmático comparado con las ratas adaptadas a oscuridad constante ([Masson-Pevet, y cols., 1996](#); [Masson-Pevet, y cols., 2000](#)). En el núcleo supraquiasmático de ratas nativas *in vitro*, la activación del receptor  $MT_2$ , a través de la cascada de señalización dependiente de PKC, cambia la fase del pico del ritmo circadiano del disparo neuronal tanto al amanecer y al atardecer ([Hunt y cols., 2001](#)). En la línea celular SCN2.2 se ha descrito una ventana de sensibilidad de los receptores  $MT_2$  equivalente a los periodos de sensibilidad descritos para melatonina: aproximadamente en el tiempo circadiano entre 9 y 11 al amanecer y al atardecer entre los 23 y los 2 ([Rivera-Bermúdez y cols., 2003](#)).

## JUSTIFICACIÓN

En el acocil *Procambarus clarkii*, las células retinulares se han propuesto como los efectores del ritmo circadiano de sensibilidad a la luz. En esta especie, la melatonina es sintetizada siguiendo un ritmo diario con un aumento de concentración en la escotofase. En acociles intactos mantenidos en oscuridad constante, la aplicación de melatonina cerca de la cavidad cardiaca durante 10 días consecutivos, sincroniza este ritmo circadiano. En este trabajo estudiaremos el efecto de la melatonina sobre la respuesta eléctrica provocada por estímulos luminosos (potencial de receptor) en tallos oculares aislados, cuando la hormona es aplicada por perfusión en distintos tiempos de un ciclo de 24 h. Esta estrategia nos permitirá analizar si la melatonina modifica el potencial de receptor de las células retinulares, de un modo dependiente de la hora de aplicación como se esperaría de un sincronizador no luminoso y si actúa mediante un receptor membranal, lo que nos permitirá evidenciar el mecanismo celular mediante el cual la melatonina modula el potencial de receptor de las células retinulares del acocil.

Por otro lado, no hay evidencias sobre el efecto de la melatonina en los mecanismos iónicos que subyacen al potencial de receptor de las células retinulares del acocil. En este trabajo, se iniciará el estudio del efecto de la melatonina sobre las corrientes iónicas que subyacen al potencial de receptor de las células retinulares.

## **HIPÓTESIS**

La respuesta a la luz de las células retinulares es modulada por la melatonina por medio de receptores membranales que modifican las corrientes iónicas responsables del potencial de receptor.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Estudiar la acción de la melatonina y del receptor membranal a melatonina sobre el potencial de receptor de las células retinulares del acocil en un ciclo circadiano; así como, determinar el efecto de la melatonina sobre las corrientes iónicas de la fotorrespuesta de las células retinulares.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de la aplicación de melatonina exógena sobre el potencial de receptor cada dos horas durante un ciclo de 24 horas.
2. Establecer la expresión de receptores membranales a melatonina en el tallo ocular del acocil.
3. Determinar el efecto de la melatonina exógena sobre las corrientes iónicas que subyacen al potencial de receptor.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos de esta tesis se siguió la siguiente estrategia:

1.- Se estableció si la melatonina tiene un efecto dependiente de la hora de su aplicación sobre una función que se sabe que muestra un ritmo circadiano. Para ello se realizaron registros intracelulares de la actividad eléctrica de las células retinulares estimuladas con pulsos de luz (potencial de receptor, PR), en acociles *Procambarus clarkii*. Las células retinulares se han considerado los efectores y sincronizadores del ritmo circadiano de sensibilidad a la luz. Se probó el efecto de la melatonina sobre el PR de las células retinulares cada dos horas hasta completar un ciclo de 24 horas.

2.- Para determinar si el efecto de la melatonina sobre el PR está mediado por receptores membranales se hicieron dos tipos de experimentos: a) Se probó el efecto del agonista 8-metoxi-propianomidotetralina (8-M-PDOT) y del antagonista N-Pentanoil-2-benziltriptamina (DH97) sobre el PR. Ambos fármacos son selectivos del receptor a melatonina del subtipo MT<sub>2</sub>. El 8-M-PDOT se aplicó a una hora en la que el nivel endógeno de melatonina en el tallo ocular del acocil es bajo y el DH97 se aplicó a otra hora en la que la concentración de melatonina es alta; b) Se realizaron ensayos de unión de [<sup>125</sup>I] melatonina con las membranas del tallo ocular del acocil en el TC 6 y 18.

Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

3. Para determinar si la melatonina regula las corrientes que subyacen al PR, se realizaron registros intracelulares de las células retinulares del acocil con la técnica de control de voltaje.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Los experimentos fueron realizados con acociles adultos *Procambarus clarkii* (Girard) obtenidos del estado de Chihuahua, México. Los acociles fueron aclimatados a condiciones de laboratorio durante un mes en un acuario oxigenado bajo condiciones de fotoperíodo de luz-oscuridad 12:12 (encendido de la luz a las 7 am) a  $16 \pm 2$  °C. Los acociles fueron alimentados dos veces a la semana con camaronina (Purina).

El tiempo circadiano (TC) fue determinado por medio del registro del ritmo circadiano de sensibilidad a la luz de las células retinulares (electrorretinograma, ERG) de un grupo de acociles puestos en ciclos luz-oscuridad 12:12. El TC fue extrapolado con el ciclo luz-oscuridad. De acuerdo al ritmo circadiano de la amplitud del ERG, el TC 0 fue considerado como el momento del ciclo en el que el nivel de actividad excede el 50% de la amplitud de cada ciclo. CT 24 fue un ciclo completo después (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983). La mayor sensibilidad a la luz de la retina se presenta durante el periodo nocturno o tiempo de actividad del acocil (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983). El cuidado de los animales se llevó a cabo bajo las reglas establecidas por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **Registro electrofisiológico de las células retinulares**

La respuesta eléctrica a la luz, potencial de receptor, de las células retinulares fue obtenida después de que el acocil fue anestesiado con hielo durante 10 minutos. El tallo ocular se aisló del resto del acocil cortándolo desde su base con tijeras finas. En la córnea del tallo ocular se hizo un corte dorsal de 1 mm con una navaja. El tallo ocular se colocó en una cámara de perfusión con capacidad de 2 ml y flujo de 0.5 ml/s. La cámara de perfusión se colocó dentro de una caja de Faraday en oscuridad constante y a 16 °C. Para perfundir el tallo ocular, se utilizó solución salina Van Harreveld (VH) para crustáceos cuya composición es la siguiente: NaCl 205, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 13.6, MgCl<sub>2</sub> 2.6, Hepes 5; pH 7.5).

El potencial de receptor fue registrado de células retinulares de tallos oculares adaptados a la oscuridad. La señal eléctrica de las células retinulares se registró con micropipetas intracelulares. Las micropipetas fueron fabricadas de tubos de borosilicato y tuvieron una resistencia de entre 30 y 50 MΩ una vez que fueron llenadas con una solución de KCl saturado, 2.7 M. El electrodo de referencia fue un alambre de plata clorurada. La micropipeta se introdujo por una ventana hecha en la retina, en forma paralela al eje longitudinal del tallo ocular, con la ayuda de un micromanipulador hasta penetrar una célula retinular. Los criterios para considerar que la micropipeta penetró la membrana de una célula retinular fueron: a) una baja súbita en el voltaje, alrededor de aproximadamente -35 mV, que

corresponde al potencial de membrana en reposo y b) una despolarización de la célula retinular que se presentó cuando la retina se estimuló con luz.

El estímulo de luz fue aplicado paralelo al eje longitudinal del tallo ocular con una intensidad de 1800 lux y una duración de 10  $\mu$ s producido por un fotoestimulador (Log<sub>10</sub> 16; Grass Instruments, PS33; Quince, Mass., USA). El estímulo luminoso se aplicó cada dos minutos.

La respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares que corresponde al potencial de receptor fue amplificada (Axon Instruments Inc., Axoclamp 2A; Foster City, CA, USA) y visualizada en un osciloscopio (Tektroniks, TDS 460; Beaverton, Oregon., USA). La misma señal fue digitalizada (Axon Instruments Inc., Interface Digidata 1200, Foster City, CA, USA) y almacenada para su posterior análisis en una computadora (Fig. 7).



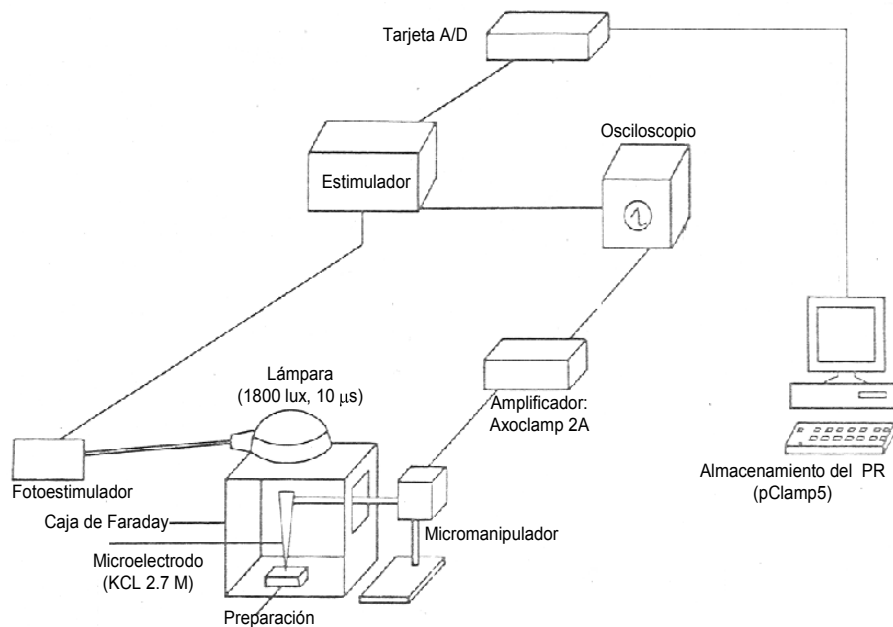


Fig. 7. Esquema del sistema de registro del potencial de receptor de las células retinulares del acocil. El tallo ocular se colocaba en una caja de perfusión que a su vez se encontraba dentro de una caja de Faraday.

## Diseño experimental

El tallo ocular fue mantenido en condiciones constantes de oscuridad. El PR de las células retinulares se registraba cuando el potencial de membrana en reposo y el potencial de receptor eran constantes. Una vez estabilizada la respuesta, el experimento se dividió en tres pasos: 1) en los primeros 20 minutos la preparación fue perfundida con solución salina VH, 2) durante los siguientes 20 minutos se perfundió VH + fármaco, 3) durante los últimos 20 minutos nuevamente se perfundió la preparación en solución VH (Fig 8).

## Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

La señal luminosa para generar el PR de las células retinulares fue aplicada a intervalos de 2 minutos durante todo el experimento. En los experimentos control, en el paso 2 la solución VH fue cambiada por una que contenía VH + DMSO (0.01 %).

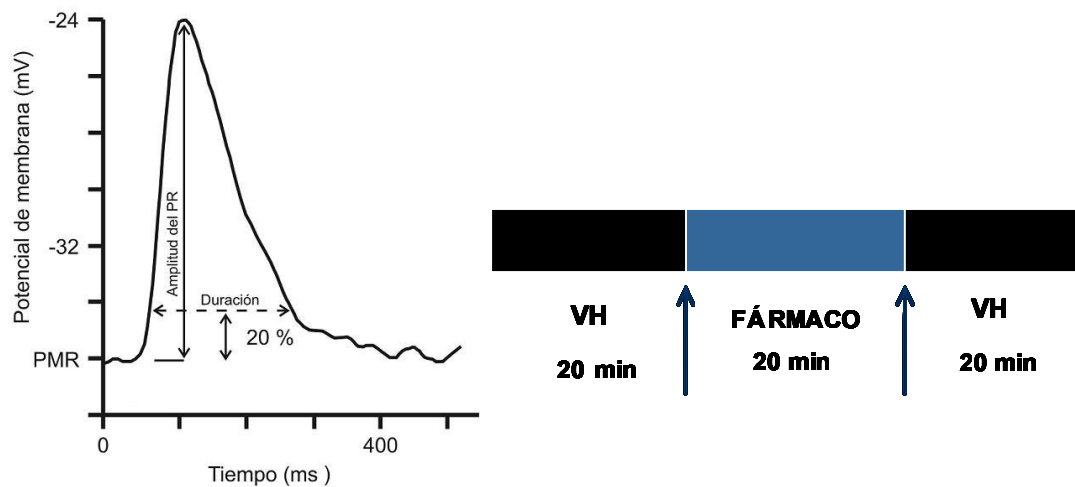


Fig. 8. Esquema de los tiempos de perfusión de los fármacos en el tallo ocular del acocil. La respuesta eléctrica a la luz, potencial de receptor (PR), de las células retinulares fue obtenida cada dos min durante 60 minutos (trazo del lado izquierdo). El estímulo luminoso (1800 lux/10  $\mu$ s) se dio al tiempo cero. La amplitud del PR correspondió a la diferencia en el voltaje a partir del potencial de membrana en reposo (PRM) y hasta el valor máximo de la despolarización. La duración fue el tiempo que transcurrió desde que la amplitud alcanzó 20% y disminuyó a 80%. VH, corresponde a la solución salina Van Harreveld. Las flechas de la barra indican los cambios de solución durante el experimento.

Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

Los fármacos que se probaron fueron: 1) melatonina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 2) 8-metoxi-propionomidotetralina (8-M-PDOT), un agonista selectivo al receptor de melatonina del tipo  $MT_2$  (Tocris Cookson Inc, Ballwin, MO, USA); 8-M-PDOT es 20 veces selectivo al subtipo  $MT_2$  (vs  $MT_1$ ) y el valor de  $pK_i$  de 8.03 en receptores de vertebrados; 3) N-Pentanoil-2-benziltryptamina (DH97) un antagonista selectivo al receptor de melatonina del tipo  $MT_2$  (Tocris Cookson Inc.). DH97 es 89 veces más selectivo sobre  $MT_1$  y su valor de  $pK_i$  es 8.95 para receptores  $MT_2$  de vertebrados.

Melatonina, 8-M-PDOT y DH97 fueron disueltos en dimetil sulfoxido al 0.01% (DMSO; Sigma) y diluidos en solución salina VH hasta alcanzar la concentración final.

El PR de las células retinulares fue registrado en presencia de melatonina, 8-M-PDOT y el DH97 para determinar el efecto a diferentes concentraciones. La concentración de los fármacos varió de modo logarítmico en un intervalo entre  $1 \times 10^{-15}$  a  $1 \times 10^{-4}$  en el caso de melatonina, y entre  $1 \times 10^{-14}$  a  $1 \times 10^{-5}$  para el 8-M-PDOT y DH97. Para elaborar las gráficas, se consideró en cada experimento el valor de la amplitud del PR obtenido en el minuto 20 del paso 2 (minuto 40 del experimento). Se promedió el valor de la amplitud de 4 experimentos por cada concentración del fármaco.

Cada dos horas, hasta completar un ciclo de 24 horas, se aisló un tallo ocular del acocil para determinar el efecto de la melatonina sobre el PR de las células retinulares. El 8-M-PDOT y DH97 fueron probados los tiempos circadianos (CT) 6 y 18.

### **Análisis de datos**

De cada PR de las células retinulares se calculaban los siguientes parámetros: 1) el potencial de membrana en reposo (PMR) en milivoltios (mV), 2) la amplitud al pico o fase transitoria del PR en mV y 3) la duración o tiempo transcurrido entre la despolarización y la repolarización del PR en milisegundos (ms) (figura 8). La amplitud del PR correspondió a la diferencia en el voltaje a partir del PMR y hasta el valor máximo de la despolarización. La duración fue el tiempo transcurrido desde que la amplitud alcanzaba el 20% y disminuía a 80% del máximo alcanzado. Todos los registros del PR fueron analizados en el programa pclamp 9.2 (Axon instruments).

En general, el curso temporal de la amplitud y la duración del PR se normalizaban con respecto al control. El 100% correspondió al promedio de las 10 respuestas del paso 1. Se obtiene el promedio  $\pm$  el error estándar de los valores registrados cada dos minutos de 4-6 experimentos por cada hora. Se graficó el curso temporal de la amplitud en presencia de melatonina y de los fármacos en cada

caso. También se graficó el valor de la amplitud y de la duración del PR obtenido después de 20 min en presencia de melatonina (minuto 40 del experimento) vs el tiempo. El análisis estadístico se realizó con el programa Sigma Stat versión 10.0.

Para determinar si había diferencia significativa entre: 1) el control de la amplitud del PR y la hora del día, 2) el máximo efecto producido por la melatonina en la amplitud del PR (después de 20 minutos de su aplicación) y la hora del día y 3) el máximo efecto producido por la melatonina en la amplitud del PR (después de 20 minutos de su aplicación) durante las horas del día contra las horas de la noche, se aplicó una prueba estadística ANOVA de una vía. Cuando se encontraba diferencia significativa se aplicaba una prueba post hoc de Tukey.

Para determinar si había diferencia significativa entre el control y el efecto de la melatonina respecto de la hora del día, se realizaba una prueba estadística ANOVA de dos vías. Si se encontraban diferencias significativas se realizaba una prueba del método de Student-Newman-Keuls.

## **Unión de [ $^{125}$ ] melatonina a las membranas de los tallos oculares**

### **Preparación de las membranas**

15 pares de tallos oculares fueron cortados desde su base con tijeras finas en los tiempos circadianos 6 y 18. La quitina de los tallos oculares fue eliminada. Los tallos oculares incluyen: tejido conectivo, fibras musculares, axones y neuronas de diferentes ganglios ópticos, las células retinulares, probablemente el cono cristalino, células del pigmento distal y córnea.

Los tallos oculares sin quitina fueron colocados en una solución amortiguadora que contenía Tris-HCL a 50 mM (pH 7.5 a 4°C) y fueron homogenizados con un homogenizador de tejidos ultrasónico (Cole-Palmer Instruments) con 5 pulsos por 10 s.

Los tallos oculares homogenizados fueron centrifugados a 36 000 x g durante 30 min a 4°C; el sobrenadante fue desechado y el precipitado resuspendido en el volumen inicial y centrifugado nuevamente. Finalmente, el precipitado fue resuspendido por homogenización en un volumen de 1.5 mL con solución amortiguadora y almacenado a -70°C para posteriormente realizar los experimentos de unión al receptor de melatonina.

### **Determinación de la concentración de proteínas: Método de Lowry**

Se diluyó 1 mg de albúmina proteína sérica bovina en 1ml de agua desionizada. Con esta solución se preparó una curva estándar con las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 y 100 ug en un volumen final de 150 ul. Se tomaron 10ul del precipitado de las membranas de retina del acocil para determinar las proteínas por triplicado.

Realizada la curva se determinó la concentración de proteínas según la técnica de Lowry que consiste en agregar 50µl de NaOH 0.4N y 1ml de reactivo alcalino de cobre (50ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0.10N, 0.5ml de CuSO<sub>4</sub> al 1% y 0.5ml de tartrato de sodio y potasio al 2%). Los tubos se incubaron y agitaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteus (100 µl) a cada tubo. Los tubos se agitaron e incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro a 700nm (Baush & Lomb Spectronic 1001). Los valores de las muestras fueron calculados por interpolación con las concentraciones conocidas del estándar de albúmina proteína sérica bovina.

La fracción membranal de los tallos oculares fue incubada con diferentes concentraciones de [<sup>125</sup>I] melatonina. Los ensayos de unión fueron hechos en tubos que contenían 100 µg de proteínas de membranas del tallo ocular del

Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

acocil,  $^{125}\text{I}$  melatonina (0.1-1.7 nM) y melatonina (10  $\mu\text{M}$ ) no marcada o solución amortiguadora. El ensayo de unión de  $^{125}\text{I}$  melatonina fue medido en duplicado después de la incubación a 4 °C durante 2 h en oscuridad. La reacción se paró agregando 5 mL de solución amortiguadora fría. El contenido de los tubos fue inmediatamente filtrado a través de filtros de fibra de vidrio cubiertos con solución de polietilamina al 0.3 %, utilizando un cosechador de células Brandel. Los filtros se lavaron 2 veces con 5 mL de solución amortiguadora. La radioactividad fue determinada en un contador gamma.

### **Análisis de datos**

La unión no específica fue definida como la unión en presencia de melatonina fría. La unión específica de [ $^{125}\text{I}$ ] melatonina (2200 Ci / mmol) fue calculada restando la unión no específica de la unión total y expresada como fmol / mg de proteína.

Se calcularon la constante de disociación ( $k_d$ ) y el número de sitios de unión ( $B_{max}$ ) por medio del método de Scatchard. En la gráfica del Scatchard se representó la relación entre la cantidad de [ $^{125}\text{I}$ ] melatonina y el valor de la unión específica. La pendiente obtenida en esta función dio el valor de la constante de afinidad de la [ $^{125}\text{I}$ ] melatonina con los receptores a melatonina membranales y la intersección con la abscisa nos indicó un valor proporcional al número de sitios activos de unión.



### **Control de voltaje de las células retinulares**

Las corrientes de membrana de las células retinulares se midieron utilizando el método de control de voltaje. La resistencia del electrodo fue de 50 a 70 M $\Omega$ . Se utilizó un amplificador Axoclamp 2A (Axon instruments, Inc) en el modo “single electrode voltaje clamp”. El potencial de mantenimiento inicial fue de -37 mV y correspondió con el PMR de las células retinulares. La frecuencia de muestreo fue de 0.3-0.5 kHz y fue ajustada la capacitancia del electrodo.

Las corrientes iónicas que subyacen al potencial de receptor fueron registradas estimulando las células retinulares con un estímulo de luz de 1800 lux de intensidad y 10  $\mu$ s de duración. A los 50 ms de iniciada la respuesta provocada por la luz (que en la mayoría de los casos correspondió con el pico de la corriente entrante generada por el estímulo luminoso) fueron aplicados, cada dos minutos, pulsos de de voltaje desde -65 mV a +35 mV con una duración de 50 ms, en incrementos de 20 mV.

Para conocer el efecto de la melatonina sobre las corrientes iónicas membranales sin fotoestimulación, las células retinulares fueron estimuladas con pulsos de voltaje desde -120 mV hasta +100 mV con una duración de 120 ms en incrementos de 20 mV a partir del potencial de membrana en reposo.

Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

Siguiendo estos protocolos se perfundieron los tallos oculares con las siguientes soluciones: 1) VH y DMSO, como condición control. 2) VH con melatonina disuelta en DMSO. La melatonina se perfundió durante 20 min antes de aplicar el primer estímulo luminoso. 3) VH con una concentración modificada de calcio (con una concentración mM: NaCl 205, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 26, MgCl<sub>2</sub> 2.6, Hepes 5; pH 7.5).

### **Análisis de los datos**

De las corrientes iónicas activadas en la luz y en la oscuridad se midió: 1) el pico de la corriente entrante generada por el estímulo luminoso a diferentes voltajes. Con estos datos se construyó la curva corriente-voltaje; 2) la corriente generada en la oscuridad; 3) las curvas corriente-voltaje se ajustaron con una regresión lineal para determinar la conductancia ( $G$ ) y el potencial de inversión ( $E_{rev}$ ) de la corriente.

## RESULTADOS

### A) Potencial de receptor de las células retinulares

Para obtener la respuesta eléctrica a la luz (potencial de receptor, PR) de las células retinulares del tallo ocular del acocil se realizaron registros intracelulares de las células retinulares. En la figura 9 se muestra un registro típico del PR de las células retinulares en solución salina VH. Cuando a la célula retinular se le introdujo un microelectrodo, se registró un cambio en el voltaje que corresponde al potencial de membrana en reposo (PMR). El valor promedio del PMR fue de  $-31.4 \pm 3.5$  mV y cuando las células retinulares fueron estimuladas con luz (1800 lux, 10  $\mu$ s) se obtuvo como respuesta una despolarización de la membrana de  $16.5 \pm 1.4$  mV con una duración promedio de  $243 \pm 25.6$  ms ( $n=25$  tallos oculares).

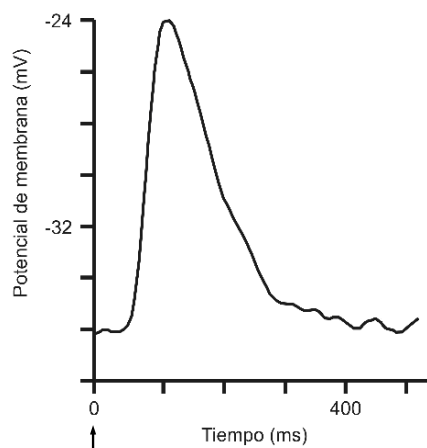


Fig. 9. Potencial de receptor de las células retinulares del tallo ocular de acociles. No se observa la fase estable porque la duración del pulso de luz fue breve. Las células retinulares fueron estimuladas con luz (1800lux, 10 $\mu$ s) en el tiempo cero (flecha).

**B) Efecto de la melatonina sobre el potencial de receptor de las células retinulares durante un ciclo de 24 horas.**

Para determinar el efecto de la melatonina sobre el PR de las células retinulares, primero se realizó una curva dosis-efecto para la melatonina. Los tallos oculares fueron aislados del acocil cuando el nivel endógeno de la melatonina fue bajo, ~30 pg/ tallo ocular (Balzer y cols., 1997) y se obtuvo un registro de las células retinulares. Los tallos oculares fueron perfundidos con la solución vehículo (VH+DMSO 0.01%) y con diferentes concentraciones de melatonina (1 pM to 100  $\mu$ M).

En la figura 10 se muestra el efecto de diferentes concentraciones molares de melatonina en la amplitud del PR. La solución del vehículo no tuvo efecto sobre la amplitud del PR de las células retinulares. La concentración entre 1 y 10 pM de melatonina no modificó significativamente la amplitud del PR, mientras que en presencia de 100 pM a 100 nM, la amplitud del PR aumentó de una manera dependiente de la concentración en valores de 5 a  $20 \pm 1.5$  % (Fig. 10). A concentraciones de melatonina entre 1 y 10  $\mu$ M, la amplitud del PR aumentó a  $3 \pm 0.3$  % (Fig. 10), mientras que a mayores concentraciones de hasta 100  $\mu$ M, la amplitud del PR se redujo hasta en un  $40 \pm 1$  % (Fig. 10). Para probar el efecto de la melatonina en el PR se eligió la concentración 100 nM.

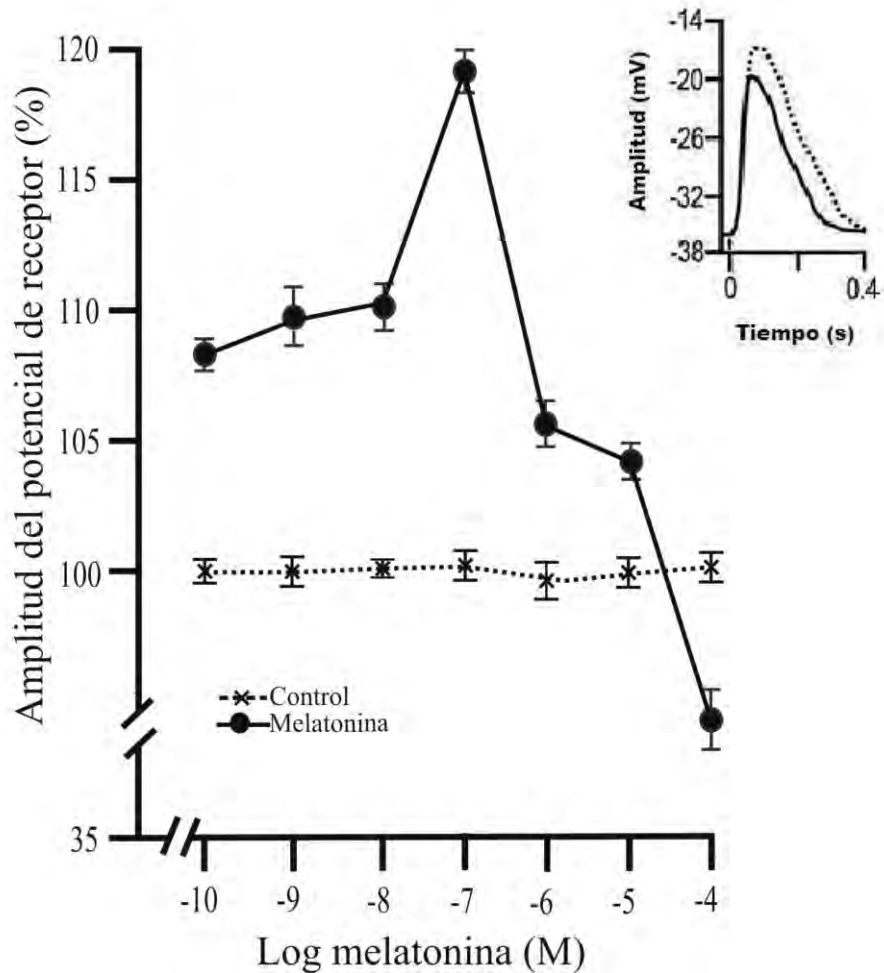


Fig. 10. Efecto de diferentes concentraciones de melatonina sobre la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares. Los tallos oculares fueron aislados del acocil cuando el nivel endógeno de melatonina en el tallo ocular fue bajo, ~30 pg/tallo ocular. La respuesta eléctrica de las células retinulares a la luz (potencial de receptor, PR) fue registrada en presencia del vehículo (x; VH+DMSO 0.01%) o de melatonina (●). El cien por ciento representa la amplitud del PR antes de la aplicación del vehículo o de melatonina. La melatonina fue perfundida desde 10<sup>-10</sup> hasta 10<sup>-4</sup>. Se graficó el efecto producido por la melatonina (después de 20 min de haberla perfundido) sobre la amplitud del PR. Cada punto representa la media ± error estándar de la media (SEM) de cinco experimentos. Del lado derecho de la gráfica se muestra un trazo típico de PR registrado de las células retinulares perfundidos con el vehículo (línea sólida) y con melatonina 100 nM, después de haberla perfundido 20 min (línea punteada).

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

Para determinar el efecto de la melatonina sobre los componentes (amplitud y duración) del PR de las células retinulares cada dos horas, hasta completar un ciclo de 24 horas, se aisló un tallo ocular del acocil y se hicieron registros intracelulares de las células retinulares en presencia de 100 nM de melatonina.

En las figuras 11 y 12 se muestra el curso temporal del efecto de la melatonina en la amplitud del PR obtenido de tallos oculares aislados del acocil durante las fases de oscuridad (Fig. 11) y de luz (Fig. 12) del ciclo. Las respuestas obtenidas desde los primeros 20 minutos del experimento en presencia de solución salina VH, fueron considerados como la respuesta basal (100%). En los siguientes 20 minutos el tallo ocular era perfundido en el vehículo (VH+DMSO 0.01%) o la melatonina 100 nM. Finalmente se cambió la solución vehículo o de melatonina por la solución VH. El vehículo no tuvo cambios sobre la amplitud el PR a lo largo del ciclo de 24 horas. La melatonina produjo un aumento en la amplitud del PR que depende de la hora en que se aplique (Fig. 11 y 12). Durante la fase de oscuridad del fotoperiodo (Fig. 11), una hora después de que la luz fue apagada, a las 20 h, la melatonina redujó la amplitud del PR a  $15 \pm 0.5\%$ ; a las 22 h, hubo un pequeño incremento del 3%. El mayor aumento producido por la melatonina durante la fase de oscuridad ( $17.5 \pm 1\%$ ) se dio a las 24 h. A cualquier hora de la fase de luz del fotoperiodo (Fig.12), la melatonina siempre aumentó la amplitud del PR. El mayor efecto observado en la amplitud del PR ( $30 \pm 1.5 \%$ ) fue a las 16 h.

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

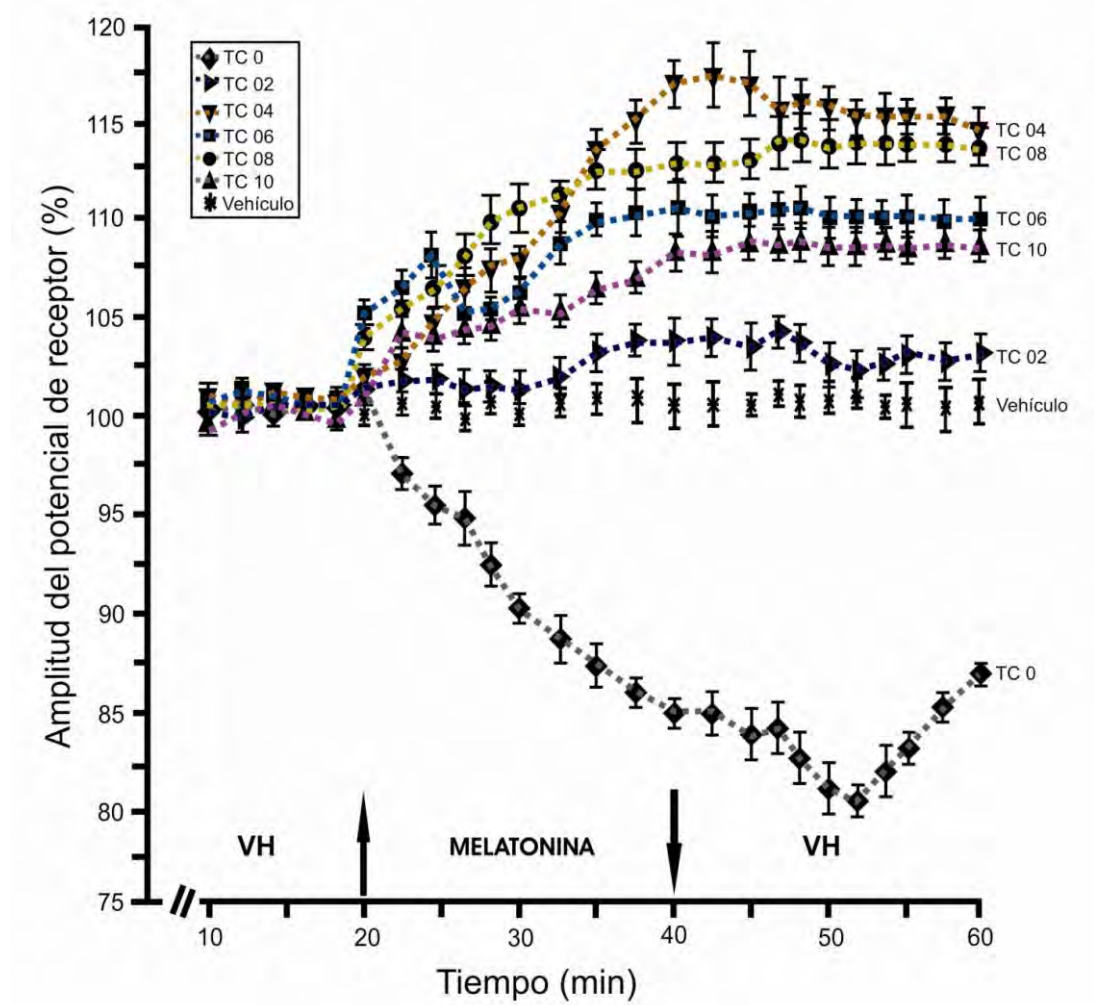


Fig 11. Curso temporal del efecto de la melatonina sobre la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares en diferentes tiempos circadianos (TC). Los tallos oculares fueron aislados cada dos horas durante la fase de oscuridad. La respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares (potencial de receptor, PR) fue registrada en presencia o del vehículo (x; VH+DMSO 0.01%) o de la melatonina 100 nM en diferentes TC (◆ TC 0, ► TC 02, ▼ TC 04, ■ TC 06, ● TC 08 y ▲ TC 10). El 100% representa la amplitud del PR antes de la perfusión del vehículo o de melatonina. Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  SEM de 4-6 experimentos

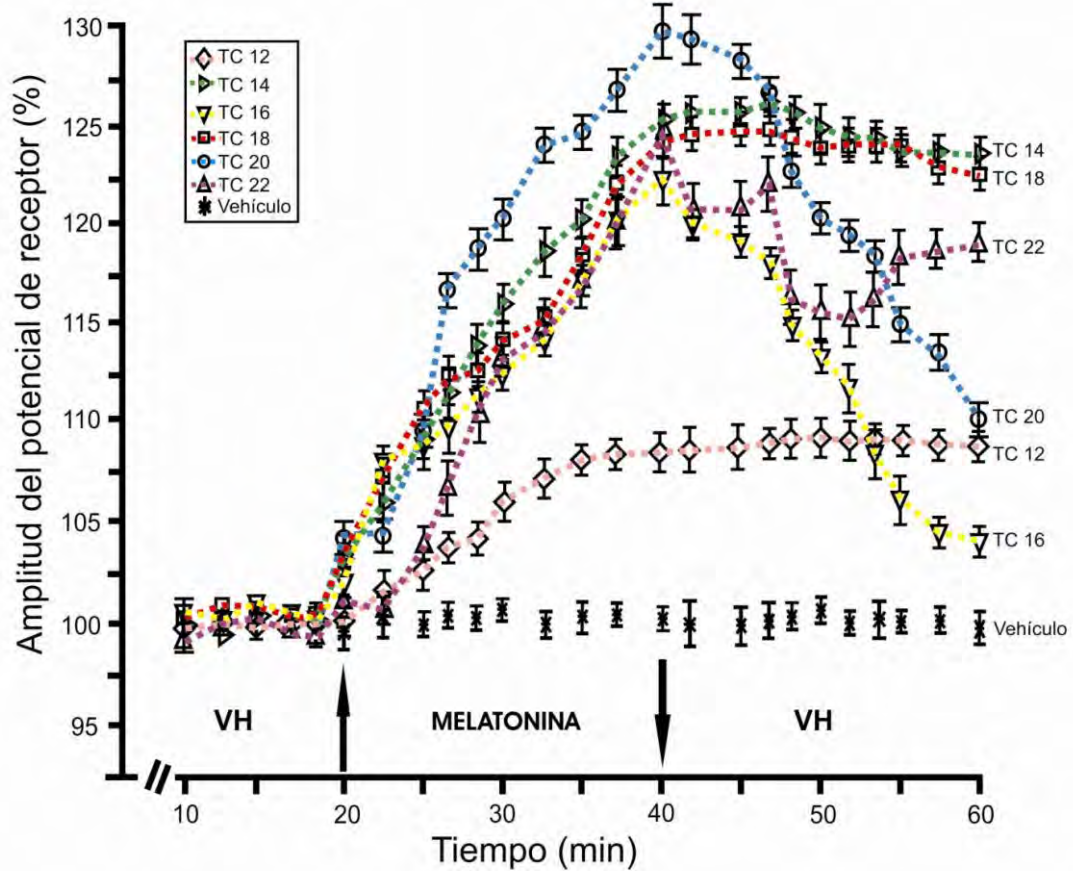


Figura 12. Curso temporal del efecto de la melatonina sobre la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares en diferentes tiempos circadianos (TC). Los tallos oculares fueron aislados cada dos horas durante la fase de luz. La respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares (potencial de receptor, PR) fue registrada en presencia del vehículo (x; VH+DMSO 0.01%) o de la melatonina 100 nM a diferentes TC (◇ TC 12, ▶ TC 14, ▼ TC 16, □ TC 18, ○ TC 20 y △ TC 22). El 100% representa la amplitud del PR antes de la perfusión del vehículo o de melatonina. Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  SEM de 4-6 experimentos.



En la figura 13 se muestra el efecto producido por la melatonina 100 nM, después de 20 min de perfusión (a los 40 minutos del experimento), durante un ciclo circadiano. El tiempo circadiano (TC) fue determinado mediante el registro del ritmo circadiano de la sensibilidad a la luz de las células retinulares (electrorretinograma, ERG) de un grupo de acociles bajo ciclos luz-oscuridad 12:12 (no se muestran los datos). El TC fue extrapolado con el ciclo luz-oscuridad. La solución vehículo no produjo ningún cambio en la amplitud del PR de los fotorreceptores retinulares. La melatonina 100 nM aumentó la amplitud del PR de los fotorreceptores retinulares a lo largo del ciclo circadiano (Fig 13). Cuando se comparó el efecto de la melatonina 100 mM sobre la amplitud del PR, con el tiempo circadiano (ANOVA,  $P < 0.05$ ), se encontró una diferencia significativa. El efecto producido por la melatonina sobre la amplitud del PR fue mayor entre los TC 12 y TC 24 (día subjetivo) que entre los TC 0 y TC 12 (noche subjetiva) (Tukey test,  $P < 0.05$ ). El mínimo efecto producido por la melatonina en la amplitud del PR fue de 3 % en el TC 2 y el máximo fue de  $30 \pm 1.5$  % en el TC 20. Sin embargo, la melatonina redujo la amplitud del PR a  $15 \pm 0.5$  % en el TC 0. En estos resultados se observó que cuando la melatonina fue aplicada durante el período de la noche subjetiva, lo que coincide con el momento en que la concentración de melatonina endógena en el tallo ocular es mayor, el incremento de la amplitud de PR fue menor. El mayor incremento se observó al aplicar melatonina durante el día subjetivo.

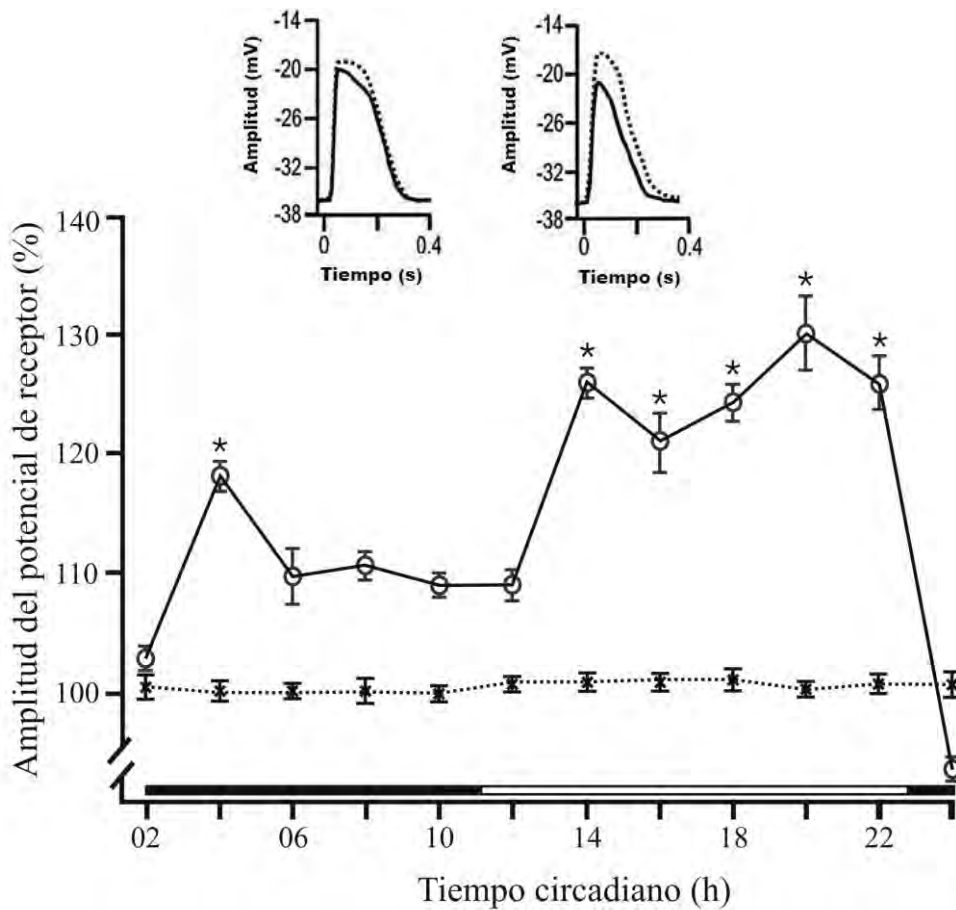


Fig. 13. La melatonina aumenta la amplitud del potencial de receptor durante un ciclo circadiano. Los tallos oculares fueron aislados cada 2 horas a lo largo de un ciclo de 24 h. La respuesta eléctrica a la luz (potencial de receptor, PR) de las células retinulares fue registrada en presencia del vehículo (x; VH+DMSO 0.01%) o de la melatonina 100 nM (o) a intervalos de 2h. La gráfica muestra el registro del máximo efecto producido por la melatonina en la amplitud del PR (después de 20 minutos de su aplicación). El cien por ciento representa la amplitud del PR antes de la aplicación del vehículo o de la melatonina. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM de cuatro a seis experimentos independientes. \* $p < 0.05$ . En la parte superior de la figura se muestra el trazado típico de un PR registrado de las células retinulares perfundidas en solución salina VH (línea sólida) y en melatonina después de haber sido perfundidas 20 min (línea punteada) durante la noche subjetiva al TC 2 (izq.) y el día subjetivo al TC 20 (der.). La noche subjetiva del acocil fue considerada del TC 0 al 12 (período de actividad del acocil). El tiempo circadiano fue extrapolado con el ciclo luz-oscuridad (barra inferior de la gráfica).

## Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

En las figuras 14 y 15 se muestra el curso temporal del efecto de la melatonina en la duración del PR (tiempo que transcurre entre la despolarización y la repolarización), obtenido de tallos oculares aislados del acocil durante la fase de oscuridad (Fig. 14) o de luz (Fig. 15) del fotoperiodo. No hubo cambios en la respuesta durante los primeros 20 minutos del experimento en presencia de solución salina VH (respuesta basal). En los siguientes 20 minutos se perfundió melatonina 100 nM, finalmente se cambió la solución de melatonina por solución VH. Durante la fase de oscuridad del fotoperiodo (Fig. 14), se observó que la melatonina disminuye la duración del PR a las 2, 4 y 6 h; mientras que a las 20 h y a las 24 h, durante los primeros minutos de la perfusión de melatonina, se observó un aumento en la duración del PR de  $5 \pm 0.2\%$ . Estos resultados muestran que cuando la melatonina fue aplicada durante las horas del día subjetivo, aumentó la duración del PR y que disminuyó durante la noche subjetiva.

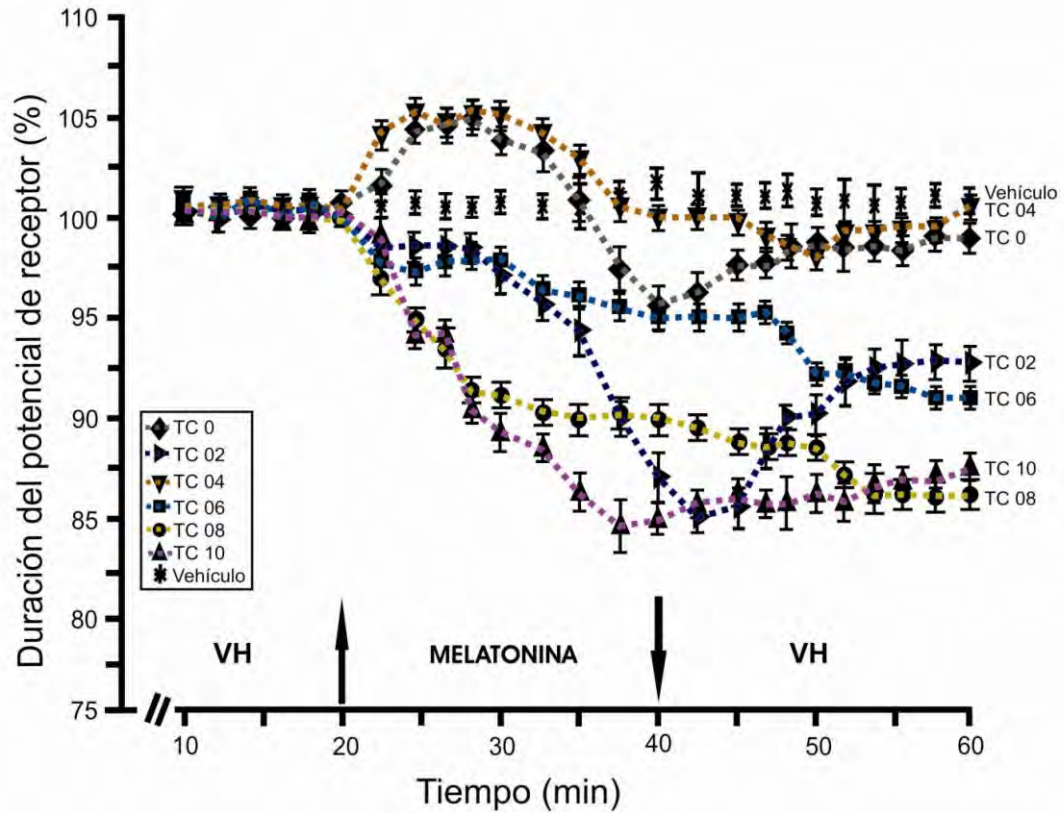


Figura 14. Curso temporal del efecto de la melatonina sobre la duración del potencial de receptor de las células retinulares en diferentes tiempos circadianos (TC). Los tallos oculares fueron aislados cada dos horas durante la fase de oscuridad. La respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares (potencial de receptor, PR) fue registrada en presencia del vehículo (x; VH+DMSO 0.01%) o de melatonina 100 nM a diferentes TC (♦ TC 0, ► TC 02, ▼ TC 04, ■ TC 06, ● TC 08 y ▲ TC 10). El 100% representa la amplitud del PR antes de la perfusión del vehículo o de melatonina. Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  SEM de 4-6 experimentos.

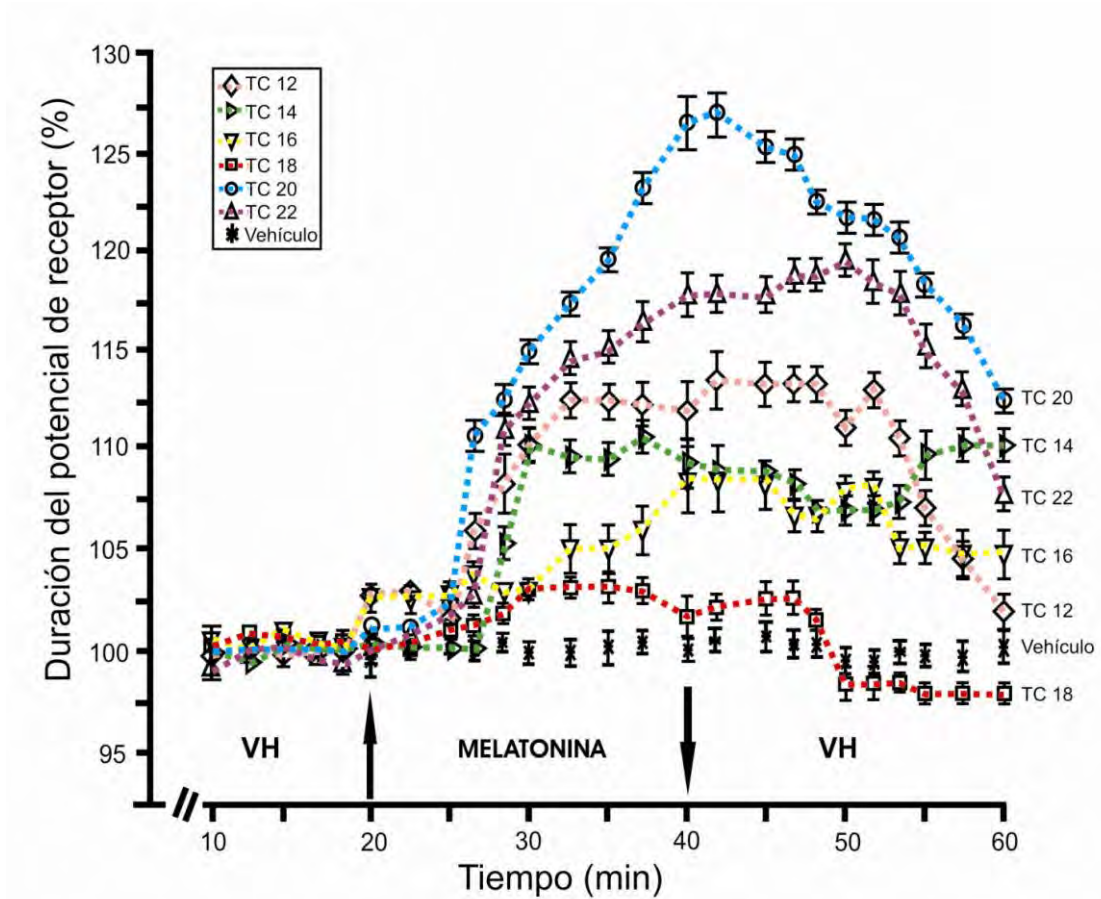


Figura 15. Curso temporal del efecto de la melatonina en la duración del potencial de receptor de las células retinulares en diferentes tiempos circadianos (TC). Los tallos oculares fueron aislados cada dos horas durante la fase de luz. La respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares (potencial de receptor, PR) fue registrada en presencia del vehículo (x; VH+DMSO 0.01%) o de la melatonina 100 nM en diferentes TC (◇ TC 12, ▶ TC 14, ▼ TC 16, □ TC 18, ○ TC 20 y △ TC 22). El 100% representa la amplitud del PR antes de la perfusión del vehículo o de la melatonina. Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  SEM de 4-6 experimentos.

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

En la figura 16 se muestra el efecto de la melatonina sobre la duración del PR durante un ciclo circadiano producido al minuto 20 del experimento. El TC fue extrapolado con el ciclo luz-oscuridad (igual que en la figura 13). Se observaron efectos que dependen de la fase del fotoperíodo en que se aplicó la melatonina: una disminución de hasta  $20\pm 0.5$  % durante la noche subjetiva y un aumento de hasta  $25\pm 1.5$  % durante el día subjetivo (Fig. 16). Este cambio en el efecto de la melatonina sobre la duración del PR se presentó en la transición de la fase de oscuridad a la fase de luz. Si se comparan los valores obtenidos en solución control contra los valores alcanzados por el efecto de la melatonina, se encuentra que no hay diferencias significativas en la duración del PR a lo largo del ciclo de 24 h. Al parecer, la melatonina no afecta la repolarización del PR de las células retinulares.

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

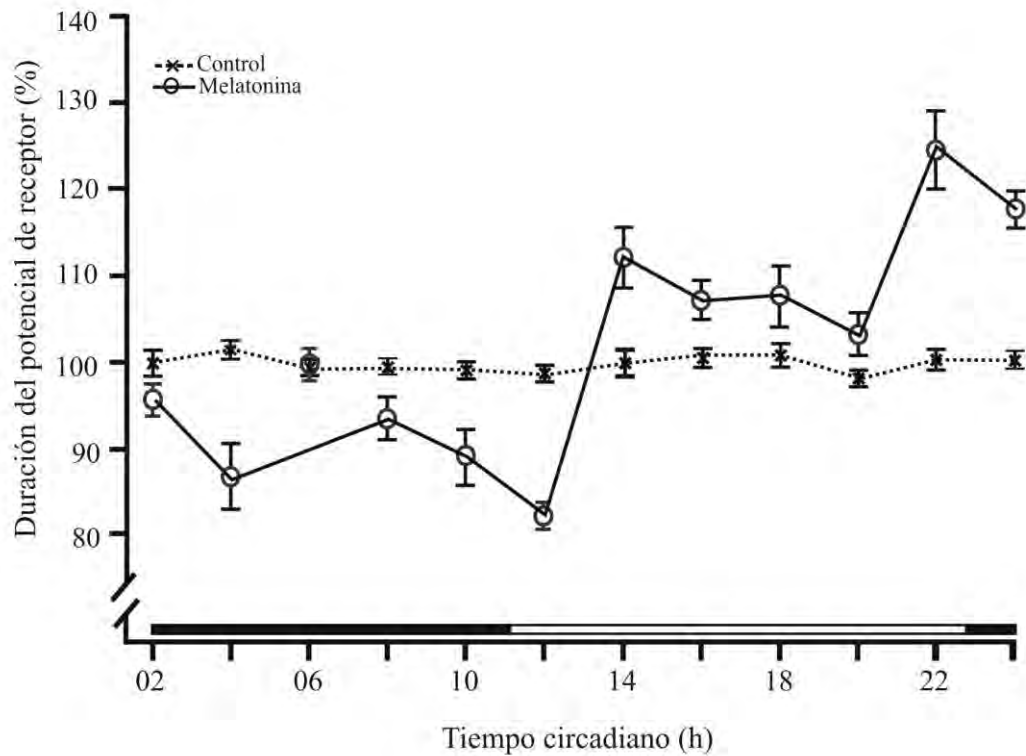


Figura 16. Efecto de la melatonina en la duración del potencial de receptor de las células retinulares durante un ciclo circadiano. Los tallos oculares fueron aislados cada dos horas durante un ciclo de 24 horas. La respuesta eléctrica de las células retinulares a la luz (potencial de receptor, PR) fue registrado en presencia del vehículo (x; VH+DMSO 0.01%) o de melatonina 100 mM (o) a intervalos de 2 h iniciando al tiempo circadiano (TC) 02. La gráfica muestra el valor del efecto producido por la melatonina en la amplitud del PR (minuto 20 de la aplicación de melatonina). El 100% representa la duración del PR antes de la aplicación del vehículo o de la melatonina. Cada punto representa el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 4-6 experimentos. \* $P < 0.05$ . La noche subjetiva del acocil fue considerada del TC 0 al TC 12 (periodo de actividad del acocil). El tiempo circadiano fue extrapolado con el ciclo luz-oscuridad (barra inferior de la gráfica).

### **C) Efecto del agonista 8-M-PODT y del antagonista DH97 sobre el potencial de receptor de las células retinulares**

Para evaluar si la melatonina actúa por medio de los receptores membranales en la regulación del PR de las células retinulares, se registró el PR de éstas cuando el nivel endógeno de melatonina en el tallo ocular mostró su menor ( $\sim 30$  pg/tallo ocular) y mayor nivel ( $\sim 1250$  pg/tallo ocular). Los compuestos que se probaron fueron: a) melatonina; b) 8-M-PDOT un agonista selectivo del receptor a melatonina  $MT_2$ ; c) DH97 un selectivo y competitivo antagonista del receptor a melatonina  $MT_2$ ; d) la aplicación conjunta de 8-M-PDOT y DH97.

En la figura 17 se observa el efecto de diferentes concentraciones del agonista 8-M-PDOT sobre la amplitud del PR. Los tallos oculares fueron aislados cuando el nivel endógeno de la melatonina fue bajo,  $\sim 30$  pg/eyestalk (Balzer y cols., 1997). Los tallos oculares fueron perfundidos con solución vehículo y con diferentes concentraciones del agonista 8-M-PDOT (desde 100 pM a 1  $\mu$ M).

La solución del vehículo no tuvo efecto sobre la amplitud del PR de las células retinulares. En presencia de 100 pM a 10 nM de 8-M-PDOT se produjo un aumento dependiente de la concentración sobre la amplitud del PR desde  $3 \pm 0.5$  hasta  $15 \pm 1\%$  (Fig. 17). La aplicación de 10  $\mu$ M de 8-M-PDOT redujo la amplitud del PR un  $25 \pm 0.5\%$ , lo que significa que tuvo un efecto equivalente al de la melatonina 100  $\mu$ M. El efecto de 8-M-PDOT sobre la amplitud del PR presentó



semejanzas al ejercido por la melatonina, aunque las magnitudes del fármaco difieren así, por ejemplo, la concentración de 10 nM de 8-M-PDOT fue la más efectiva en aumentar la amplitud del PR mientras que con melatonina fue la concentración 100 nM.

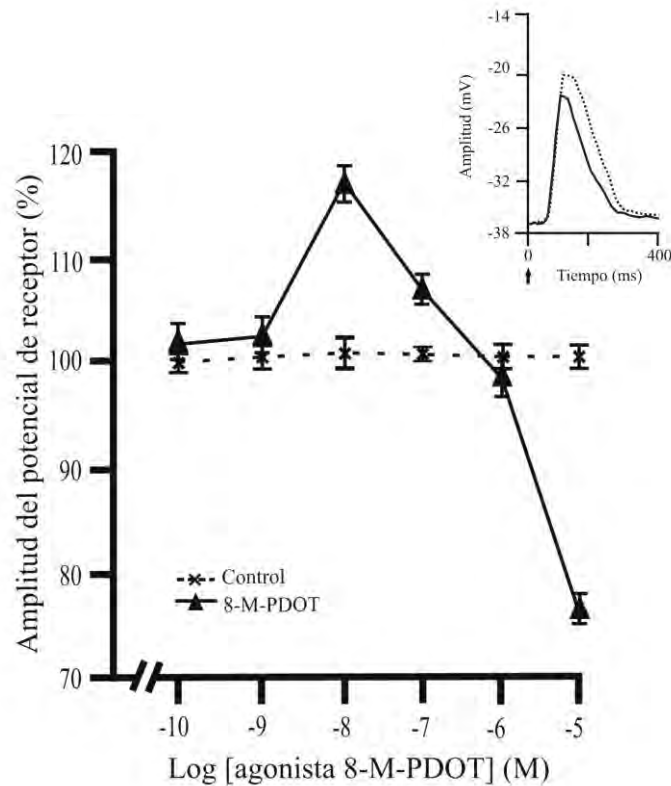


Figura 17. El 8-M-PDOT, agonista selectivo al receptor de melatonina  $MT_2$ , reproduce el efecto de la melatonina en la amplitud del potencial de receptor. Los tallos oculares del acocil fueron aislados cuando el nivel de la melatonina endógena fue bajo  $\sim 30$  pg/tallo ocular. La respuesta eléctrica a la luz (potencial de receptor, PR) de las células retinulares fue registrada en presencia del vehículo (x; VH+DMSO 0.01%) o de 8-M-PDOT ( $\blacktriangle$ ;  $pK_i=8.03$ ). El 8-M-PDOT se probó a dosis desde  $10^{-10}$  hasta  $10^{-5}$  M. El máximo efecto producido por el 8-M-PDOT en la amplitud del PR (después de 20 minutos de su aplicación) fue graficado contra la dosis aplicada. El cien por ciento representa la amplitud del PR basal antes del compuesto probado. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM de cinco experimentos independientes. Del lado derecho de la gráfica se muestra un trazo típico de PR registrado de las células retinulares perfundidas con el vehículo (línea sólida) y con el agonista 8-M-PDOT 10 nM, después de 20 min (línea punteada).

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

En la figura 18 se muestra la curva dosis-efecto del antagonista DH97. La curva se obtuvo de tallos oculares perfundidos con DH97 (desde 100 pM hasta 10  $\mu$ M) a una hora en que el nivel endógeno de melatonina en el tallo ocular muestra el mayor nivel  $\sim$ 1250 pg/tallo ocular (Balzer y cols., 1997). La solución del vehículo no tuvo efecto sobre la amplitud del PR de las células retinulares. El DH97 produjo una reducción de  $30 \pm 1.5$  % en la amplitud del PR dependiente de la concentración. Estos resultados apoyan la idea de que un antagonista específico que bloqueó la acción de la melatonina endógena debe disminuir la amplitud de la respuesta; la melatonina exógena aumenta la amplitud del PR a cualquier hora.

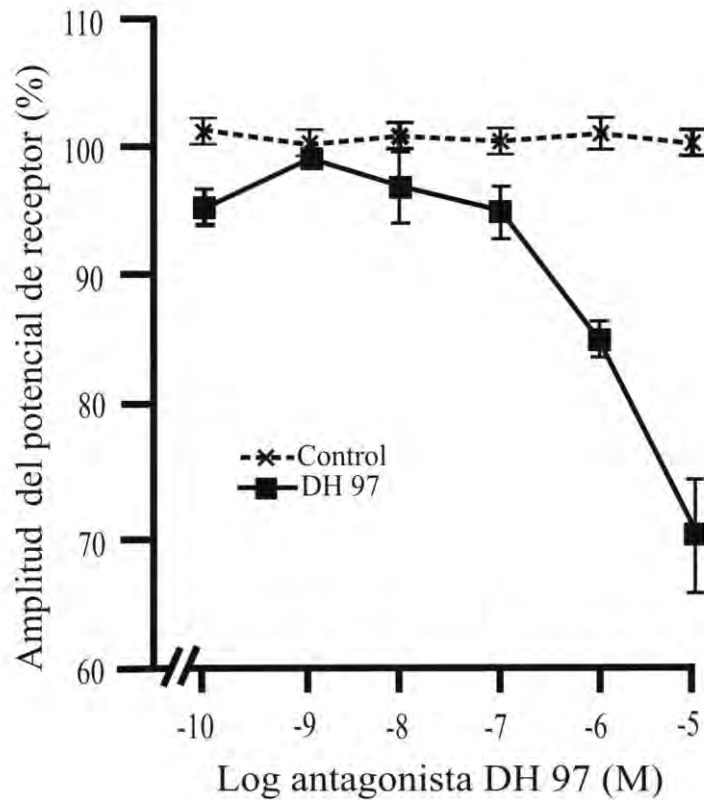


Figura 18. El DH97, un antagonista selectivo al receptor  $MT_2$  de melatonina, produce una reducción dependiente de la concentración en la amplitud del potencial de receptor. Los tallos oculares del acocil fueron aislados cuando el nivel de la melatonina endógena fue alto  $\sim 1250$  pg/tallo ocular. La respuesta eléctrica a la luz (potencial de receptor, PR) de las células retinulares fue registrada en presencia de DH97 (■,  $pK_i = 8.95$ ) o del vehículo (x, VH+DMSO 0.01%). DH97 fue probada a dosis desde  $10^{-10}$  hasta  $10^{-5}$  M. El máximo efecto producido por el DH97 en la amplitud del PR (después de 20 minutos de su aplicación) fue graficado contra la dosis aplicada. El cien por ciento representa la amplitud del PR basal antes de la aplicación del vehículo o de DH97. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM de cinco experimentos independientes.

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

En la figura 19 se presenta el curso temporal del efecto de la melatonina 100 nM, 8-M-PDOT 10nM, DH97 1nM y la combinación de melatonina con DH97 1 nM durante los tiempos circadianos (TC), 6 (Fig. 19A) y TC 18 (Fig 19B). Los tallos oculares del acocil fueron aislados a los TCs 6 y 18. El PR de las células retinulares fue registrado cada dos minutos.

Los primeros 20 minutos, en presencia de VH fueron considerados como la basal del PR, 100 %. Durante los siguientes 20 min se perfundió el agonista 8-M-PDOT 10 nM, la amplitud del PR aumentó a  $14 \pm 0.5$  % en el TC 6 y a  $27 \pm 1$  % en el TC 18. Después del lavado de 8-M-PDOT, del minuto 40 al 60, la amplitud de PR aumentó a  $16 \pm 0.5$  % en el TC 6, y a  $31 \pm 1.5$  % en el TC 18.

Con respecto al efecto de la melatonina 100 nM, ésta aumentó la amplitud del PR a  $8 \pm 0.5$  % en el TC 6 y  $25 \pm 1$  % en el TC 18. Después del lavado de melatonina, la amplitud del PR se mantuvo sin cambio en el TC 6, indicando una incompleta reversibilidad del efecto del 8-M-PDOT. Sin embargo, en el TC 18, el lavado de la melatonina resultó en una ligera disminución en la amplitud del PR de 25 % a 18 %, lo que indica un escaso efecto reversible de la melatonina.

Cuando se compara el efecto entre 8-M-PDOT y melatonina al minuto 40 del experimento hay una diferencia significativa en el TC 6, sin embargo, en el TC 18 estas diferencias desaparecen (*t*-Student's  $p > 0.05$ ).

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

Cuando se agrega DH97 1 nM se observa una reducción en la amplitud del PR de  $3 \pm 0.5$  % en el TC 6 y de  $4 \pm 1$  % en el TC 18. Con la combinación de DH97 más melatonina 100 nM, se atenuó el efecto de ésta en la amplitud del PR a  $2 \pm 0.5$  % en el TC 6 y  $3 \pm 1$  % en el TC 18. El DH97 1 nM en combinación con 8-M-PDOT 10 nM atenuó el efecto de este último en la amplitud del PR a  $2 \pm 0.5$  % en el CT 6 y a  $4 \pm 0.5$  % en el CT 18 (no se muestran los datos en la gráfica). Cuando la solución fue cambiada por la del vehículo hubo una escasa reducción en la amplitud del PR.

Estos resultados ponen de manifiesto que el DH97, un antagonista específico a los receptores  $MT_2$ , bloquea la acción de la melatonina o del 8-M-PDOT (agonista específico a los receptores  $MT_2$ ) sobre la amplitud del PR de las células retinulares en los tiempos circadianos considerados.

# Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

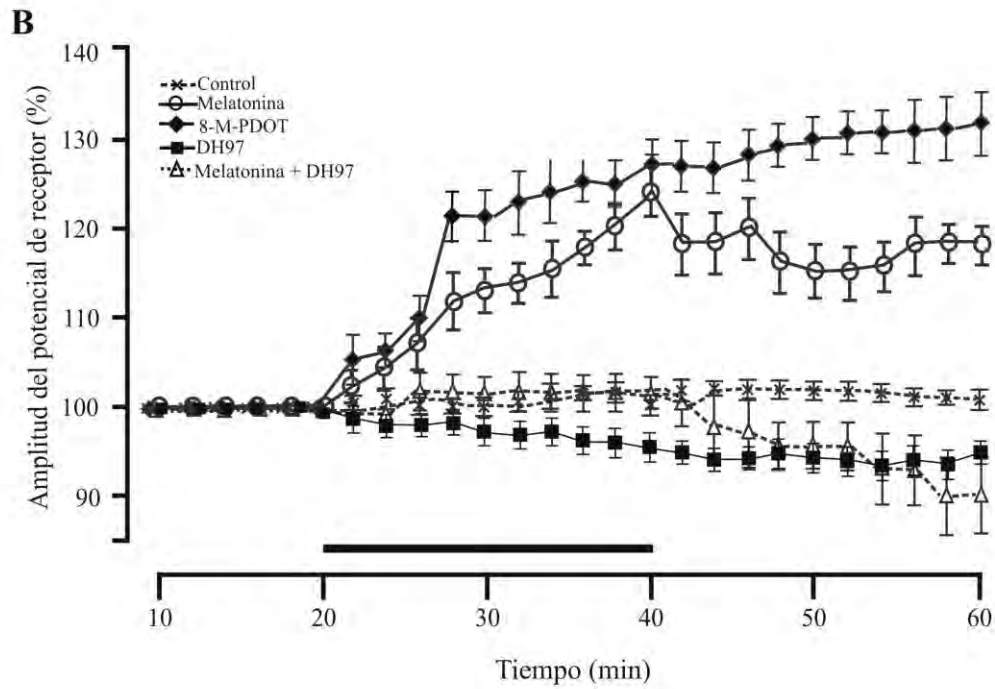
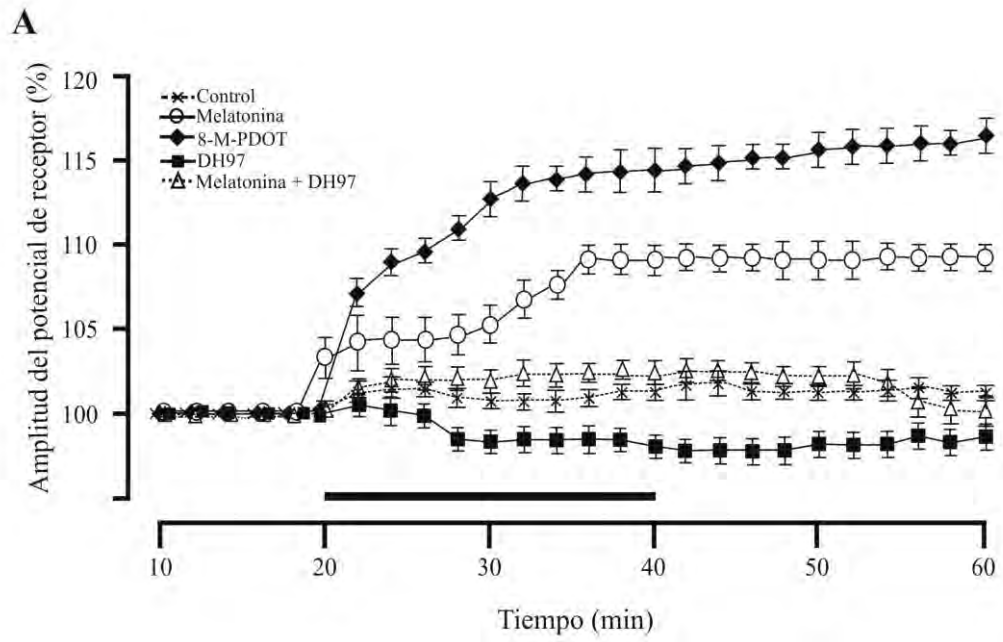


Figura 19. El DH97 disminuye el efecto producido por la melatonina en la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares. Los tallos oculares del acocil fueron aislados en el tiempo circadiano 6 (Fig. 18A) y 18 (Fig. 18B). La respuesta eléctrica a la luz (potencial de receptor, PR) de las células retinulares fue obtenida cada dos minutos en presencia del compuesto experimental. La barra indica el tiempo de perfusión del compuesto probado: vehículo (x; VH+DMSO 0.01%), 8-M-PDOT (♦; 10 nM), DH97 (■; 1 nM), melatonina (○; 100 nM), y melatonina en combinación con DH97 (△; 1 nM). El cien por ciento representa la amplitud del PR basal antes de la aplicación del compuesto experimental. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM de cinco experimentos independientes.

#### **D) Determinación de la unión de [ $I^{125}$ ] melatonina en el tallo ocular del acocil**

Para determinar la presencia de los receptores a melatonina y su posible variación en la unión y afinidad en el tallo ocular del acocil, se realizaron ensayos de la unión de [ $I^{125}$ ] melatonina, un agonista específico de los receptores a melatonina, a las membranas del tallo ocular en dos horas extremas del ciclo circadiano.

La unión de [ $I^{125}$ ] melatonina 0.2 nM a las membranas del tallo ocular fue lineal, entre 20 y 120  $\mu$ g de proteína. En la figura 20 se muestra la curva de saturación de [ $I^{125}$ ] melatonina y la gráfica de Scatchard. La unión de [ $I^{125}$ ] melatonina a las membranas del tallo ocular del acocil durante los TC's 6 y 18 fue dependiente de la concentración (0.1 nM a 1.7 nM). La unión no específica definida con 1 mM de melatonina fue del 80% del total de la unión de [ $I^{125}$ ] melatonina. La saturación de los sitios de unión de [ $I^{125}$ ] melatonina en este tejido se alcanzó en la concentración 1.7 nM en ambos tiempos. Los datos se transformaron con el

## Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

método de Scatchard. Este análisis reveló una constante de disociación ( $K_d$ ) de 1.1 nM y un número total de sitios de unión ( $B_{max}$ ) de 6 fmol / mg proteína en el TC 6 y una  $K_d$  de 1.46 nM y una  $B_{max}$  de 7 fmol / mg proteína en el TC 18. Estos resultados muestran que no hay variación en la afinidad ( $K_d$ ) y sugieren una variación circadiana, aunque no significativa, de la unión específica ( $B_{max}$ ) al agonista [ $^{125}$ ] melatonina en el tallo ocular.

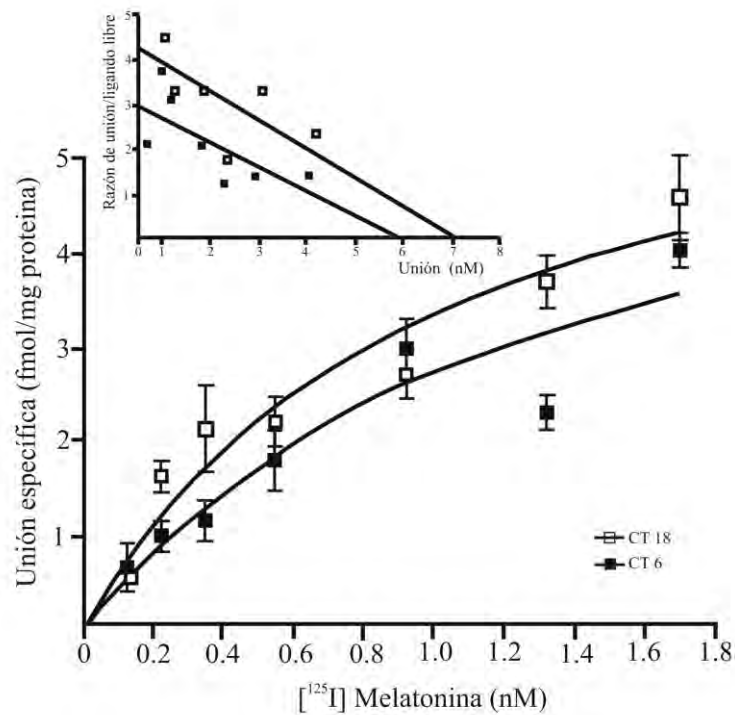


Figura 20. La unión de [ $^{125}$ ] melatonina a las membranas del tallo ocular del acocil fue saturable y de alta afinidad. Los ensayos de unión se realizaron en dos tiempos circadianos, 6 (■) y 18 (□) (actividad específica: 2200 Ci/mmol) La unión no específica fue analizada utilizando 1 mM de melatonina. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM de dos experimentos realizados por triplicado. La gráfica insertada muestra el Scatchard de los datos.



**E) Efecto de la melatonina en las corrientes iónicas de las células retinulares activadas por la luz y en la oscuridad.**

Cuando a la membrana en reposo ( $-37 \pm 3$  mV) de la célula retinular se le aplicó un estímulo luminoso (1800 lux/10  $\mu$ s), se activó una corriente entrante (Figura 21A). Para conocer si la melatonina afecta esta corriente entrante, se realizaron experimentos en los que se perfundi6 100 nM de melatonina sobre las células retinulares. La melatonina aumentó en forma significativa la magnitud de la amplitud de la corriente entrante (2.9 veces), en relación con la solución control (Figura 21B). En otra serie de experimentos, se incrementó al doble la concentración extracelular de calcio a fin de conocer su efecto sobre la amplitud de la corriente entrante activada por la luz. El calcio aumentó significativamente 1.86 veces, la magnitud de la amplitud de la corriente entrante en relación con la solución control (Figura 21B). Estos primeros resultados sugieren que la corriente iónica implicada en la fase de despolarización rápida del PR de las células retinulares está fuertemente influenciada por la melatonina y por el calcio.

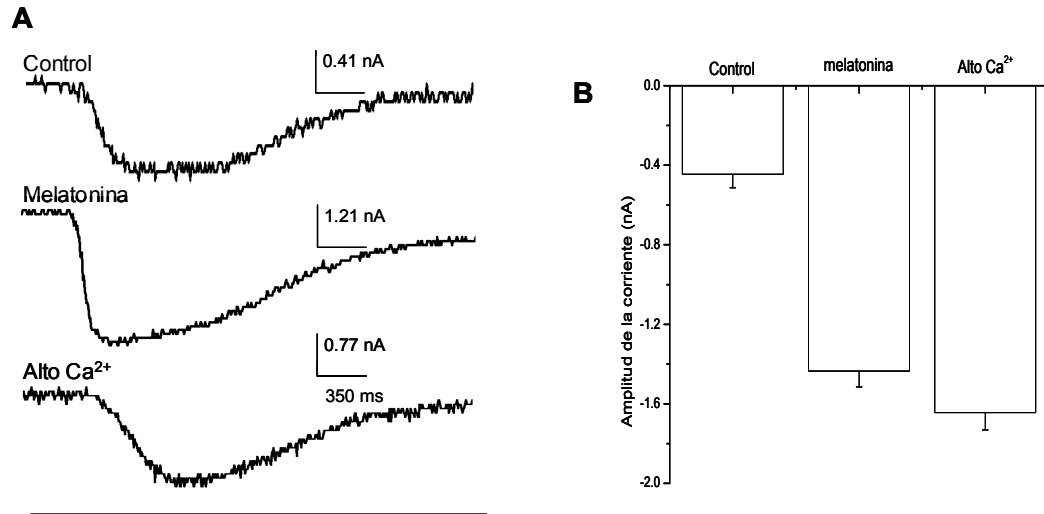


Figura 21. Efecto de la melatonina o el aumento de la concentración de calcio extracelular sobre la amplitud de la corriente entrante de las células retinulares activada por la luz. La melatonina se perfundió durante 20 min antes de iniciar el experimento. A) Trazos representativos de la corriente entrante de las células retinulares activada por la luz en presencia de VH (solución control), 100 mM de melatonina y 26 mM de calcio. La barra en la base de los trazos indica el tiempo del voltaje comandado. B) Comparación del pico de la amplitud de la corriente entrante obtenida en presencia de VH, melatonina y calcio extracelular. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM de 5 experimentos realizados. \*Prueba de ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis)

Cuando las células retinulares son estimuladas con un estímulo luminoso (1800 lux/10  $\mu$ s) se observa una despolarización rápida transitoria en el PR. Para conocer si la melatonina o una concentración alta de calcio extracelular afecta la corriente iónica implicadas en la despolarización rápida transitoria del PR, se realizaron experimentos en los que las células retinulares fueron estimuladas por un pulso de luz y por pulsos de 50 ms desde -65 mV a +35 mV en incrementos de

20 mV a partir del potencial de membrana en reposo de  $-37 \pm 3$  mV. Las células retinulares fueron perfundidas con 100 nM de melatonina o con 26 mM de calcio extracelular.

En la figura 22 se muestra la relación corriente-voltaje (I-V) obtenida en células retinulares perfundidas en solución salina VH (control) o en 100 nM de melatonina o en 26 mM de calcio extracelular. En cualquier caso, la corriente iónica de la membrana se comportó de manera lineal. Esta corriente iónica no depende del voltaje. En los controles, la conductancia ( $G$ ) de la corriente iónica activada por la luz fue de  $39 \pm 1.2$  nS y con un potencial de inversión ( $E_{rev}$ ) de  $-28.5 \pm 0.7$  mV. Al perfundir 100 nM de melatonina, la corriente aumentó 2.9 veces en relación con la solución control; la  $G$  fue de  $57 \pm 4$  nS y el  $E_{rev}$  de  $-20.2 \pm 1.5$  mV. Cuando las células fueron perfundidas con una solución con el doble de calcio extracelular, los resultados fueron similares a los obtenidos con melatonina, la corriente aumento 1.86 veces en relación con la solución control; la  $G$  fue de  $65 \pm 3.2$  nS y el  $E_{rev}$  fue de  $-20 \pm 2$  mV. Estos primeros resultados muestran que la melatonina y/o el calcio aumentan la corriente entrante en la despolarización rápida transitoria del PR.

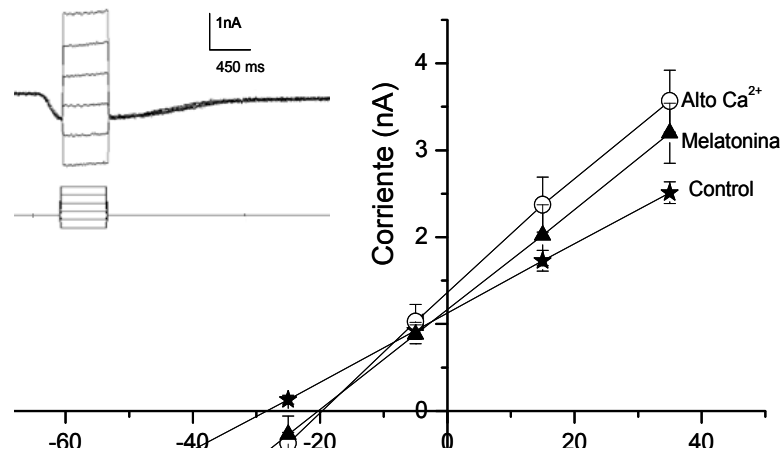


Figura 22. La melatonina y el calcio extracelular incrementan la corriente de la membrana de las células retinulares activada por la luz. Relación corriente-voltaje de la corriente entrante activada por la luz en presencia de VH, 100 nM de melatonina y 26 mM de calcio extracelular. La magnitud del pico de la corriente fue medida a los 80 ms de iniciada la fotorrespuesta. La gráfica insertada muestra los trazos representativos de la corriente entrante activada por la luz en presencia de melatonina. La barra en la base de los trazos indica los pulsos de voltajes comandados. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM de 5 experimentos realizados.

En otra serie de experimentos cuando las células retinulares fueron estimuladas con diferentes pulsos de voltaje desde un potencial de mantenimiento de  $-37 \pm 3$  mV, se activó una corriente saliente. Para conocer si la melatonina o el calcio extracelular afectan esta corriente saliente, las células retinulares fueron estimuladas con pulsos desde  $-120$  mV y hasta  $+100$  mV en incrementos de  $20$  mV a partir del potencial de membrana en reposo ( $-37 \pm 3$  mV). Las células retinulares fueron perfundidas con  $100$  nM de melatonina o con  $26$  mM de calcio extracelular.

En la figura 23 se muestra la relación corriente-voltaje obtenida en células retinulares perfundidas en solución salina VH (control), en  $100$  nM de melatonina o en  $26$  mM de calcio extracelular. En cualquiera de estos casos, la corriente de la membrana no es dependiente del voltaje. En el control se obtuvo una conductancia ( $G$ ) de  $19.1 \pm 0.6$  nS y un potencial de inversión de  $-40.4 \pm 0.3$  mV ( $E_{rev}$ ). Este se calculó ajustando los valores a la ecuación de la recta, el valor obtenido de la ordenada al origen correspondió al  $E_{rev}$ . Cuando se probó  $100$  nM de melatonina, la corriente aumentó  $1.73$  veces, en relación con la solución control; la  $G$  fue de  $33 \pm 0.5$  nS y se obtuvo un  $E_{rev}$  de  $-40.7 \pm 1$  mV. En otra serie de experimentos, cuando se probó el efecto de una concentración alta de calcio extracelular ( $26$  mM), la corriente se redujo  $0.6$  veces. Con relación a la solución control, la  $G$  fue de  $12.4 \pm 0.2$  nS, y el  $E_{rev}$  de  $-47.8 \pm 2.7$  mV. Estos primeros

## Efecto de la melatonina en la retícula del acocil

resultados muestran que la melatonina aumenta la corriente saliente y el calcio extracelular la reduce.

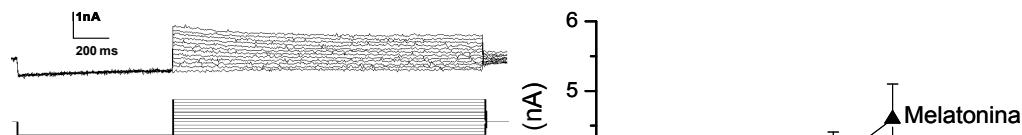


Figura 23. La melatonina incrementa la corriente de la membrana de las células retinulares obtenida en la oscuridad, mientras que el calcio la reduce. Relación corriente-voltaje de la corriente saliente activada en la oscuridad en presencia de VH, 100 nM de melatonina y 26 mM de calcio extracelular. La gráfica insertada muestra los trazos representativos de la corriente saliente activada en la oscuridad en presencia de melatonina. La barra en la base de los trazos indica los pulsos de voltajes comandados. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM de 5 experimentos realizados.

## DISCUSIÓN

La presente tesis muestra que en la retina del acocil *Procambarus clarkii*, la melatonina aumenta la respuesta eléctrica de las células retinulares a la luz, el potencial de receptor (PR), a lo largo del ciclo de 24 horas; la magnitud del efecto es dependiente de la hora. También determinamos que la regulación circadiana de la melatonina sobre la amplitud del PR de las células retinulares es activada por receptores a melatonina del subtipo MT<sub>2</sub>. Además, en los ensayos de unión de <sup>125</sup>I melatonina a las membranas del tallo ocular del acocil establecimos que la unión es específica, saturable y con una afinidad en el rango nanomolar. No se observó una variación en la afinidad ( $K_d$ ) entre los tiempos circadianos (TC) 6 y TC 18. Sin embargo, entre estos mismos tiempo hubo una variación aunque no significativa, de la unión específica ( $B_{max}$ ) de la [<sup>125</sup>I] melatonina en el tallo ocular. Por otra parte, se inició el estudio del efecto de la melatonina sobre las corrientes iónicas de la fotorrespuesta de las células retinulares.

### **La melatonina modula el PR de las células retinulares**

La regulación de la función visual por sustancias neuromoduladoras ha sido ampliamente reportada en una variedad de organismos que incluye los invertebrados ([Vivien-Roels y cols., 1984](#); [Aréchiga y col., 1990](#); [Balzer y cols., 1997](#); [Lampel y cols., 2005](#); [Maciel y cols., 2008](#)). El aumento de la sensibilidad retinal a la luz por la melatonina, como parte de un proceso adaptativo a la oscuridad, fue demostrado a través del electroretinograma (ERG) ([Semm y Vollrath, 1982](#); [Wiechmann y cols., 1988](#); [Balzer y cols., 1997](#); [Reuss y Kieffer, 1998](#); [Solis-Chagoyán y cols., 2008](#)).

En la retina de vertebrados, la melatonina aumenta la respuesta a la luz del ERG. La melatonina activa el segmento externo del disco protector ([White y Fisher, 1989](#)), promueve la elongación del cono (característico de la adaptación a la oscuridad) ([Pierce y Besharse, 1995](#)) y regula la liberación de dopamina en las células fotorreceptoras; la melatonina y la dopamina a través de una asa de retroalimentación intracelular regulan la fisiología retinal ([Iuvone y Gan, 1995](#); [Miranda-Anaya y cols., 2002](#)).

En el tallo ocular del acocil se ha encontrado que el nivel circulante de la melatonina fluctúa durante el ciclo luz-oscuridad: siendo mayor durante la noche que durante el día ([Balzer y cols., 1997](#)), lo que sugiere que la melatonina puede



ser liberada al sistema circadiano en el tallo ocular del acocil y estar involucrada en procesos circadianos. Uno de estos procesos es el de la sensibilidad a la luz de las células fotorreceptoras. La melatonina junto con otras hormonas permite que el fotorreceptor retinal exprese su máxima respuesta a la luz, quizá facilitando el estado de adaptación a la oscuridad; la melatonina aumenta la amplitud de la oscilación del ritmo circadiano del ERG y cambia la fase (adelanto o atrasos) de este ritmo (Balzer y cols., 1997; Solís-Chagoyán y cols., 2008). La melatonina y la hormona dispersora del pigmento participan en la sincronización del ritmo circadiano del ERG indicándole al marcapaso el inicio y el término de la fase de oscuridad (Solís-Chagoyán y cols., 2008; Verde y cols., 2007). Al parecer, la melatonina actúa no sólo como un mensajero también lo hace como la hormona que envía una señal de oscuridad a las células retinulares.

Lo anterior sugiere que la melatonina es una sustancia común que regula la sensibilidad del sistema visual de diferentes maneras y en una amplia variedad de organismos.

Nuestros resultados apoyan la idea de que en el sistema circadiano del acocil la melatonina es una señal química que le indica a las estructuras efectoras el período de actividad del sistema, ya que: 1) aumenta la amplitud del PR de las células retinulares (efectores del sistema circadiano) a lo largo del ciclo circadiano; 2) el aumento en la amplitud del PR tiene un mayor efecto y una rápida recuperación durante el día subjetivo. La concentración de la melatonina

endógena en el tallo ocular del acocil es baja (Balzer y cols., 1997) y al agregar melatonina exógena (100 nM) las células retinulares muestran un aumento del PR de las células retinulares como si estuvieran en un estado de adaptación a la oscuridad. Durante la noche subjetiva, cuando los niveles de la melatonina endógena son altos, hay un menor efecto y ese efecto continúa aun después de haber lavado la melatonina exógena, lo que sugiere que la melatonina endógena sigue actuando sobre el PR de las células retinulares. En consecuencia se puede concluir que la melatonina actúa sobre los efectores, es decir, sobre las células retinulares del ritmo circadiano del ERG aumentando su sensibilidad a la luz. Estas evidencias nos llevan a proponer que el efecto producido por la melatonina sobre el PR de las células retinulares es a través de un receptor membranal a melatonina que promueve un aumento de la sensibilidad a la luz de las células retinulares del acocil como parte de un mecanismo de adaptación a la oscuridad.

## **La modulación del PR por melatonina depende de la activación de receptores tipo MT<sub>2</sub>**

En vertebrados, se han identificado distintas respuestas fisiológicas a melatonina reguladas a través de la activación del receptor a melatonina MT<sub>2</sub> mediante el empleo de agonistas y antagonistas selectivos al receptor MT<sub>2</sub>. Estas respuestas incluyen la regulación de la liberación de dopamina en la retina de conejo (Dubocovich y cols., 1997) y el adelanto de fase del ritmo circadiano en el sistema nervioso central (Gauer y cols., 1993a y b; Dubocovich y cols., 1997; Liu y cols., 1997; Hunt y cols., 2001). El receptor a melatonina MT<sub>2</sub> se expresa principalmente en la retina (Dubocovich y Takahashi, 1987; Reppert y cols., 1996).

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que los receptores membranales del subtipo MT<sub>2</sub> regulan el efecto de la melatonina en la amplitud del PR de las células retinulares del tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*. El aumento del agonista 8-M-PDOT sobre la amplitud del PR de las células retinulares apoya la idea de que un receptor del subtipo MT<sub>2</sub> participa en la regulación de la actividad eléctrica de las células retinulares a la luz. Las diferencias del efecto producido por el agonista 8-M-PDOT y la melatonina en la amplitud del PR coinciden con la mayor potencia del agonista 8-M-PDOT (Dubocovich, 1995; Dubocovich y cols., 1997). Además, el efecto prolongado y sostenido de la melatonina aún después de lavar la melatonina o el 8-M-PDOT, durante las horas del periodo de luz en la amplitud del PR, sugiere que los receptores MT<sub>2</sub> continúan con su efecto. El

aumento en la sensibilidad de las células retinulares a la luz es consistente con el efecto del agonista 8-M-PDOT y con el bloqueo de la acción del receptor membranal a la melatonina endógena por el antagonista DH97. Debido a que se perfundió cuando el nivel de melatonina endógeno en el tallo ocular es alto, se puede inferir que en la retina de los tallos oculares del acocil existen receptores membranales a melatonina del subtipo  $MT_2$  y participan en la regulación circadiana de la sensibilidad a la luz de las células retinulares.

Por otro lado, nuestros experimentos de unión de [ $^{125}$ I] melatonina en las membranas del tallo ocular del acocil muestran una sola clase de receptores con afinidad nanomolar. Este sitio de unión corresponde a los receptores  $MT_2$ , implicados como sitios de unión en las membranas retinales (Wiechmann y cols., 1986; Duncan y cols., 1988). No podemos, sin embargo, excluir la posible presencia del receptor  $MT_1$  en el tallo del acocil ya que la gráfica que muestra los resultados del análisis del Scatchard sugiere la unión de otro sitio con afinidad baja. Estos resultados apuntan hacia la posibilidad de que la unión de melatonina en las membranas de las células retinulares activa los receptores membranales a melatonina y aumenta la sensibilidad del sistema visual que facilitaría el estado de adaptación a la oscuridad.

En el tallo ocular del acocil se observaron cambios en la densidad de receptores a melatonina entre el día y la noche. La afinidad y la densidad del receptor a la melatonina cambia a lo largo del ciclo luz-oscuridad lo que sugiere una variación

en la sensibilidad (Witt-Enderby y cols., 2003). Sin embargo, el mecanismo que controla la sensibilidad o la desensibilización del receptor a la melatonina no es claro. Se ha sugerido que en este mecanismo el fotoperiodo (Witt-Enderby y cols., 2003) y la melatonina misma (Gauer y cols., 1993 a y b; Ligo y cols., 2003) podrían estar implicados. Los datos obtenidos hasta ahora no nos permiten aclarar un posible impacto directo del ciclo luz-oscuridad sobre la densidad de los receptores membranales a melatonina.

En muchas especies estudiadas, la desensibilización de los receptores a la melatonina coincide con los altos niveles de ésta en el plasma durante el periodo de oscuridad. El ritmo de melatonina circulante está fuera de fase con la afinidad de su receptor y la capacidad de la unión (Ligo y cols., 2003; Witt-Enderby y cols., 2003). La melatonina promueve una desensibilización y/o internalización del receptor  $MT_2$  después de la exposición a concentraciones fisiológicas de melatonina (Gerdin y cols., 2004). La desensibilización es común en la familia de los receptores acoplados a la proteína G (Sibley y cols., 1987; Hausdorff y cols., 1990) y el receptor  $MT_2$  es un miembro de esta familia (Reppert, 1997).

En esta tesis se observó una variación aunque no significativa en el número de receptores a melatonina entre el día y la noche en el tallo del acocil. Durante el día subjetivo hay una mayor densidad de los sitios de unión a [ $I^{125}$ ] melatonina en las membranas del tallo ocular, lo que se relaciona de manera inversa con la concentración de melatonina endógena en el tallo ocular del acocil; la

concentración endógena de la melatonina en el acocil es alta durante la noche y disminuye durante el día (Balzer y cols., 1997). Lo anterior confirma que la melatonina actúa mediante receptores membranales, ya que, el aumento en la amplitud del PR por la aplicación exógena de la hormona fue mayor durante el día subjetivo. La variación de la respuesta de las células retinulares a la luz podría estar inducida solamente por la variación de la densidad de los receptores, aunque no podemos excluir una posible desensibilización del receptor por la melatonina misma, ya que reduce la amplitud del PR de las células retinulares durante el tiempo circadiano 24. Así mismo, concentraciones mayores a 10  $\mu\text{M}$  de melatonina se induce una reducción en la amplitud del PR que sugiere una desensibilización del receptor parecido al subtipo  $\text{MT}_2$ . El mecanismo molecular que regula este proceso no se ha determinado. En conclusión, estos hechos sugieren que la acción de los receptores a melatonina del subtipo  $\text{MT}_2$  sobre la sensibilidad de las células retinulares a la luz depende de los cambios asociados con el ciclo luz-oscuridad y/o a la variación circadiana de la síntesis de melatonina en el acocil.

## **Efecto de la melatonina sobre las corrientes iónicas del PR**

Dada la complejidad estructural de los ojos compuestos de los invertebrados no ha sido posible aplicar las evidencias clásicas (sustitución iónica, inyecciones intracelulares iónicas, etc) que permiten determinar con precisión la dependencia iónica de la fotorrespuesta, lo que da por resultado una escasa información sobre los procesos de fototransducción de los invertebrados. En el acocil, se conoce que el calcio y el sodio participan en la fase transitoria rápida del PR (Euguchi, 1965; Shaw y Stowe, 1982; Fuentes-Pardo y cols., 1984; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991; Miller y Glantz, 2000). También, el calcio ha sido relacionado con los procesos de adaptación a la luz y a la oscuridad (Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991 ). Se han establecido tres vías posibles para la entrada de calcio a la célula fotorreceptora: 1) conductancia inducida por la luz (Brown y cols, 1970; Miller y Glantz, 2000), 2) un canal de calcio activado por voltaje (Lisman y cols., 1982) y 3) un intercambiador sodio/calcio (O'Day y Gray-Keller, 1989). En otros sistemas existen evidencias que indican que la melatonina regula conductancias iónicas. En particular, la melatonina se ha caracterizado como un regulador de los iones de calcio (Zisapel y Laudon, 1983; Prada y cols., 2005; Afeche y cols., 2006)

Los resultados obtenidos en este trabajo son preliminares e intentamos asociar a la melatonina con la modulación de las corrientes iónicas del PR de las células retinulares de acocil. La melatonina puede aumentar la amplitud de la corriente

iónica entrante cualitativamente similar a la respuesta al voltaje (potencial de receptor) de las células retinulares a la luz. Esa similitud sugiere que la melatonina modula una corriente entrante que contribuye a la generación del potencial de receptor; es posible que un aumento en la despolarización transitoria rápida del PR producida por la melatonina refleje un aumento en la conductancia de las corrientes iónicas de calcio. El aumento y/o la reducción en la duración del PR producido por la acción de la melatonina y la reducción en la conductancia iónica activada en la oscuridad producida por la alta concentración de calcio extracelular deben ser entonces, el reflejo de cambios en la conductancia de las corrientes iónicas de calcio-potasio implicados en la repolarización del PR. Aunque no se encontraron evidencias de una corriente entrante dependiente del voltaje, no se puede afirmar que esté ausente y que no podría contribuir a la acción de la melatonina en el potencial de receptor.

Los efectos de la melatonina sobre la amplitud de la corriente iónica entrante del PR son similares a los observados cuando los tallos oculares son perfundidos en alto calcio: el calcio incrementa la conductancia de la corriente iónica entrante. Se puede sugerir que la melatonina podría regular la conductancia de calcio a través de un canal sensible a la luz, como el canal TRP en *Drosophila*.

Se sugiere que la melatonina podría modificar los mecanismos de transducción que regulan el metabolismo de calcio, del AMPc y del InsP<sub>3</sub>. Sin embargo, no



Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

estamos en posibilidad de dar una mejor explicación sobre su efecto en el proceso de la fototransducción.

## CONCLUSIONES

Las evidencias presentadas en este trabajo ubican a la melatonina:

- 1.- Como una señal química que le indica al sistema circadiano del tallo ocular del acocil la fase de oscuridad del fotoperiodo.
- 2.- Una sustancia que actúa sobre los efectores del ritmo circadiano de amplitud del electrorretinograma y que aumenta la sensibilidad a la luz de las células retinulares.
- 3.- Los receptores membranales a melatonina subtipo  $MT_2$  están presentes en la membrana de la retina del tallo ocular.
- 4.- Hay diferencias aunque pequeñas en el número de receptores membranales a melatonina en la retina del acocil entre el día y la noche.
- 5.- La acción de la melatonina sobre la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares es regulada por los receptores membranales a melatonina parecidos al subtipo  $MT_2$ .

Efecto de la melatonina en la retínula del acocil

6.- Al parecer, la melatonina regula las corrientes iónicas activadas por la fototransducción y las activadas en la oscuridad, de las células retinulares del acocil; se requieren sin embargo más estudios para apoyar esta idea.

## LITERATURA CITADA

- Afeche, S.C., Barbosa, R., Scialfa, J.H., Terra, I.M., Cassola, A.C., Cipolla-Neto, J. (2006) "Effects of the blockade of high voltage-activated calcium channels on in vitro pineal melatonin synthesis". *Cell Biochem Funct* 24, 499-505.
- Alexander, S.P., Mathie, A., Peters, J.A. (2007) Guide to Receptors and Channels, 2nd edition (2007 Revision). *Br J Pharmacol* 150 (Suppl 1): S1.
- Al-Ghoul, W.M., Herman, M.D., Dubocovich, M.L. (1998) "Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum". *NeuroReport* 9: 4063–4068.
- Alvarado-Alvarez, R., Aréchiga H., García, U (2000) "Serotonin activates a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current in identified peptidergic neurons from the crayfish" *J Exp Biol* 20, 715-723.
- Alvarado-Alvarez, R., Porrás-Villalobos, M.G., Calderon-Rosete G., Rodríguez-Sosa L., Aréchiga H. (2005) "Dopaminergic modulation of neurosecretory cells in the crayfish" *Cell Mol Neurobiol* 25, 345-370.
- Aréchiga, H., Banuelos, E., Frixione, E, Picones, A., Rodríguez-Sosa, L. (1990) "Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine". *J Exp Biol* 150, 123–143.
- Aréchiga, H., Fernández-Quiróz, F., Fernández de Miguel, F., Rodríguez-Sosa L. (1993) The circadian system of crustaceans". *Cronobiol Int.* 10, 1-19.
- Aréchiga H., Rodríguez-Sosa L. (1998) "Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish". *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 1819-1823.
- Aschoff, J.A. (1981) A Survey on Biological Rhythms. En Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4. Biological Rhythms. J. Aschoff (ed). New York. Plenum Press, pp 3-11.
- Ayoub, M.A, Levoye, A., Delagrangé, P., Jockers, R., (2004.) "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers". *Mol Pharmacol* 66, 312–321.
- Balzer, I., Espíndola, I.R., Fuentes-Pardo, B. (1997) "Daily variations of immunoreactive melatonin in the visual system of crayfish". *Biol Cell* 89, 539-543.
- Barrera-Mera, B., Block, G.D. (1990) "Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: Evidence for mutually coupled pacemakers". *Brain Res* 522, 241-245.
- Barrera-Mera, B. (1976) "Effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of the crayfish". *Physiol Behav.* 17(1), 59-64.
- Bernard, M., Guerlotte, J., Greve, P., Grechez-Cassiau, A., Iuvone, M.P., Zatz, M., Chong, N.W., Klein, D.C., Voisin, P. (1999) "Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina". *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 325–334.
- Brown, H.M., Hagiwara, S., Koike, H., Meech, R.M. (1970). "Membrane properties of a barnacle photoreceptor examined by the voltage clamp technique". *Journal of Physiology* (London) 208, 385–413.

- Brown, T.M., Piggins, H.D. (2007) "Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock". *Prog. Neurobiol.* 82, 229–255.
- Brydon, L., Petit, L., de Coppet, P., Barrett, P., Morgan, P.J., Strosberg, A.D. y cols. (1999b) "Polymorphism and signalling of melatonin receptors". *Reprod Nutr Dev* 39, 315–324.
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P. y cols. (1999a) "Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(12), G(13), and G(Q/11) proteins". *Mol Endocrinol* 13, 2025–2038.
- Cahill, G.M., Besharse, J.C. (1993) "Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal photoreceptors". *Neuron* 10, 573–577.
- Cajochen, C., Krauchi, K., Wirz-Justice A. (2003) "Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep". *J. Neuroendocrinol.* 15, 432-437.
- Calderón-Rosete G., Flores G., Rodríguez-Sosa L. (2006) "Diurnal rhythm in the levels of the serotonin 5-HT1A receptors in the crayfish eyestalk". *Synapse* 59(6), 368-373.
- Cardinali, D.P., Rosner, J.M. (1971a) "Metabolism of serotonin by the rat retina *in vitro*". *J. Neurochem.* 18, 1769–1770.
- Cardinali, D.P., Rosner, J.M. (1971b) "Retinal localization of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat". *Endocrinology* 89, 301–303.
- Cardinali, D.P., Vacas, M.I., Boyer, E.E. (1979) "Specific binding of melatonin in bovine brain". *Endocrinology* 105, 437-441.
- Chan, A.S., Lai, F.P., Lo, R.K., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Stanbridge, E.J., Wong, Y.H. (2002) "Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins". *Cell Signal* 14, 249–257.
- Chung, J. S., Wilkinson, M. C., Webster, S. G. (1996) "Determination of the amino acid sequence of the moult-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus*". *Neuropeptides* 30, 95–101.
- Conway, S., Drew, J.E., Mowat, E.S., Barrett, P., Delagrange, P., Morgan, P.J. (2000) "Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor". *J Biol Chem* 275, 20602-20609.
- Conway, S., Mowat, E.S., Drew, J.E., Barrett, P., Delagrange, P., Morgan, P.J. (2001). "Serine residues 110 and 114 are required for agonist binding but not antagonist binding to the melatonin MT1 receptor". *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1229-1236.
- De Kleijn, D.P.V., Sleutels, F.J.G.T., Martens, G.J.M., Van Herp, F. (1994) "Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*". *FEBS Lett.* 353, 255–258.
- Drew, J.E., Barrett, P., Williams, L.M., Conway, S., Morgan, P.J. (1998) "The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies". *J Neuroendocrinol* 10, 651–661.

- Dubocovich, M.L. (1983) "Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina". *Nature* 306, 782-784.
- Dubocovich, M.L. (1988) "Pharmacology and function of melatonin receptors". *FASEB J* 2, 2765-2773.
- Dubocovich, M.L. (1995) "Melatonin receptors: are there multiple subtypes?" *Trends Pharmacol Sci* 16, 50-56.
- Dubocovich, M.L., Cardinali, D.P., Delagrange, P., Krause, D.N., Strosberg, D., Sugden, D. y cols. (2001) "Melatonin Receptors. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification". IUPHAR Media: London 270-277.
- Dubocovich, M.L., Masana, M.I., Iacob, S., Sauri, D.M. (1997) "Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355, 365-375.
- Dubocovich, M.L., Takahashi, J.S. (1987) "Use of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina". *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 3916-3920.
- Duncan, M.J., Takahashi, J.S., Dubocovich, M.I. (1988) "2-[<sup>125</sup>I] iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes-pharmacological characteristics and regional distribution". *Endocrinology* 122, 1825-33.
- D'Souza, T.T., Dryer, S.E. (1996) "A cationic channel regulated by a vertebrate intrinsic circadian oscillator". *Nature* 382, 165-167.
- Eguchi, E. (1965) "Rhabdome structure and receptor potentials in single crayfish reticular cells". *Cell Comp Physiol* 66, 411-413.
- Ferlund, P. (1976) "Structure of a light-adapting hormone from the shrimp *Pandalus borealis*". *Biochim. Biophys. Acta* 439, 17-25.
- Ferlund, P., Josefsson, L. (1972) "Crustacean color-change hormone: Amino acid sequence and chemical synthesis". *Science* 177, 173-175.
- Fuentes-Pardo, B., Hernández Falcón, J. (1993) "Neurobiology of the circadian clock of crayfish". *Trends in Comp Biochem Physiol.* 1, 635-673.
- Fuentes-Pardo, B., Hernández-Falcón, J., Noguerón, I. (1984) "Effect of external level of calcium upon the photoreceptor potential along the twenty-four hour cycle". *Comp Biochem Physiol A* 8, 723-727
- Fuentes-Pardo B., Inclán-Rubio V. (1987) "Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish. I. Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms". *Comp. Biochem. Physiol. A* 86, 523-527.
- Fuentes-Pardo, B., Ramos-Carvajal, J. (1983) "The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish". *Comp. Biochem Physiol A* 74, 711-714.
- García U. Y Arechiga H. (1998) "Regulation of Crustacean Neurosecretory Cell Activity". *Cell Mol Neurobio* 18, 81-99.
- Garger A.V., Richard E.A., Lisman J.E. (2004). "The excitation cascade of *Limulus* ventral photoreceptors: guanylate cyclase as the link between InsP<sub>3</sub>-

- mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release and the opening of cGMP-gated channels". *BMC Neurosci.* 26, 5:7.
- Gauss, G., Kleinholz, L. H., Kegel, G., Keller, R. (1990) „Isolation and characterization of red pigment-concentrating hormone (RPCH) from six crustacean species". *J. Comp. Physiol. B* 160, 373–379.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M., Pévet, P. (1993a) "Melatonin receptors density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself". *Brain Res* 602, 153-156.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M., Skene, D.J., Vivien-Roels, B., Pévet, P. (1993b) "Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself". *Neuroendocrinology* 57, 20–126.
- Geary, G.G., Duckles, S.P., Krause, D.N. (1998) "Effect of melatonin in the rat tail artery: role of  $\text{K}^+$  channels and endothelial factors". *Br. J. Pharmacol.* 123, 1533–1540.
- Geary, G.G., Krause, D.N., Duckles, S.P. (1997) "Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels". *Am. J. Physiol.* 273, H1530–H1536.
- Gerdin, M.J., Masana, M.I., Rivera-Bermúdez, M.A., Hudson, R.L., Earnest, D.J., Gillette, M.U., Dubocovich, M.L. (2004) "Melatonin desensitizes endogenous  $\text{MT}_2$  melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin". *FASEB J* 18, 1646-1656.
- Gubitz A. K., Reppert S. M. (2000) "Chimeric and pointmutated receptors reveal that a single glycine residue in transmembrane domain 6 is critical for high affinity melatonin binding". *Endocrinology* 141, 1236-1244.
- Guerrero HY, Gauer F, Schuster C, Pevet P, MassonPevet M. (2000) "Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat pars tuberalis". *Neuroendocrinology* 71, 163–169.
- Hafner G.S., Tokarski T.R. (1998) "Morphogenesis and pattern formation in the retina of the crayfish *Procambarus clarkii*". *Cell Tissue Res.* 293:535-550.
- Hardie R. (2003) "Regulation of TRP channels via lipid second messengers". *Annu Rev Physiol.* 65, 735-59.
- Hausdorff, W.P., Caron, M.C., Lefkowitz, R.J. (1990) "Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function". *FASEB J.* 4, 2881-2889.
- Hernández-Falcón, J., Fuentes-Pardo, B. (1991) "Crayfish retinular cells: influence of extracellular sodium and calcium upon receptor potential". *Comp Biochem Physiol A* 100, 823-832.
- Hernández O. H., Fuentes-Pardo B. (2001) "Cerebroid ganglion is the presumptive pacemaker of the circadian rhythm of electrical response to light in the crayfish". *Biol. Rhythm Res.* 32, 125-144.
- Heward CB, Hadley ME. (1975) "Structure-activity relationships of melatonin and related indoleamines". *LifeSci* 17, 1167-1177.

- Huang, H., Lee, S.C., Yang, X.L., (2005) "Modulation by melatonin of glutamatergic synaptic transmission in the carp retina". *J. Physiol.* 569, 857–871.
- Hunt AE, Al-Ghoul WM, Gillette MU, Dubocovich ML. (2001) "Activation of MT<sub>2</sub> melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock". *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C110–118.
- Iuvone, P.M., Gan, J. (1995) "Functional interaction of melatonin receptors and D1 dopamine receptors in cultured chick retinal neurons". *J Neurosci* 15, 2179-2185.
- Isorna, E., Guijarro, A., Delgado, M., Alonso-Bedate, M., Alonso-Gómez, A. (2004) "Characterization of melatonin binding sites in the brain and retina of the frog *Rana perezi*". *Gen Comp Endocrinol* 135, 259-267.
- Jarzynka MJ, Passey DK, Ignatius PF, Melan MA, Radio NM, Jockers R y cols. (2006) "Modulation of melatonin receptors and G-protein function by microtubules". *J Pineal Res* 41, 324–336.
- Jiang, Z.G., Nelson, C.S., Allen, C.N. (1995) "Melatonin activates an outward current and inhibits I<sub>h</sub> in rat suprachiasmatic nucleus neurons". *Brain Res.* 687, 125– 132.
- Kleinholz, L. H., Kimball, F., McArvey, M. (1967) "Initial characterization and separation of hyperglycemic (diabetogenic) hormone from the crustacean eyestalk". *Gen. Comp. Endocr.* 8, 75–81.
- Krause DN, Barrios VE, Duckles, S.P. (1995) "Melatonin receptors mediate potentiation of contractile response to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery". *Eur J Pharmacol* 276, 207-213.
- Lampel, J., Briscoe, A.D., Wasserthal, L.T. (2005) "Expression of UV-, blue-, long-wavelength-sensitive opsins and melatonin in extraretinal photoreceptors of the optic lobes of hawk moths". *Cell Tissue Res* 321, 443-58.
- Larimer J.L., Smith J.T. (1981) "Circadian rhythm of retinal sensitivity in crayfish: modulation by the cerebral and optic ganglia". *J Comp Physiol* 136, 313-326.
- Ligo, M., Furukawa, K., Tabata, M., Aida, K. (2003) "Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain". *Neurosci Lett* 347, 49–52.
- Liu, J. H. K., Dacus A. C. (1991) "Endogenous hormonal changes and circadian elevation of intraocular pressure". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 496–500.
- Liu, C., Fukuhara, C., Wessel III, J.H., Iuvone, P.M., Tosini, G. (2004) "Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection". *Cell Tissue Res.* 315, 197–201.
- Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., Reppert, S.M. (1997) "Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock". *Neuron* 19, 91-102.
- Lisman J.E., Brown J. E. (1972) "The effects of intracellular iontophoretic injection of calcium and sodium ions on the light response of *Limulus* ventral photoreceptors". *J Gen Physiol* 59, 701-719.



- Lisman J.E., Fain G. L., O'Day P.M. (1982) "Voltage-dependent conductances in *Limulus* ventral photoreceptors". *J Gen Physiol* 79, 187-209.
- Löhr, J., Klein, J., Webster, S.G., Dircksen, H. (1993) "Quantification, immunoaffinity purification and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone of the shore crab *Carcinus maenas* (L)". *Comp. Biochem. Physiol B*. 104, 699–706.
- Maciel, F.E., Geihs, M.A., Vargas, M.A., Cruz, B.P., Ramos, B.P., Vakkuri, O., Meyer-Rochow, V.B., Maia Nery, L.E., Allodi, S. (2008) "Daily variation of melatonin content in the optic lobes of the crab *Neohelice granulata*". *Comp Biochem Physiol A* 149, 162-6.
- Mackenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA. (2002) "Dual coupling of MT1 and MT2 melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure". *Biochem Pharmacol* 63, 587–595.
- Masson-Pevet M, Gauer F., Schuster C, Guerrero HY. (2000) "Photic regulation of mt (1) melatonin receptors and 2-iodomelatonin binding in the rat and Siberian hamster". *Biol Signals Recept* 9 (3-4), 188-96.
- Masson-Pevet M, Bianchi L, Pevet P. (1996) "Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein". *J Neurosci Res* 43, 632–637.
- Mazzucchelli C, Pannacci M, Nonno R, Lucini V, Fraschini F, Stankov BM. (1996) "The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies". *Mol Brain Res* 39: 117–126.
- McNulty S, Ross AW, Barrett P, Hastings MH, Morgan PJ. (1994) "Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis". *J Neuroendocrinol* 6, 523–532.
- Michel, S., Geusz, M. E. Zaritsky J. J., Block G. D. (1993) "Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons". *Science* 259, 239–241.
- Miller, C.S., Glantz, R.M. (2000) "Visual adaptation modulates a potassium conductance in reticular cells of the crayfish". *Visual Neurosci* 17, 353-368.
- Miranda-Anaya, M., Paul, A., Bartell, Menaker, M. (2002) "Circadian rhythm of iguana electroretinogram: the role of dopamine and melatonin". *J Biol Rhythms* 17, 526-538.
- Moreno-Sáenz E., Fuentes-Pardo B., Hernández-Falcón J. (1992) "Photoentrainment of the circadian rhythm in the electroretinogram of the crayfish and its dependence of the sinus gland". *J. Exp. Zool.* 264: 144-162.
- Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. (1994) "Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance". *Neurochem Int.* 24, 101–146.
- Mseeh F., Gerdin M. J., Dubocovich M. I. (2002) "Identification of cysteines involved in ligand binding to the human melatonin MT2 receptor". *Eur J Pharmacol* 449, 29- 38.

- Natesan, A.K., Cassone, V.M. (2002) "Melatonin receptor mRNA localization and rhythmicity in the retina of the domestic chick, *Gallus domesticus*". *Visual Neurosci* 19, 265-74.
- Naka, K.I., Kuwabara, M. (1959). "Two components from the compound eye of the crayfish". *J. Exp. Biol.* 36, 51–61.
- Jarzynka MJ, Passey DK, Ignatius PF, Melan MA, Radio NM, Jockers R, Rasenick MM, Brydon L, Witt-Enderby PA. (2006) "Modulation of melatonin receptors and G-protein function by microtubules". *J Pineal Res.* 41(4), 324-36.
- Nelson, C.S., Ikeda, M., Gompf, H.S., Robinson, M.L., Fuchs, N.K., Yoshioka, T., Neve, K.A., Allen, C.N. (2001) "Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagine-124". *Mol. Endocrinol.* 15, 1306–1317.
- Nelson, C.S., Marino, J.L., Allen, C.N. (1996) "Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels". *Neuroreport* 7, 717–720.
- O'Day P.M., Gray-Keller, M.P. (1989) "Evidence for Electrogenic Na/Ca<sup>2+</sup> Exchange in Limulus Ventral Photoreceptors" *J. Gen. Physiol.* 93: 473-492.
- Page, T.L., Larimer J. (1974) "Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish II. The ERG amplitude rhythm". *J Comp Physiol* 97, 81-96.
- Pierce, M.E., Besharse, J.C. (1985) "Circadian regulation of retinomotor movements I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length". *J Gen Physiol* 86, 671–689.
- Pittendrigh C.S. (1981). Circadian Systems: Entrainment. En Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4. Biological Rhythms. J. Aschoff (ed). New York. Plenum Press, pp 95-125.
- Petit L, Lacroix I, deCoppet P, Strosberg AD, Jockers R. (1999) "Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 30-50-monophosphate pathway". *Biochem Pharmacol* 58, 633–639.
- Prada, C., Udin, S.B., Wiechmann, A.F., Zhdanova, I.V. (2005) "Stimulation of melatonin receptors decreases calcium levels in *Xenopus* tectal cells by activating GABA receptors". *J Neurophysiol* 94, 968–978.
- Rao, K.M., Riehm, J. P. (1989) "The pigment dispersing hormone family: chemistry, structure–activity relations and distribution". *Biol. Bull.* 177, 225–229.
- Reppert, S.M. (1997) "Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G Protein-coupled receptors". *J Biol Rhythms* 12, 528-531.
- Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slangenaupt, J.F., Gusella, J.F. (1995a) "Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel<sub>1b</sub> melatonin receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8734-8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski LF Jr., 1995b Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15, 1003–1015.

- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T., 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177–1185.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Godson, C. (1996) “Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes”. *Trends Pharmacol Sci* 17, 100– 102.
- Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG. (1988) “Putative melatonin receptors in a human biological clocks”. *Science* 242, 78-81.
- Reuss, S., Kieffer, W. (1998) “Melatonin administered systematically alter the properties of visual cortex cells in cat: further evidence for a role in visual information processing”. *Vision Res* 29, 1089-1093.
- Rich A., Farrugia ., Rae JL. (1999) “Effects of melatonin on ionic currents in cultured ocular tissues”. *Am J Physiol Cell Physiol* 276, 923-929.
- Ruan, G.-X., Zhang, D.-Q., Zhou, T., Yamazaki, S., McMahon, D. G. (2006) “Circadian organization of the mammalian retina”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 9703–9708
- Rivera-Bermudez MA, Gerdin M.J., Earnest DJ, Dubocovich ML. (2003) “Regulation of basal rhythmicity in protein kinase C activity by melatonin in immortalized rat suprachiasmatic nucleus cells”. *Neurosci Lett*. 346, 37-40.
- Sánchez J, Fuentes-Pardo B. (1977) “Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish”. *Comp Biochem Physiol A* 56, 601-609.
- Savaskan E, Wirz-Justice A, Olivieri G, Pache M, Krauchi K, Brydon L y cols. (2002) “Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina”. *J Histochem Cytochem* 50, 519–526.
- Semm, P., Vollrath, L. (1982) “Alterations in the spontaneous activity of cell in the guinea pig pineal gland and visual system produced by pineal indoles”. *J Neural Trans* 53, 265-275.
- Shaw S.R., Stowe S. (1982) *Photoreception*. En: *The Biology of Crustacea*, vol 3, pp. 291-367. Academic Press.
- Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) “Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation”. *Cell* 48, 913-922.
- Simonneaux V, Ribelayga C. (2003). “Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters”. *Pharmacol Rev* 55, 325–395.
- Smith, T.G, Stell W., Brown J.E., Freeman J.A., Murray G.C. (1968) Arole for the sodium pump in photoreception in *Limulus*. *Science* 162, 456-458.
- Solís-Chagoyán, H., Mendoza-Vargas, L., Fuentes-Pardo, B. (2008) “Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish”. *Comp Biochem Physiol A* 149, 373-379.
- Soyez, D., Le Caer, J. P., Noël, P. Y., Rossier, J. (1991) “Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*”. *Neuropeptides* 20, 25–32.

- Terakita, A., Takahama, H., Hariyama, T., Suzuki, T., Tsukahara, Y. (1998) "Light-regulated localization of the beta-subunit of Gq-type G-protein in the crayfish photoreceptors". *J Comp Physiol A* 183, 411-417.
- Ting K.N., Blaylock, N.A., Sugden, D., Delagrange P., Scalbert E., Wilson, V.G. (1999) "Molecular and pharmacological evidence for MT1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats" *British J. Pharmacol* 127, 987-995.
- Tosini, G. (2000) "Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals". *Chronobiol Int.* 17, 599-612.
- Tosini, G., Davidson AJ., Fukuhara C., Kasamatsu M., Castanon-Cervantes O. (2007) "Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors". *FASEB J.* 21, 3866-3871.
- Tosini, G., Fukuhara, C. (2003) "Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals". *J Neuroendocrinol* 15, 364-369.
- Tosini, G., Menaker, M. (1998) "The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration". *Brain Res.* 789, 221-228.
- Uz, T., Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y y cols. (2005) "The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system". *Mol Brain Res* 136, 45-53.
- Vakkuri, O., Lamsa, E., Rahkamaa, E., Ruotsalainen, H., Leppaluoto, J. (1984) "Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy". *Anal. Biochem.* 142, 284-289.
- Vanecek, J. (1998) "Cellular mechanisms of melatonin action". *Physiol Rev* 78, 687-721.
- Verde, M.A., Barriga-Montoya, C., Fuentes-Pardo, B. (2007) "Pigment dispersing hormone generates a circadian response to light in the crayfish, *Procambarus clarkii*". *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 983-992.
- Vivien-Roels, B., Pevet, P., Beck, O., Fevre-Montange, M., 1984. Identification of melatonin in the compound eyes of an insect, the locust (*Locusta migratoria*), by radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry". *Neurosci Letter* 49, 153-7.
- Weaver DR, Liu C, Reppert SM. (1996) "Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters". *Mol Endocrinol* 10, 1478-1487.
- White, M.P., Fisher, L.J. (1989) "Effects of exogenous melatonin on circadian disc shedding in the albino rat retina". *Vision Res* 29, 167-179.
- White BH, Sekura RD, Rollag, MD. (1987) "Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores". *J Comp Physiol B* 157, 153-159.
- Wiechmann, A.F., Bok, D., Horwitz, J. (1986) "Melatonin-binding in the frog retina: autoradiographic and biochemical analysis". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 153-163.

- Wiechmann, A.F., Yang, X.L., Wu, S.M., Hollyfield, J.G. (1988) "Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina". *Brain Res* 453, 377-380.
- Witkovsky, P., Veseinberger, E., LeSauter, J., Yan, L., Johnson, M., Zhang, D. Q., McMahon, D. G., Silver R. (2003) "Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene *Period 1* in the mouse retina". *J. Neurosci.* 23, 7670–7676
- Witt-Enderby, P.A. Bennett, J., Jarzynka, M.L., Firestine, S., Melan, M.A. (2003) "Melatonin receptor and their regulation: biochemical and structural mechanisms". *Life Sci* 72, 218-219.
- Witt-Enderby PA, MacKenzie RS, McKeon RM, Carroll EA, Bordt SL, Melan MA., (2000) "Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor". *Cell Motil Cytoskeleton* 46, 28–42.
- Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. (1998) "Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 30,50- monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor". *Endocrinology* 139, 3064–3071.
- Ying SW, Rusak B, Mocaer E. (1998) "Chronic exposure to melatonin receptor agonist does not alter their effects on suprachiasmatic nucleus neurons". *European Journal of Pharmacology* 342 (1), 29-37.
- Zisapel, N., Laudon, M. (1983) "Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry". *Brain Res.* 272, 378–381.

## APÉNDICE A.

### Artículos originados de este trabajo de investigación

1.- Mendoza-Vargas L., Solís-Chagoyán H., Benítez-King G., Fuentes-Pardo B., 2009. "MT2-like melatonin receptor modulates amplitude receptor potential in visual cells of crayfish during a 24-hour cycle". *Comp. Biochem. Physiol. A*. 154 486–492.

2.- Solís-Chagoyán, H., Mendoza-Vargas, L., Fuentes-Pardo, B., 2008. "Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish". *Comp. Biochem. Physiol. A* 149, 373–379.



# MT<sub>2</sub>-like melatonin receptor modulates amplitude receptor potential in visual cells of crayfish during a 24-hour cycle

Leonor Mendoza-Vargas<sup>a</sup>, Héctor Solís-Chagoyán<sup>b</sup>, Gloria Benítez-King<sup>b</sup>, Beatriz Fuentes-Pardo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Neurofarmacología, Instituto Nacional de Psiquiatría, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 22 May 2009

Received in revised form 29 July 2009

Accepted 30 July 2009

Available online 8 August 2009

### Keywords:

MT<sub>2</sub> melatonin-receptor circadian rhythm

Receptor potential

Photoreceptors

Crayfish

## ABSTRACT

Retinular photoreceptors are structures involved in the expression and synchronization of the circadian rhythm of sensitivity to light in crayfish. To determine whether melatonin possesses a differential effect upon the receptor potential (RP) amplitude of retinular photoreceptors circadian time (CT)-dependent, we conducted experiments by means of applying melatonin every 2 h during a 24-hour cycle. Melatonin with 100 nM increased RP amplitude during subjective day to a greater degree than during subjective night. To determine whether MT<sub>2</sub> melatonin receptors regulate the melatonin-produced effect, we carried out two experiments, circadian times (CTs) 6 and 18, which included the following: (1) application of the MT<sub>2</sub> receptor selective agonist 8-M-PDOT and antagonist DH97, and (2) the specific binding of [<sup>125</sup>I]-melatonin in eyestalk membranes. The amount of 10 nM of 8-M-PDOT increased RP amplitude in a similar manner to melatonin, and 1 nM DH97 abolished the increase produced by melatonin and 8-M-PDOT. Binding of [<sup>125</sup>I]-melatonin was saturable and specific. Scatchard analysis revealed an affinity constant ( $K_d$ ) of 1.1 nM and a total number of binding sites ( $B_{max}$ ) of 6 fmol/mg protein at CT 6, and a  $K_d$  of 1.46 nM and  $B_{max}$  of 7 fmol/mg protein at CT 18. Our results indicate that melatonin increased RP amplitude of crayfish retinular photoreceptors through MT<sub>2</sub>-like melatonin receptors. These data support the idea that melatonin is a signal of darkness for the circadian system in crayfish retinular cells.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is a phylogenetically conserved molecule present from unicellular organisms to mammals, including invertebrate organisms such as crustacean decapoda (Gem and Ralph, 1979; Vivien-Roels et al., 1984; Hardeland and Poeggeler, 2003; Lampel et al., 2005; Fuentes-Pardo et al., 2007; Maciel et al., 2008). In vertebrates, the retina is an extrapineal site of melatonin synthesis (Gem and Ralph, 1979) and comprises a tissue target for melatonin actions in retinal physiology (Cahill et al., 1991; Tosini, 2000; Tosini and Fukuhara, 2003). In crayfish *Procambarus clarkii*, melatonin levels in eyestalk are elevated during scotophase (Balzer et al., 1997), and exogenous melatonin acts as a non-photoc synchronizer in the circadian rhythm of sensitivity to light, marking the beginning of the subjective night (Solís-Chagoyán et al., 2008).

In vertebrates, melatonin modulates retinal neuronal electric responses, as well as the majority of physiological responses through high-affinity plasma membrane receptor stimulation (Reppert, 1997; Von Gall et al., 2002; Witt-Enderby et al., 2003). In addition,

melatonin activates transduction signals that bind to nuclear receptors (Carlberg, 2000; Smirnov, 2001) and calcium-dependent cellular proteins such as calmodulin, protein kinase C (PKC), and calreticulin (Benítez-King and Antón-Tay, 1993; Benítez-King et al., 1993; Macías et al., 2003; Soto-Vega et al., 2004).

[<sup>125</sup>I]-melatonin binding sites in vertebrates have been classified as MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors with pico and nanomolar affinity, respectively (Dubocovich, 1988; Reppert, 1997; Von Gall et al., 2002; Witt-Enderby et al., 2003). Both receptors have been found in mammals, birds, fish, and amphibia. They have been localized in retina and in many other tissues (Reppert et al., 1995; Natesan and Cassone, 2002; Isorna et al., 2004; Dubocovich and Markowska, 2005; Huang et al., 2005). Sensitivity fluctuations in melatonin receptors occur within a 24-hour cycle. This can be related with changes in melatonin-receptor affinity, density, or the photoperiodic regime (Vanecek, 1998; Witt-Enderby et al., 2003). The presence of melatonin membrane receptors in invertebrates has not yet been well documented.

Retinular photoreceptors are structures involved in the expression and synchronization of the circadian rhythm of sensitivity to light in crayfish. The electrical response of retinular photoreceptors to light (receptor potential, RP), can be regulated by light-adapting conditions, light-stimulus intensity and duration, and the availability of interaction with intra and extracellular ions, particularly Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and K<sup>+</sup>. Ca<sup>2+</sup> is considered the most important cation involved in

\* Corresponding author. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad Universitaria, 04510, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 5623 2362; fax: +52 55 5623 2241.

E-mail address: [bfardo@servidor.unam.mx](mailto:bfardo@servidor.unam.mx) (B. Fuentes-Pardo).

light-stimulated membrane photoreceptor depolarization. In addition,  $\text{Ca}^{2+}$  promotes an  $\text{Na}^{+}$  influx through  $\text{Na}^{+}$  channel opening and increasing depolarization (Garger et al., 2006).

Based on the observation that melatonin has been characterized as a  $\text{Ca}^{2+}$  modulator (Zisapel and Laudon, 1983; Prada et al., 2005; Afeche, et al., 2006), and that this cation is the most important in the depolarization of crayfish membrane photoreceptors, we hypothesized that melatonin could modulate the electrical response of reticular photoreceptors to light stimulus through membrane receptors.

The results presented here show that melatonin increased RP amplitude according to application time: the greater effect by melatonin took place during the subjective day, mimicking the nocturnal state of visual photoreceptors. The specific  $\text{MT}_2$  receptor agonist, 8-M-PDOT, caused similar responses to those obtained with melatonin. Thus the specific  $\text{MT}_2$  selective antagonist DH97 abolished increased RP amplitude produced by melatonin and 8-M-PDOT. Furthermore, [ $^{125}\text{I}$ ]-melatonin binding to crayfish eyestalk membrane was saturable and specific. In conclusion, melatonin-produced increase in RP amplitude of crayfish reticular photoreceptors is modulated by  $\text{MT}_2$ -like melatonin receptors. These data support the idea that melatonin in circadian system is a signal of darkness in crayfish reticular cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult crayfish *P. clarkii* (Girard) caught in Chihuahua State, Mexico were acclimatized to laboratory conditions for 1 month. Crayfish were maintained in an aerated aquarium under 12:12 light–dark (LD) cycles (lights turned on at 7:00 h) at 16 °C. Food (Purina) was available twice a week. Circadian time (CT) was determined by recording the electrical response to light of the retinal photoreceptors (electroretinogram, ERG) from a group of crayfish under LD 12:12 cycle. Then, CT was extrapolated from light–darkness cycles LD 12:12. According to ERG amplitude circadian rhythm, CT 0 is the point of the cycle at which the activity level exceeds cycle amplitude by 50%, and CT 24 occurs one complete cycle later. Crayfish retinal sensitivity was increased during nocturnal subjective time from CT 0 to CT 12 (activity time of crayfish) (Fuentes-Pardo and Ramos-Carvajal, 1983). Animal care was conducted in accordance with the rules established by the Faculty of Medicine's Ethical Committee of Faculty of Medicine, University National Autonomous of Mexico.

### 2.2. Receptor potential of reticular photoreceptor recordings

The technique for recording the electrical response of the reticular photoreceptor to light test stimulus, receptor potential (RP), has been described elsewhere (Hernández-Falcón and Fuentes-Pardo, 1991). In brief, an eyestalk was immersed vertically in a continuous perfusing chamber under constant darkness in a Faraday cage at 16 °C. Modified physiological van Harrevel (VH) solution (Miller and Glantz, 2000) was used to perfuse the eyestalk preparation. A borosilicate glass microelectrode filled with 2.7 M of KCl solution (resistance of 30–50 M $\Omega$ ) was placed through the hole of chitin retina. The two criteria for confirming that the microelectrode had penetrated the membrane of reticular photoreceptor were: (1) a decrease of membrane potential from 0 mV to around –35 mV, corresponding to resting membrane potential, and (2) a depolarizing RP that appeared when the eyestalk was illuminated with a light of 1800 lx for 10  $\mu\text{s}$  delivered by a photostimulator (Grass model PS33, USA). Electrical responses of reticular photoreceptors were led to a microelectrode amplifier (Axoclamp 2A; Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA), visualized in an oscilloscope (Tektroniks, TDS 460; Beaverton, OR, USA), and stored on a floppy disc after digitizing (Digidata 1200 Interface, Axon Instruments, Inc.).

The eyestalk was maintained under constant darkness. The reticular photoreceptors' RP was recorded only when resting membrane potential and RP were constant. To elicit an RP of reticular photoreceptors, a light stimulus of 1800 lx intensity and 10  $\mu\text{s}$  of duration was applied at 2 min intervals. The eyestalk was perfused with VH solution for 20 min, and then substituted with an experimental solution and perfused for 20 additional minutes. From min 40–60, the experimental solution was replaced by fresh VH solution. The eyestalk was only used once to test an experimental solution; these were the following: 1) melatonin (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA); 2) an  $\text{MT}_2$  melatonin-selective receptor agonist, 8-methoxy-propionomidotetralin (8-M-PDOT) (Tocris Cookson, Inc., Ballwin, MO, USA), and 3) an  $\text{MT}_2$  melatonin-selective receptor antagonist, *N*-pentanoyl-2-benzyltryptamine (DH97) (Tocris Cookson Inc.). Melatonin, 8-M-PDOT, and DH97 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma) and later diluted in VH solution to reach final concentration. For control experiments, eyestalks were perfused with VH plus DMSO (0.01%) from min 20–40 of the experiment.

The RP amplitude of reticular photoreceptors was recorded in the presence of melatonin, 8-M-PDOT or DH97 to generate concentration–response curves. RP amplitude of reticular photoreceptors was recorded at 2-hour intervals in a 24-hour cycle to test the effect of melatonin; 8-M-PDOT and DH97 were tested at circadian times (CTs) 6 and 18. During the hours of subjective night, eyestalks were isolated under red dim light.

### 2.3. Data analysis

RP amplitude comprised the voltage change (in mV) produced in the reticular photoreceptor by a light stimulus. For comparative purposes all values were normalized; thus, 100% was the average RP amplitude obtained during the first 20 min in VH solution; this was considered the basal RP amplitude. The percentage was arcsine transformed. The effect produced by melatonin (min 40 of the experiment) on RP amplitude was plotted. One-way ANOVA was employed to determine the significance in the melatonin effect. Tukey post hoc test was utilized when significant differences were found.  $P < 0.05$  level was used to determine minimum significance.

The effect produced by 8-M-PDOT and melatonin (min 40 of the experiment) on RP amplitude at CTs 6 and 18 was analyzed with the Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

### 2.4. Binding assay of [ $^{125}\text{I}$ ]-melatonin to crayfish eyestalk membranes

#### 2.4.1. Membrane preparation

Eyestalks without chitin layer were removed at CTs 6 and at 18. Eyestalk included the following: connective tissue; muscle fibers; axons and neurons from the different optic ganglia; the reticular photoreceptor and, probably cone crystalline, distal pigment cells, and cornea. Then, these were pooled and homogenized in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.5 at 4 °C) at setting 5 for 10 s. Homogenates were centrifuged at 36,000g for 30 min at 4 °C. The pellet was washed, resuspended in Tris–HCl buffer solution, and recentrifuged at 36,000g for 30 min at 4 °C. Finally, the pellet corresponding to the membrane fraction was resuspended by gentle homogenization in Tris–HCl buffer to yield a tissue concentration of 12 mg/mL. Protein concentration was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951), with bovine serum albumin (BSA) as standard.

#### 2.4.2. Binding assays

Binding assays were performed as described by Dubocovich and Takahashi (1987). Briefly, [ $^{125}\text{I}$ ]-melatonin (specific activity: 2200 Ci/mmol) was diluted in 50 mM Tris–HCl (pH 7.5 at 4 °C) solution containing 0.01% BSA. Eyestalk membrane fraction was incubated with increasing concentrations of [ $^{125}\text{I}$ ]-melatonin. Assays of [ $^{125}\text{I}$ ]-melatonin



were performed at 4 °C in a total volume of 200  $\mu$ L for 90 min. Binding of [ $^{125}$ I]-melatonin was measured in triplicate. Binding reaction was terminated by the addition of 4 mL of ice-cold buffer and vacuum filtration through glass fiber filters (Millipore, APFC) that were previously soaked in 0.3% polyethyleneimine solution. Filtration was carried out using a cell harvester (Millipore 1225), and each filter was washed twice with 4 mL of cold buffer, dried, and counted in a gamma counter. Non-specific binding was defined as binding in the presence of 1 mM melatonin.

#### 2.4.3. Data analysis

Specific [ $^{125}$ I]-melatonin binding was calculated by the difference of total [ $^{125}$ I]-melatonin bound minus [ $^{125}$ I]-melatonin bound in the presence of 1 mM non-radioactive melatonin (non-specific binding), and was expressed as fmol/mg of protein. To determine the existence of a single or of multiple binding sites in the sample, we utilized Scatchard plots. Dissociation constant ( $K_d$ ) and binding densities ( $B_{max}$ ) from saturation studies were calculated by non-linear regression using GraphPad prism (version 5).

### 3. Results

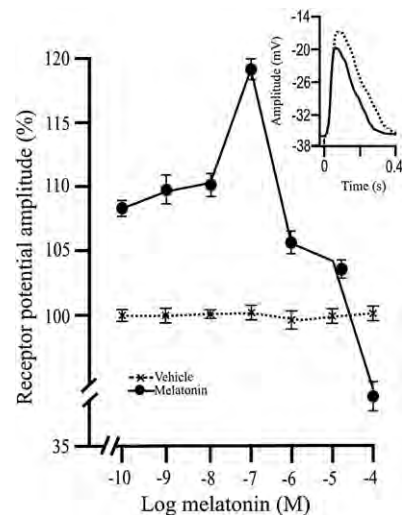
Two main components can be distinguished during depolarization of the receptor potential (RP) of reticular photoreceptors: a fast transient depolarization (the transient phase, TP) followed by a slow-sustained depolarization that precedes the repolarization phase. In our RP recordings, we only considered the TP, this was considered as the RP amplitude, with a mean value of  $16.5 \pm 1.4$  mV with a duration of  $243 \pm 25.6$  ms.

Crayfish eyestalks were perfused with several concentrations of melatonin (1 pM to 100  $\mu$ M) when endogenous melatonin level was low, i.e.,  $\sim 30$  pg/eyestalk (Balzer et al., 1997; maximal level is  $\sim 1250$  pg/eyestalk). Vehicle solution had no effect on the RP amplitude of reticular photoreceptors (Fig. 1). Melatonin at 1–10 pM concentration did not modify RP amplitude; while in the presence of 100 pM to 100 nM, RP amplitude was increased in a concentration-dependent manner from 5– $20 \pm 1.5\%$  (Fig. 1). With melatonin between 1 and 10  $\mu$ M, RP amplitude increased by  $3 \pm 0.3\%$  (Fig. 1). Highest concentration employed in these tests (100  $\mu$ M) reduced RP amplitude by  $40 \pm 1$  (Fig. 1).

Every 2 h, crayfish eyestalks were perfused with 100 nM melatonin. Vehicle solution had no effect on the RP amplitude of reticular photoreceptor during a 24-hour cycle (Fig. 2). 100 nM melatonin increased RP amplitude of reticular photoreceptor during a 24-hour cycle (Fig. 2). There was a significant difference when comparing the magnitude of the effect between subjective day and the subjective night (ANOVA,  $P < 0.05$ ). When melatonin was perfused during subjective day (from CT 12–24), the effect was greater than during subjective night (from CT 0–12) (Tukey test,  $P < 0.05$ ). The minimum effect produced by melatonin on RP amplitude was 3% at CT 2, and the maximum was  $30 \pm 1.5\%$  at CT 20 (Fig. 2). However, melatonin reduced the RP amplitude of reticular photoreceptor by  $15 \pm 0.5\%$  at CT 0 (Fig. 2).

To evaluate whether an  $MT_2$  melatonin membrane receptor regulates the changes of RP amplitude of reticular photoreceptors, we examined the effect of 8-M-PDOT, a selective  $MT_2$  melatonin-receptor agonist, and the effect of DH97, a selective and competitive  $MT_2$  melatonin-receptor antagonist, on reticular photoreceptors of crayfish.

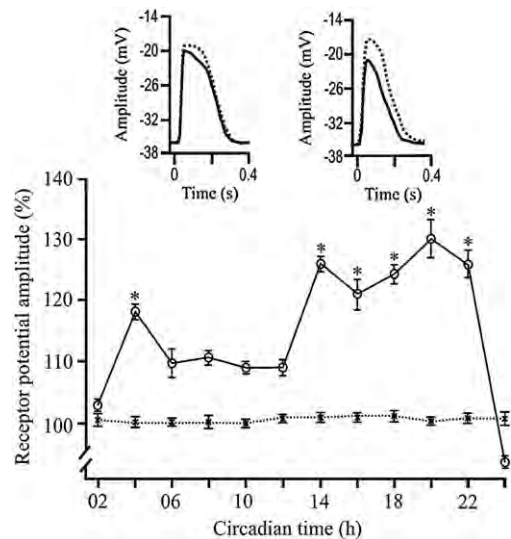
Vehicle solution exerted no effect on RP amplitude of reticular photoreceptors (Fig. 3). Eyestalks perfused with several concentrations of 8-M-PDOT (100 pM to 1  $\mu$ M) were tested when endogenous melatonin level was low, i.e.,  $\sim 30$  pg/eyestalk (Balzer et al., 1997). In the presence of 100 pM to 10 nM 8-M-PDOT produced concentration-dependent enhancement of RP amplitude from  $3 \pm 0.5$ – $15 \pm 1\%$  (Fig. 3). 10  $\mu$ M concentrations reduced RP amplitude by  $25 \pm 0.5\%$ , as did melatonin 100  $\mu$ M (Fig. 3). The effect of 8-M-PDOT on RP amplitude mimicked the melatonin effect, although at a different magnitude. A



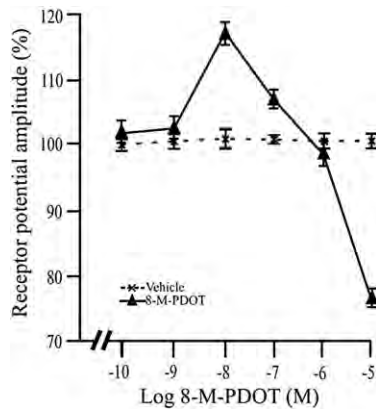
**Fig. 1.** Effect of different concentrations of melatonin on receptor potential amplitude of reticular photoreceptor. Crayfish eyestalks were isolated when the level of the endogenous melatonin was low, i.e.,  $\sim 30$  pg/eyestalk. Electrical response of the reticular photoreceptor to light (receptor potential, RP) was recorded with melatonin (●) or the vehicle (0.01% DMSO; x). One hundred percent represents RP amplitude before application of melatonin or the vehicle. Melatonin was tested at  $10^{-10}$ – $10^{-4}$  M. The effect produced by melatonin on RP amplitude (at 20 min of its application) was plotted. Each point represents mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) of five independent experiments. Inset graph shows the RP recorded from an eyestalk immersed in VH solution (solid line) and after 20 min of  $10^{-7}$  M melatonin application (dashed line).

concentration of 10 nM was the most effective in increasing RP amplitude. 8-M-PDOT is 20-fold more selective for the  $MT_2$  (vs.  $MT_1$ ) subtype, with a  $pK_i$  value = 8.03 in vertebrate receptors.

Vehicle solution had no effect on the RP amplitude of reticular photoreceptors (Fig. 4). DH97-perfused eyestalks (100 pM to 10  $\mu$ M) were tested when the animal exhibited the highest endogenous



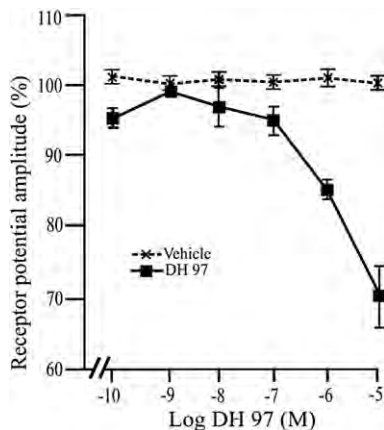
**Fig. 2.** Effect of melatonin on receptor potential amplitude of reticular photoreceptor during the 24-hour cycle. Crayfish eyestalks were isolated every 2 h during a 24-hour cycle. Electrical response to light of reticular photoreceptor (receptor potential, RP) was recorded in the presence of melatonin 100 nM (○) or the vehicle 0.01% DMSO (x) at 2-hour intervals beginning at CT 2. Graph shows the recorded values of the effect produced by melatonin on RP amplitude (at 20 min of its application). One hundred percent represents RP amplitude prior to application of melatonin or vehicle. Each point represents mean  $\pm$  Standard error of mean (SEM) of four to six independent experiments. \* $P < 0.05$ . Subjective night seems from CT 0–12 (activity time of crayfish). Inset graphs show the melatonin action at 20 min of 100 nM melatonin application (dashed line) and VH solution (solid line) on RP recorded during the subjective night at CT 2 (left) and subjective day CT 20 (right).



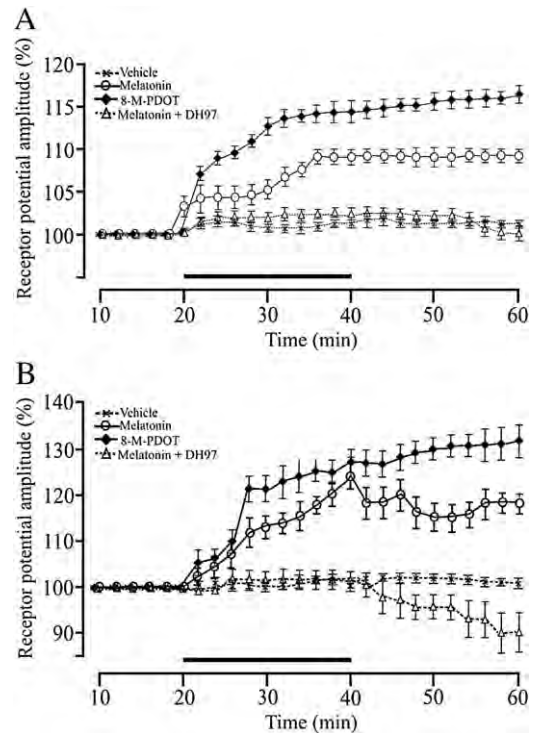
**Fig. 3.** 8-M-PDOT, the selective  $MT_2$  melatonin-receptor agonist, mimics the effect of melatonin on receptor potential amplitude of retinal photoreceptor. Crayfish eyestalks were isolated when the level of the endogenous melatonin was low, i.e.,  $\sim 30$  pg/eyestalk. Electrical response of the retinal photoreceptor to light (receptor potential, RP) was recorded in the presence of 8-M-PDOT ( $\blacktriangle$ ;  $pK_i$  value = 8.03) or the vehicle (0.01% DMSO,  $\circ$ ). 8-M-PDOT was tested at doses  $10^{-10}$ – $10^{-5}$  M. The effect produced by 8-M-PDOT on RP amplitude (at 20 min of its application) was plotted vs. doses applied. One hundred percent represents RP basal amplitude prior to application of the compound tested. Each point represents the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) of five independent experiments.

melatonin levels, i.e.,  $\sim 1250$  pg/eyestalk (Balzer et al., 1997). DH97 produced a concentration-dependent reduction in RP amplitude up to  $30 \pm 1.5\%$  (Fig. 4). DH97 is 89- and 229-fold more selective than  $MT_1$ , and  $pK_i$  value = 8.95 for  $MT_2$  receptors in vertebrate receptors.

The RP amplitudes recorded at CTs 6 and 18 for 20 min in the presence of the vehicle were considered as basal RP amplitudes, 100% (Fig. 5A and B); in the presence of 10 nM 8-M-PDOT, RP amplitude increased by  $14 \pm 0.5\%$  at CT 6 and by  $27 \pm 1\%$  at CT 18 (Fig. 5A and B). An irreversible effect of 8-M-PDOT was observed: after washing with the vehicle, RP amplitude was  $16 \pm 0.5\%$  at CT 6 and  $31 \pm 1.5\%$  at CT 18 (Fig. 5A and B). 100 nM melatonin increased RP amplitude by  $8 \pm 0.5\%$  at CT 6 (Fig. 5A) and by  $25 \pm 1\%$  at CT 18 (Fig. 5B). After removing the melatonin, RP amplitude remained nearly unchanged at CT 6, indicating an incomplete reversible effect of melatonin (Fig. 5A). However, at CT 18, melatonin withdrawal resulted in a slight decrease in RP amplitude from 18–25%, indicating a slight reversible effect of melatonin (Fig. 5B). There was a significant difference when comparing the effect between 8-



**Fig. 4.** DH97, a selective  $MT_2$  melatonin-receptor antagonist, produces a concentration-dependent reduction on receptor potential amplitude of retinal photoreceptor. Crayfish eyestalks were isolated when the level of the endogenous melatonin was high, i.e.,  $\sim 1250$  pg/eyestalk. Electrical response of the retinal photoreceptor to light (receptor potential RP) was recorded in the presence of DH97 ( $\blacksquare$ ;  $pK_i$  value = 8.95) or the vehicle (0.01% DMSO,  $\circ$ ). DH97 was tested from  $10^{-10}$ – $10^{-5}$  M. The effect produced by DH97 on RP amplitude (at 20 min of its application) was plotted vs. doses. One hundred percent represents the basal RP amplitude prior to application of the vehicle. Each point represents mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) of five independent experiments.



**Fig. 5.** DH97 decreases the effect produced by melatonin on receptor potential amplitude of retinal photoreceptors. Crayfish eyestalks were isolated at circadian times 6 (A) and 18 (B). The electrical response of the retinal photoreceptor to light (receptor potential, RP) was obtained every 2 min and was recorded in the presence of tested compound. Bar indicates time of perfusion of the compound tested: vehicle (DMSO 0.01%,  $\circ$ ), 8-M-PDOT (10 nM,  $\blacklozenge$ ), melatonin (100 nM,  $\circ$ ), and melatonin plus DH97 (1 nM,  $\blacktriangle$ ). One hundred percent represents RP amplitude prior to application of the compound tested. Each point represents mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) of five independent experiments.

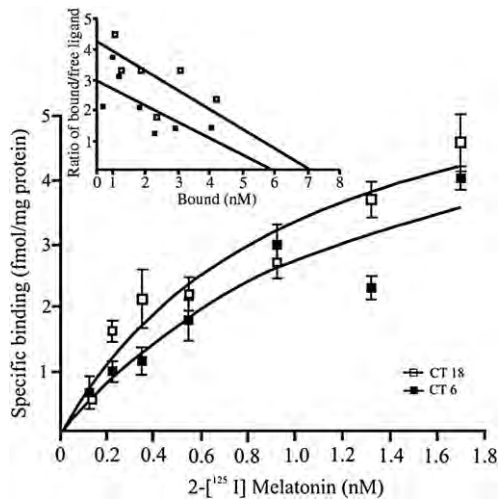
M-PDOT and melatonin at 40 min of experiments at CT 6 (Student's  $t$ -test  $P < 0.05$ ), but at CT 18, there was no statistical difference (Student's  $t$ -test  $P > 0.05$ ).

The addition of 1 nM DH97 in combination with 100 nM melatonin attenuated the RP amplitude induced by melatonin to  $2 \pm 0.5\%$  at CT 6 and to  $3 \pm 1\%$  at CT 18 (Fig. 5A and B). DH97 attenuated the effect of 10 nM 8-M-PDOT on RP amplitude to  $2 \pm 0.5\%$  at CT 6 and to  $4 \pm 0.5\%$  at CT 18 (data not shown). When the solution was changed for the vehicle-exposed eyestalks, there was a slight reduction in RP amplitude.

To determine the affinity and density of melatonin receptors in crayfish eyestalk membranes, binding assays were performed utilizing [ $^{125}$ I]-melatonin at CT 6 and 18. Specific binding defined with 1 nM melatonin was 80% of total [ $^{125}$ I]-melatonin binding. The binding of [ $^{125}$ I]-melatonin (0.2 nM) to crayfish eyestalk membranes was linear between 20 and 120  $\mu$ g of protein (data not shown). Concentration-dependent binding of [ $^{125}$ I]-melatonin (0.1–1.7 nM) to crayfish eyestalk membranes was saturable with nanomolar affinity and resulted in linear Scatchard plots that suggested binding to a single class of sites. Scatchard analysis of binding for [ $^{125}$ I]-melatonin revealed an affinity constant ( $K_d$ ) of 1.1 nM and a total number of binding sites ( $B_{max}$ ) of 6 fmol/mg protein at CT 6; a  $K_d$  of 1.46 nM and  $B_{max}$  of 7 fmol/mg protein were measured at CT 18 (Fig. 6).

#### 4. Discussion

The present study demonstrates that melatonin promotes an increase in the electrical response of retinal photoreceptors to light; the receptor potential (RP). Furthermore, our results provide evidence that circadian modulation of melatonin in the RP amplitude of retinal photoreceptor occurs by activation of  $MT_2$ -like melatonin



**Fig. 6.** [ $^{125}\text{I}$ ]-melatonin binding to crayfish eyestalks membrane is saturable and of high affinity. Binding assays were done at two circadian times 6 (■), and 18 (□) (specific activity: 2200 Ci/mmol;  $pK_i$  value = 9.87). Non-specific binding was assessed using 1 mM melatonin. Each point represents mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) of two experiments done in triplicate. Inset graph depicts Scatchard plots of the data.

receptors. Our study also demonstrates the presence and possible margin sensitivity of melatonin receptors in crayfish eyestalk.

Visual function modulation by melatonin has been reported for a wide variety of organisms including invertebrates (Vivien-Roels et al., 1984; Balzer et al., 1997; Lampel et al., 2005; Maciel et al., 2008). Melatonin increases retinal sensitivity to light because the dark adaptative mechanism was demonstrated by the electroretinogram (ERG) analysis (Semm and Vollrath, 1982; Wiechmann et al., 1988; Balzer et al., 1997; Reuss and Kieffer, 1998; Solís-Chagoyán et al., 2008). In vertebrate retina, melatonin increases response to light by changing the amplitude of both the *a*-wave (rod photoreceptors) and the *b*-wave (inner retinal cells responding to the photoreceptor input) of the ERG. Melatonin triggers outer segment disc shedding (White and Fisher, 1989), causes cone elongation (characteristic of dark adaptation) (Pierce and Besharse, 1985), and modulates release of dopamine in photoreceptor cells; melatonin and dopamine represent chemical signals of darkness and light, respectively, (Iuvone and Gan, 1995; Miranda-Anaya et al., 2002).

In the crayfish, melatonin together with other hormones, allows the photoreceptor cell to exhibit its maximal responsiveness to light, thereby reaching the “dark-adaptation state”, i.e., melatonin increases the amplitude of the oscillation in the electroretinogram (ERG) circadian rhythm (Balzer et al., 1997; Solís-Chagoyán et al., 2008). Melatonin and pigment-dispersing hormone participate in synchronization of the ERG circadian rhythm by reporting to the pacemaker the beginning and the end respectively, of darkness phase after several days of phase adjustment (Verde et al., 2007; Solís-Chagoyán et al., 2008). Thus, melatonin appears to act not only as a messenger by communicating a phase of the cycle to the pacemaker, but also as a hormone by communicating after some time the signal of darkness to the photoreceptors.

Melatonin increases RP amplitude mimicking thereby the nocturnal state of reticular photoreceptors as indicated by the following: 1) at a physiological concentration, melatonin increases the RP amplitude of reticular photoreceptors during a 24-hour cycle; 2) the increase produced by melatonin in RP amplitude therefore exerted a stronger effect during subjective day than during subjective night, and 3) application of DH97, a selective and competitive  $\text{MT}_2$  melatonin-receptor antagonist when endogenous melatonin level is high produces a reduction of the response of photoreceptors to light. These facts suggest that the effect of melatonin is influenced by the light–dark cycle, and that the effect promotes an

increase of sensitivity to light of the crayfish reticular cells as part of a dark-adaptation mechanism.

In vertebrates, several physiological responses to melatonin have been identified as mediated through activation of the  $\text{MT}_2$  melatonin receptor by the use of selective  $\text{MT}_2$  antagonists and agonists. These responses include modulation of dopamine release in rabbit retina (Dubocovich et al., 1997), and phase advance of circadian rhythms in the central nervous system (Gauer et al., 1993a; Gauer et al., 1993b; Liu et al., 1997). The  $\text{MT}_2$  melatonin receptor has been reported to be expressed mainly in retina (Dubocovich and Takahashi, 1987; Reppert et al., 1996).

In this work, we demonstrated that  $\text{MT}_2$ -like melatonin receptors modulate the effect of melatonin on RP amplitude of reticular photoreceptor as does the selective  $\text{MT}_2$  melatonin-receptor agonist 8-M-PDOT. The effects of 8-M-PDOT are similar to those of melatonin, but take place at a lower concentration. As expected, antagonist DH97 blocked response. The differences between 8-M-PDOT and melatonin responses on RP amplitude of reticular photoreceptor are in agreement with the previously reported higher potency of  $\text{MT}_2$  receptor agonist 8-M-PDOT (Dubocovich, 1995; Dubocovich et al., 1997). The long duration observed of the 8-M-PDOT or melatonin-induced increase in RP amplitude of reticular photoreceptor suggests that the metabotropic melatonin receptor may be involved.

Melatonin binding in crayfish eyestalk membranes was by a single class of [ $^{125}\text{I}$ ]-melatonin binding site with nanomolar affinity; it thus belongs to the class of  $\text{MT}_2$  receptors, implicated as binding sites on retinal membranes (Wiechmann et al., 1986; Duncan et al., 1988). We cannot, however, exclude the existence of an  $\text{MT}_1$  receptor in crayfish eyestalks because linear Scatchard plots suggest binding to another site with low affinity. More detailed studies are required to validate this hypothesis. These results suggest that melatonin binding in eyestalk membranes activates an intracellular mechanism to increase the sensitivity of the visual system and thereby facilitate the dark-adaptation state.

In crayfish eyestalk, solely small changes of melatonin-receptor density were observed between day and night. Affinity and density of melatonin-receptor changes throughout the light/dark cycle suggest a sensitivity variation (Witt-Enderby et al., 2003), although mechanisms controlling melatonin-receptor sensitization or desensitization remain unknown. However, it has been suggested that the photoperiod (Witt-Enderby et al., 2003) or melatonin itself (Gauer et al., 1993a; Gauer et al., 1993b; Ligo et al., 2003) may be involved. Melatonin receptors appear to be desensitized coincidentally with high plasma melatonin levels during darkness in nearly all species examined to date. The circulating melatonin rhythm was out of phase with receptor-affinity and binding-capacity rhythms (Ligo et al., 2003; Witt-Enderby et al., 2003). Melatonin promoted desensitization and/or internalization of  $\text{MT}_2$  melatonin receptors after exposure to a physiological concentration of melatonin (Gerdin et al., 2004). Desensitization is common to the family of G-protein coupled receptors (Sibley et al., 1987; Haussdorff et al., 1990), and the  $\text{MT}_2$  receptor is a member of this family (Reppert, 1997).

In the crayfish eyestalk, we observed possible margin sensitivity in melatonin-receptor number between day and night, but no significant differences. However, we do not discard the possibility of some density variations of melatonin receptors induced perhaps by the light–dark cycle or by melatonin itself, because we also observed changes of receptor potential amplitude on exogenous application of melatonin. Change was higher during subjective day than during subjective night, perhaps because during subjective night the crayfish eyestalk is already responding to endogenous melatonin. The variation of responsiveness of photoreceptors to light could be induced only by the variation of receptor density, but we could not exclude a possible desensitization of  $\text{MT}_2$  receptors by melatonin itself, because melatonin reduced the RP amplitude of reticular photoreceptor during some circadian hours, for example, CT 24. Also,



a concentration  $\geq 10 \mu\text{M}$ , melatonin induced a reduction in RP amplitude, suggesting desensitization of  $\text{MT}_2$ -like melatonin receptors. The molecular mechanisms regulating this process remain to be determined. The possible density variation of melatonin receptors in crayfish eyestalk also remains to be clarified. It is not impossible to discard the possibility that melatonin was acting by means of some other mechanisms, including the presence of more than one type of receptor.

In summary, the present study shows that 100 nM melatonin increased RP amplitude; this increase was dependent on the time of melatonin application and mimicked the nocturnal state of retinal photoreceptors. This observation also strongly suggests the involvement of  $\text{MT}_2$ -like melatonin receptors modulating this effect on the RP amplitude of the retinal photoreceptor. The presence of melatonin receptors in a photoreceptor organ of an arthropod was evidenced. These data indicate that melatonin is a signal for photoperiod darkness in the circadian system in crayfish eyestalk, similar to the case of vertebrates. This action is modulated by membrane receptors located in the crayfish eyestalk. It is also plausible that photoreceptor cells contain all the required elements for consideration as a circadian pacemaker.

### Acknowledgments

The authors are indebted to Professor David Lloyd for his invaluable aid in the revision of this manuscript. This study was made possible through IN206203-3 and IN200207 DGAPA grants. The authors wish to thank *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México*, and *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico*. We would also like to thank Dr. Miguel Asai-Camacho for assistance with the radioactivity. Finally, we are grateful to QFB Leonardo Ortiz and Biol Miguel A. Velázquez-Flores for their help with the binding assays, and Gustavo Díaz-Moreno for technical support.

### References

- Afeche, S.C., Barbosa, R., Scialfa, J.H., Terra, I.M., Cassola, A.C., Cipolla-Neto, J., 2006. Effects of the blockade of high voltage-activated calcium channels on in vitro pineal melatonin synthesis. *Cell Biochem. Funct.* 24, 499–505.
- Balzer, I., Espindola, I.R., Fuentes-Pardo, B., 1997. Daily variations of immunoreactive melatonin in the visual system of crayfish. *Biol. Cell* 89, 539–543.
- Benítez-King, G., Antón-Tay, F., 1993. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49, 635–641.
- Benítez-King, G., Huerto-Delgado, L., Antón-Tay, F., 1993. Binding of  $^3\text{H}$ -melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53, 201–207.
- Cahill, G.M., Grace, M.S., Besharse, J.C., 1991. Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and ocular circadian clock. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11, 529–560.
- Carlberg, C., 2000. Gene regulation by melatonin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 917, 387–396.
- Dubocovich, M.L., 1988. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 2, 2765–2773.
- Dubocovich, M.L., 1995. Melatonin receptor: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 50–56.
- Dubocovich, M.L., Markowska, M., 2005. Functional  $\text{MT}_1$  and  $\text{MT}_2$  melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27, 101–110.
- Dubocovich, M.L., Takahashi, J.S., 1987. Use of 2-[ $^{125}\text{I}$ ] iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3916–3920.
- Duncan, M.J., Takahashi, J.S., Dubocovich, M.L., 1988. 2-[ $^{125}\text{I}$ ] iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 122, 1825–1833.
- Dubocovich, M.L., Masana, M.I., Jacob, S., Sauri, D.M., 1997. Melatonin receptor antagonist that differentiates between the human  $\text{Mel}_{1a}$  and  $\text{Mel}_{1b}$  recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina  $\text{ML}_1$  presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355, 365–375.
- Fuentes-Pardo, B., Ramos-Carvajal, J., 1983. The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 74, 711–714.
- Fuentes-Pardo, B., Solís-Chagoyán, H., Egidio, W., 2007. Melatonin as a synchronizer of circadian rhythms in vertebrates and invertebrates. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 12, 1–11.
- Garger, A.V., Richard, E.A., Lisman, J.E., 2006. Testing the role of calmodulin in the excitation of Limulus photoreceptors. *Neurosci. Lett.* 406, 6–10.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M., Pévet, P., 1993a. Melatonin receptors density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res.* 602, 153–156.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M., Skene, D.J., Vivien-Roels, B., Pévet, P., 1993b. Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* 57, 20–126.
- Gem, W.A., Ralph, C.L., 1979. Melatonin synthesis by the retina. *Science* 204, 183–184.
- Gerdin, M.J., Masana, M.I., Rivera-Bermúdez, M.A., Hudson, R.L., Earnest, D.J., Gillette, M.U., Dubocovich, M.L., 2004. Melatonin desensitizes endogenous  $\text{MT}_2$  melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB J.* 18, 1646–1656.
- Hardebrand, R., Poeegeler, B., 2003. Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34, 233–241.
- Hausdorff, W.P., Caron, M.C., Lefkowitz, R.J., 1990. Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 4, 2881–2889.
- Hernández-Falcón, J., Fuentes-Pardo, B., 1991. Crayfish retinal cells: influence of extracellular sodium and calcium upon receptor potential. *Comp. Biochem. Physiol.* 100, 823–832.
- Huang, H., Lee, S.C., Yang, X.L., 2005. Modulation by melatonin of glutamatergic synaptic transmission in the carp retina. *J. Physiol.* 569, 857–871.
- Isorna, E., Guijarro, A., Delgado, M., Alonso-Bedate, M., Alonso-Gómez, A., 2004. Characterization of melatonin binding sites in the brain and retina of the frog *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 259–267.
- Iuvone, P.M., Gan, J., 1995. Functional interaction of melatonin receptors and D1 dopamine receptors in cultured chick retinal neurons. *J. Neurosci.* 15, 2179–2185.
- Lampel, J., Briscoe, A.D., Wasserthal, L.T., 2005. Expression of UV-, blue-, long-wavelength-sensitive opsins and melatonin in extraretinal photoreceptors of the optic lobes of hawk moths. *Cell Tissue Res.* 321, 443–458.
- Ligo, M., Furukawa, K., Tabata, M., Aida, K., 2003. Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.* 347, 49–52.
- Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., Reppert, S.M., 1997. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91–102.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Macías, M., Escames, G., León, J., Coto, A., Sbihiz, Y., Osunaz, A., Acuña-Castroviejo, D., 2003. Calcitriol–melatonin. An unexpected relationship. *Eur. J. Biochem.* 270, 832–840.
- Maciel, F.E., Geijs, M.A., Vargas, M.A., Cruz, B.P., Ramos, B.P., Vakkuri, O., Meyer-Rochow, V.B., Maia Nery, L.E., Allodi, S., 2008. Daily variation of melatonin content in the optic lobes of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 149, 162–166.
- Miller, C.S., Glantz, R.M., 2000. Visual adaptation modulates a potassium conductance in retinal cells of the crayfish. *Vis. Neurosci.* 17, 353–368.
- Miranda-Anaya, M., Paul, A., Bartell, Menaker, M., 2002. Circadian rhythm of iguana electroretinogram: the role of dopamine and melatonin. *J. Biol. Rhythms* 17, 526–538.
- Natesan, A.K., Cassone, V.M., 2002. Melatonin receptor mRNA localization and rhythmicity in the retina of the domestic chick, *Gallus domesticus*. *Vis. Neurosci.* 19, 265–274.
- Pierce, M.E., Besharse, J.C., 1985. Circadian regulation of retinomotor movements I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length. *J. Gen. Physiol.* 86, 671–689.
- Prada, C., Udín, S.B., Wiechmann, A.F., Zhdanova, I.V., 2005. Stimulation of melatonin receptors decreases calcium levels in *Xenopus* tectal cells by activating GABA receptors. *J. Neurophysiol.* 94, 968–978.
- Reppert, S.M., 1997. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Rhythms* 12, 528–531.
- Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slangenahaupt, J.F., Gusella, J.F., 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the  $\text{Mel}_{1b}$  melatonin receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8734–8738.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Godson, C., 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 100–102.
- Reuss, S., Kieffer, W., 1998. Melatonin administered systemically alter the properties of visual cortex cells in cat: further evidence for a role in visual information processing. *Vision Res.* 29, 1089–1093.
- Semm, P., Vollrath, L., 1982. Alterations in the spontaneous activity of cell in the guinea pig pineal gland and visual system produced by pineal indoles. *J. Neural Transm.* 53, 265–275.
- Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1987. Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell* 48, 913–922.
- Smirnov, A.N., 2001. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry* 66, 19–26.
- Solís-Chagoyán, H., Mendoza-Vargas, L., Fuentes-Pardo, B., 2008. Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 149, 373–379.
- Soto-Vega, E., Meza, I., Ramírez-Rodríguez, G., Benítez-King, G., 2004. Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C. *J. Pineal Res.* 37, 98–106.
- Tosini, G., 2000. Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. *Chronobiol. Int.* 17, 599–612.
- Tosini, G., Fukuhara, C., 2003. Photoc and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J. Neuroendocrinol.* 15, 364–369.
- Vanecek, J., 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Revs.* 78, 687–721.
- Vivien-Roels, B., Pévet, P., Beck, O., Fevre-Montange, M., 1984. Identification of melatonin in the compound eyes of an insect, the locust (*Locusta migratoria*), by radioimmunoassay and gas chromatography–mass spectrometry. *Neurosci. Lett.* 49, 153–157.

- Verde, M.A., Barriga-Montoya, C., Fuentes-Pardo, B., 2007. Pigment dispersing hormone generates a circadian response to light in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 983–992.
- Von Gall, C., Stehle, J.H., Weaver, D.R., 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309, 151–162.
- White, M.P., Fisher, L.J., 1989. Effects of exogenous melatonin on circadian disc shedding in the albino rat retina. *Vision Res.* 29, 167–179.
- Wiechmann, A.F., Bok, D., Horwitz, J., 1986. Melatonin-binding in the frog retina: autoradiographic and biochemical analysis. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 27, 153–163.
- Wiechmann, A.F., Yang, X.L., Wu, S.M., Hollyfield, J.G., 1988. melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Res.* 453, 377–380.
- Witt-Enderby, P.A., Bennett, J., Jarzynka, M.L., Firestine, S., Melan, M.A., 2003. Melatonin receptor and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 72, 218–219.
- Zisapel, N., Laudon, M., 1983. Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res.* 272, 378–381.

# Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish

Héctor Solís-Chagoyán, Leonor Mendoza-Vargas, Beatriz Fuentes-Pardo \*

*Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico*

Received 27 November 2007; received in revised form 22 January 2008; accepted 22 January 2008  
Available online 6 February 2008

## Abstract

One of the most important functions modulated by melatonin is the synchronization of circadian rhythms. In crayfish (*Procambarus clarkii*), we have obtained evidence that the amplitude of the electrical response to light of the retinal photoreceptors the receptor potential, is modified by the action of melatonin and that the magnitude of this action depends on the circadian time of melatonin application. In contrast, the electroretinogram (ERG) circadian rhythm can be synchronized by either single or periodic melatonin application. In this work we hypothesized that, in crayfish, melatonin acts on effectors and on pacemaker of ERG circadian rhythm as a non-photic synchronizer. Melatonin could be a hormone that sends a signal of darkness to the ERG circadian system.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Melatonin; Synchronizer; Circadian rhythm; Crayfish; Melatonin receptors; Electroretinogram

## 1. Introduction

Melatonin is a hormone present in all studied species, from unicellular to mammals. It is a highly conserved molecule with respect to both its pathway of synthesis and its mechanisms of action. In vertebrates, melatonin activates transduction signals binding to membrane receptors (Reppert, 1997; Von Gall et al., 2002; Witt-Enderby et al., 2003), nuclear receptors (Carlberg, 2000; Smirnov, 2001) or cell internal elements such as calmodulin (Benítez-King et al., 1993; Benítez-King and Antón-Tay, 1993; Soto-Vega et al., 2004). Information about the presence and role of melatonin in invertebrates is scarce comparing to information about vertebrates. Several studies have established a similar role for the hormone to that found in vertebrates (for reviews see Vivien-Roels et al., 1984; Harde-land and Poeggeler, 2003; Fuentes-Pardo et al., 2007).

Many authors have evidenced the presence of at least three types of melatonin membrane receptors (MT1, MT2, MT3) in

diverse vertebrates such as hamsters, rats, birds, fishes, amphibia, and in numerous structures such as *pars tuberalis*, suprachiasmatic nucleus, retina, kidney, ovary, cardiac vessels and various cancerous cell lines (Natesan and Cassone, 2002; Isorna et al., 2004; Huang et al., 2005). Here, again, the presence of melatonin membrane receptors in invertebrates has not yet been detected.

Among the wide range of functions associated with melatonin action, its participation in generation and synchronization of circadian rhythms is particularly relevant and has been subject of study of many investigators (Underwood, 1990; Underwood et al., 2001; Pévet, 2003).

One approach to the study of circadian rhythms involves the establishment of the main anatomical structures of the corresponding circadian system as well as the study of mechanisms inherent to synchronization. The study of the circadian rhythms in crayfish, particularly the rhythm of sensitivity to light of visual photoreceptors, recorded by means of the electroretinogram (ERG) amplitude, has been recently revised in the light of the understanding of the participation of some hormones on the circadian modulation. Among these hormones, the pigment dispersing hormone (PDH) seems to play an important role in modulation of this rhythm by acting as a chemical signal whose maximal

\* Corresponding author. Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico. Tel.: +52 5556232362; fax: +52 5556232241.

E-mail address: [bfardo@servidor.unam.mx](mailto:bfardo@servidor.unam.mx) (B. Fuentes-Pardo).

production coincides with the moment when the ERG circadian rhythm initiates its rest phase, i.e. by midday (Verde et al., 2007).

In this work we found that exogenous melatonin induced an increment in the response to light of retinal photoreceptor (receptor potential) depending on the circadian time of application. The application of a daily dose of melatonin during several consecutive days induces progressive adjustment of the ERG circadian period until this is totally synchronized by the melatonin signal. When melatonin is applied in a single dose to crayfish during the recording of the ERG circadian rhythm, changes in the rhythm phase can be detected that depend on the circadian time of melatonin application. In turn, the nature (advance or delay) and amplitude of these changes depend on the circadian time of melatonin application.

Production of melatonin in crayfish initiates with the onset of the darkness period (Balzer et al., 1997) and is inhibited by light. Under a photoperiodic regime (12:12 LD, for example), melatonin production is clearly elevated during the darkness periods. On this basis we propose that melatonin acts 180° out of phase of PDH, as a chemical signal associated with the beginning of the activity period by midnight of the ERG circadian rhythm.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological material

Adult crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard, 1852) in intermolt stage (between A and C molt stages) were used. Animals were obtained from a local supplier and kept in an aerated aquarium at controlled temperature (16 °C). Animals were fed three times a week with egg and fresh vegetables. Light–darkness cycles (LD 12:12) (light turned on at 7:00 h and turned off at 19:00 h) were applied from the time of arrival of the animals at the laboratory at least one month prior to the experimental procedures.

### 2.2. Action of melatonin on receptor potential

#### 2.2.1. Solutions

Modified van Harrevelt (VH) solution (Miller and Glantz, 2000) was employed for perfusing the eyestalk preparation; its composition was as follows (mM) NaCl 205, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 13.6, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.6, Hepes 5; pH 7.5. Melatonin solution was obtained by dissolving melatonin in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Co.) and diluting in VH solution. In order to establish an adequate dose of melatonin for our experiments we generated a dose–response curve (from  $1 \times 10^{-10}$  M to  $1 \times 10^{-4}$  M) by testing the effect of melatonin on the amplitude of receptor potential of retinal photoreceptors.

#### 2.2.2. Electrical recording of the receptor potential

The technique for recording the receptor potential (RP) from retinal cells has been described elsewhere (Hernández-Falcón and Fuentes-Pardo, 1991). In brief, after the animals were anesthetized by reducing the temperature, the eyestalk was cut

from its base with a fine scissors. Access to retinula was through a 1 mm opening made with a razor blade, in the dorsal cornea. Excised eyestalk was immersed in a continuous perfusing chamber (2 mL capacity, 0.5 mL/s flow rate) under constant darkness in a Faraday cage and positioned in a vertical manner.

Intracellular electrical recordings were performed using borosilicate glass micropipettes with tip resistances of 30–50 MΩ when filled with 2.7 M KCl. The electrode was lowered (parallel to the longitudinal axis of the eyestalk) by means of a micromanipulator until the cell was penetrated, as determined by a sudden voltage drop (around –35 mV) corresponding to the resting membrane potential (RMP), and a depolarizing RP appearing when the preparation was illuminated with a test light. Test light stimuli were applied parallel to the longitudinal axis of the eyestalk and consisted of 1800 lx, 10 μs duration flashes, delivered by a Grass (PS33) photostimulator.

The signal detected by the electrode was sent to an Axoclamp 2A (Axon Instruments), visualized in an oscilloscope (Tektroniks TDS 460) and stored on a floppy disk after digitizing (Digidata 1200 Interface, Axon Instruments).

### 2.2.3. Experimental procedure

Electrical experiments were conducted only if RMP was constant during the recording time. The eyestalk was in darkness except during a light flash applied every two min when the RP was recorded. Initially, the eyestalk was perfused with control solution (VH solution). After 20 min, VH solution was replaced by experimental solution (according a dose–response curve previously generated, we chose a melatonin 0.1 μM concentration as the most effective one) during 20 min more. From minute 40, bathing solution was replaced by fresh VH solution, where the eyestalk remained until the end of the experiment at minute 60. In control experiments the same procedure was followed with the only difference that from minute 20 to minute 40, it was supplied with VH plus DMSO solution instead of melatonin solution. These experiments were conducted at two circadian times (CT), CT 6 and CT 18. To verify the circadian time of the population, we chose a random sample (five animals) from the crayfish pool and recorded the electroretinogram (ERG) rhythm from each individual. According to the ERG amplitude, the circadian time was determined. The circadian time 0 (CT 0) is the time in the cycle when the activity level exceeds 50% of the ERG amplitude, and CT 24 is one complete cycle later. We chose the ERG recording because it shows a very precise circadian rhythm (Fuentes-Pardo and Ramos-Carvajal, 1983).

### 2.2.4. Data analysis

Two main components can be distinguished in the depolarization of RP of retinal photoreceptors: a fast transient depolarization (the transient phase, TP) followed by a slow, sustained depolarization (SP) preceding repolarization. In our RP recordings we have only considered the TP. From each RP the amplitude of TP (considered as RP amplitude) was measured taken as the voltage change (in mV) produced in the photoreceptor cell immediately after the application of the light flash. Amplitude was plotted versus time. For comparative



purposes all values were normalized. In each graph, the average of the RP amplitude obtained during the first 20 min in VH solution was taken as 100%. Data of RP amplitude of controls and experimental data at minute 40 of experiments made at CT 6 and CT 18 were analyzed with one-way ANOVA and the Tukey test as a post hoc test. Significant differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation.

### 2.3. Action of melatonin on electroretinogram circadian rhythm

#### 2.3.1. Electrical recording of the electroretinogram

Crayfish were fixed to a clamp and partly immersed in a water tank covering the gills, but not the eyestalks. The eyestalks were fixed to the rostrum with dental cement, and a stainless steel electrode (5  $\mu$ m at the tip) was implanted through the cornea. The electrical response to light (ERG) was elicited by applying a light flash (intensity 200 lx, duration 10  $\mu$ s), from a Grass PS-22 photostimulator, every 10 min over a period of no less than 10 and sometimes as many as 40 consecutive days. ERGs were amplified by a low level DC amplifier Grass 7P122, and their amplitude values stored by an analog to digital transformer card (MP100, Biopac Systems) and a software (AcqKnowledge, 8.1). The voltage of the HI component was considered as the ERG amplitude. HI is the amplitude of ERG taken from the basal until the maximal response, and it depends on luminous intensity (Naka and Kuwabara, 1959; Fuentes-Pardo and Inclán-Rubio, 1981; Fuentes-Pardo and Ramos-Carvajal, 1983).

#### 2.3.2. Melatonin as a synchronizer

In order to establish the role of melatonin as a synchronizer of the ERG circadian rhythm, an ERG signal was recorded at 10 min intervals during 40 days in darkness. In those experiments the crayfish were fed once a week at different hours. In order to apply melatonin or vehicle solution, a stainless needle was implanted near the cardiac cavity of the crayfish. Injections were applied under dim red light.

The experiment was divided into three stages. The first one was considered as lasting from the day 1st until day 14th of recording and corresponded to the free-running of the ERG circadian rhythm. During the second stage (day 15th to day 27th), a daily dose of melatonin (0.1 mL, 1  $\mu$ M) was injected at 13:00 h, external time, to synchronize the ERG rhythm. During the third stage (day 28th to day 40th), a daily injection of 0.1 mL of VH plus DMSO solution was applied as a control, at the same hour than before.

#### 2.3.3. Data analysis

The ERG circadian period was analyzed by means of the periodogram technique (Enright, 1965), separately during each of the three stages of experiment. The phase relationship between the time of stimulus application and the CT 0, i.e. when activity phase of the rhythm initiates was also determined. Activity period ( $\alpha$ ) initiates when the ERG amplitude reaches 50% of total, and finishes at the moment when the ERG

amplitude shows a value lower than 50% of total. In this moment initiates the rest period ( $\rho$ ), and finishes once the amplitude reaches 50% of amplitude. Data of periods and  $\alpha/\rho$  ratio of three stages were analyzed with one-way ANOVA and the Tukey test as a post hoc test. Significant differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation.

#### 2.3.4. Effect of a single dose of melatonin on the ERG circadian rhythm

The ERG was recorded every 10 min for 14 days. Experiments were made in complete darkness, only interrupted by light flashes required to generate the ERG. On the sixth day of recording, a single dose of melatonin solution (0.1 mL, 1  $\mu$ M) was applied at different moments (in separate experiments) of the circadian cycle. On the 9th day of experiment, the observed phase of the recorded ERG circadian rhythm was compared with the expected phase of the rhythm, calculated according the ERG period before melatonin application. Injections were applied under dim red light.

For another animal group (control group), we followed the described procedure but injected VH plus DMSO solution instead of melatonin solution.

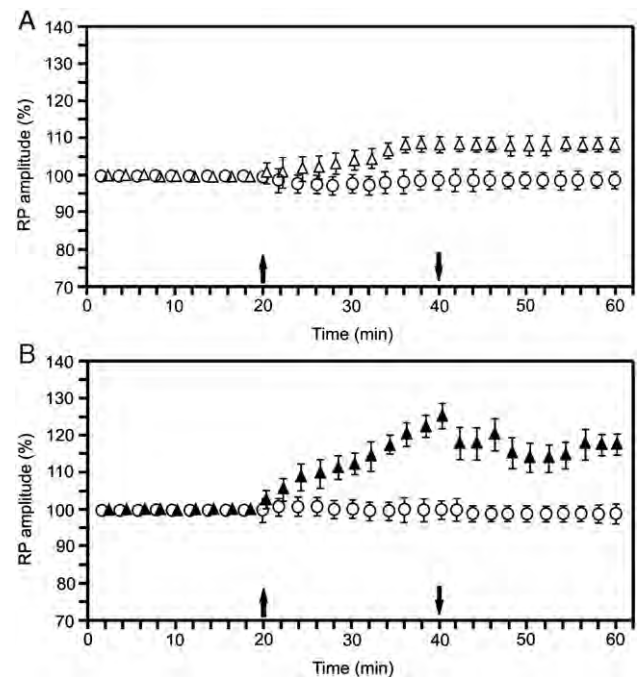


Fig. 1. Effect of melatonin upon receptor potential (RP) amplitude of photoreceptor cells recorded at two circadian times. A) At circadian time 6 (CT 6). B) At circadian time 18 (CT 18). Crayfish eyestalks were perfused in VH solution (circles) and melatonin (empty and filled triangles). From minute 0 to minute 20, the preparation was perfused with VH solution; at 20 min (arrow) the VH was replaced by melatonin solution; at 40 min (arrow) the VH plus melatonin solution was substituted by a fresh VH solution in which the eyestalk remained until the end of the experiment. For control experiment, eyestalk was bathed in VH, the bathing solution was changed for a VH plus DMSO solution at minute 22, and at 42 min solution was replaced for fresh VH. 100% represents the RP amplitude before application of melatonin. Each point is the mean  $\pm$  SEM of 5 crayfish eyestalks.



2.3.5. Data analysis

In order to generate a phase response curve (experimental or control), the differences (advances or delays) between the expected and the observed phases of the ERG circadian rhythm were plotted versus the circadian moment when the melatonin or VH solution was applied. For comparison between circadian time and treatment, a two-way ANOVA was used, followed by Tukey post hoc test. Significant differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation.

3. Results

3.1. Action of melatonin on receptor potential

When a photoreceptor cell was impaled with a microelectrode, a sudden voltage change can be measured. This change corresponds to the RMP which attains a mean value of  $-32.4 \pm 3.5$  mV ( $n = 20$ ). Stimulation with a test flash produces a depolarization in the photoreceptor cell (RP) whose mean values in amplitude are  $14.75 \pm 0.8$  mV ( $n = 20$ ).

When an eyestalk is perfused in a melatonin solution the RP amplitude increases according the applied dose (not shown). If the melatonin solution is substituted by a control solution, the RP amplitude remains almost unchanged indicating a low

reversible effect of melatonin on the elements underlying the RP amplitude.

Fig. 1A shows the values in RP amplitude in response to light flashes applied each two min and recorded at CT 6 from eyestalks ( $n = 5$ ) perfused in a control solution (VH plus DMSO) and from eyestalks ( $n = 5$ ) perfused in an experimental solution (VH plus melatonin  $0.1 \mu\text{M}$ ). All the values were normalized to 100%, i.e., the value of RP amplitude when the eyestalks were initially perfused in control solution. The first arrow (minute 20) marks the moment when the control solution was changed for fresh control solution or by melatonin solution. The second arrow (minute 40) indicates the moment when both the control and the experimental solutions were changed by fresh VH solution. At minute 40 of the experiments, a slight increment (8%) of the RP amplitude once the eyestalks were perfused in the melatonin solution could be detected, as well as the maintenance of similar values after washing with control solution.

When the same experimental protocol was applied to eyestalks at CT 18, at minute 40, the melatonin solution increased the RP amplitude until it reached 125% of the original value. After washing, however, there was a slight tendency to reduce the previous increment and the RP amplitude descended to 117% (Fig. 1B).

Comparing between controls and experimental data obtained at CT 6 and CT 18 at minute 40 of the experiments, in which the

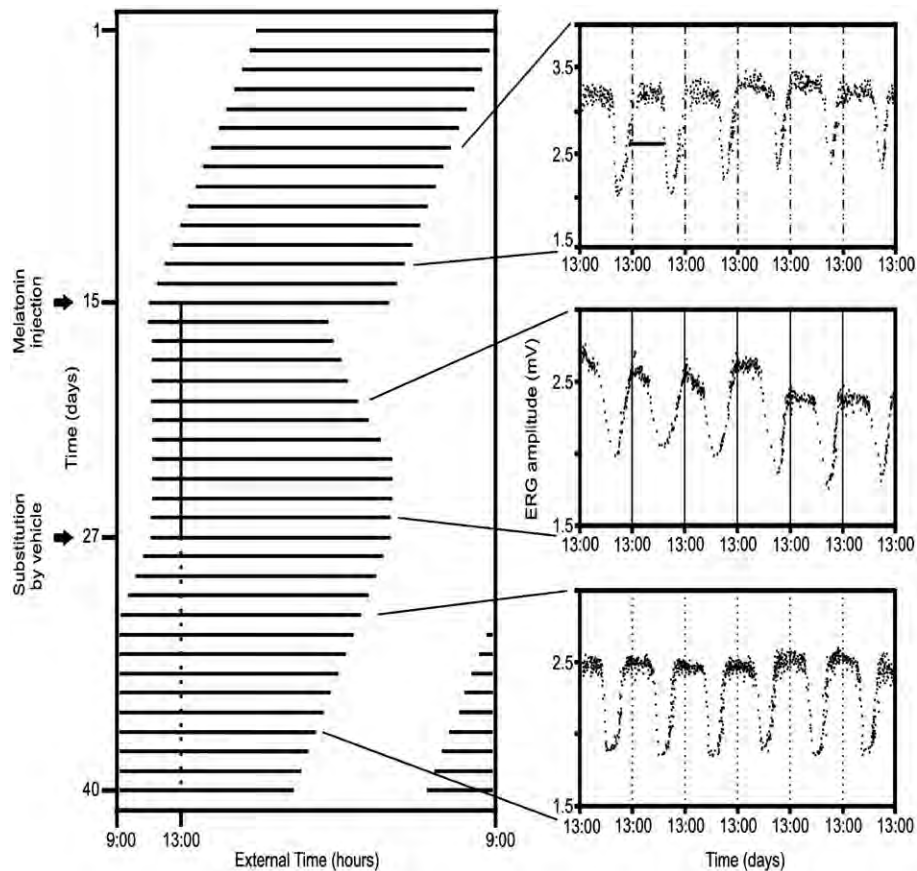


Fig. 2. Effect of a daily application of melatonin upon ERG circadian rhythm. Graphs on the right represent six days of each stage of the experiment. The graph on the left represents only the activity time of circadian cycles for a full experiment. In the second stage melatonin was applied by a stainless needle implanted near the cardiac cavity of crayfish at the same external time (see explanation in text).

maximal effect produced by melatonin was reached, there was a significant difference ( $p < 0.05$ ). The groups corresponding to CT 6 and CT 18 were significantly different to controls and between them (Tukey  $p < 0.05$ ).

### 3.2. Effect of the application of a daily dose of melatonin on the ERG circadian rhythm

Periodic application of melatonin synchronizes the ERG circadian rhythm. The phase and the period of the rhythm were progressively adjusted by the periodic melatonin application. An example ( $n = 3$ ) of synchronization by melatonin is illustrated in Fig. 2 showing only 6 from the 13 days of ERG recording in each of the three experimental stages. In the first stage, from day 1st to day 14th, under free-running condition, the period was  $23.4 \pm 0.3$  h; in the second stage, from day 15th to day 27th, i.e. when the melatonin was applied each day at 13:00 h, external time, the period was  $24.1 \pm 0.1$  h; in the third stage, from day 28th to day 40th, when the VH plus DMSO solution was applied at 13:00 h, external time, the period was  $23.4 \pm 0.4$  h. The adjustment of the rhythm by melatonin can be clearly seen from the first day of application (second block in Fig. 2). Comparing the values of period of the three stages, there was a significant difference ( $p < 0.05$ ). The groups of free-running period were significantly different to synchronization period (Tukey  $p < 0.05$ ).

In the same example, the circadian rhythm in free-running conditions had the  $\alpha/\rho$  of  $1.9 \pm 0.3$ . After melatonin application,  $\alpha$  period was steeply reduced and the  $\rho$  period increased enough to make the  $\alpha/\rho$   $1.1 \pm 0.1$ ; with vehicle solution,  $\alpha/\rho$  increased again and reached a value of  $1.5 \pm 0.1$ . Comparing the values of  $\alpha/\rho$  of the three stages, there was a significant difference ( $p < 0.05$ ). The groups of free-running  $\alpha/\rho$  stages were significantly different to synchronization  $\alpha/\rho$  stage (Tukey  $p < 0.05$ ).

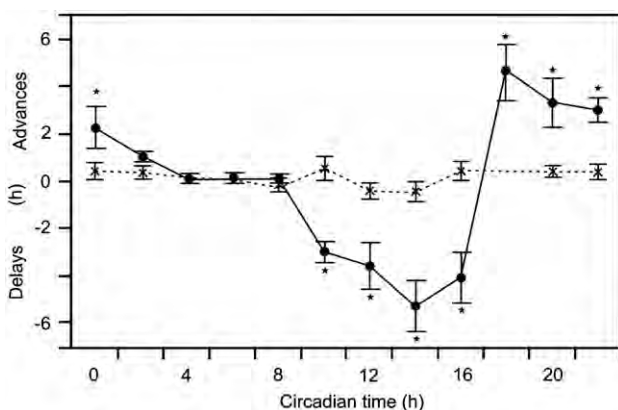


Fig. 3. Phase response curve of ERG circadian rhythm produced by a single dose of melatonin given to crayfish in constant darkness. Advancements were provoked when melatonin was applied from CT 18 to CT 2, delays between CT 10 and CT 16, and no changes between CT 4 and CT 8. Filled circles and solid line correspond to the melatonin curve, and asterisk and dotted line correspond to the control curve. Each point is the mean  $\pm$  SEM of at least 4 crayfish. \*Denotes  $p < 0.05$ .

### 3.3. Effect of a single dose of melatonin on the ERG circadian rhythm

When a single dose of melatonin (0.1 mL, 1  $\mu$ M) is applied to a crayfish from which the ERG circadian rhythm is being recorded, a phase shift can be observed, i.e. a delay or an advance, the magnitude of which depends on the circadian time of melatonin application. When melatonin is applied between CT 18 and CT 2, advances of 4 to 1 h can be detected. On the contrary, delays of 2 to 5 h are produced when the melatonin injection is applied between CT 10 and CT 16. No phase changes are produced when melatonin is applied between CT 4 and CT 8. With these data, we generated the corresponding phase response curve. The control injection (VH plus DMSO) applied as control during the same hours of circadian rhythm that melatonin, does not produce any effect on the phase of the rhythm (Fig. 3). Phase shift values from CT 10 to CT 0 were significantly different to controls ( $p < 0.05$ ).

## 4. Discussion

The hypothesis underlying the three procedures methods applied to establish the role of melatonin in the ERG circadian rhythm is that this hormone acts both on photoreceptors which are the effectors of the rhythm, and on the pacemaker acting as a non-photic synchronizer. The methods followed to examine melatonin action were: a) the perfusion of the sectioned eyestalk in melatonin solution, at two circadian times, to discover its action on the electrical response to light (RP) of the photoreceptor cell; b) the daily application of melatonin or placebo solution, at the same time during 40 consecutive days to detect melatonin synchronizing effect on the ERG circadian rhythm; c) the injection of melatonin into crayfish during the 24-hour cycle to know its effect (advances or delays) on the ERG circadian rhythm.

### 4.1. Perfusion of the sectioned eyestalk in melatonin solution, at two circadian hours

In most invertebrates, including crayfish, two main components can be distinguished in the depolarization of RP: a fast transient depolarization (the transient phase, TP) followed by a slow, sustained depolarization (SP) preceding repolarization. Transient depolarization has been correlated with light intensity and SP with stimulus duration.

In our RP recordings we have only considered the TP. According to the available information on the phototransduction process in arthropod rhabdomeric cells (Verde et al., 2007), it is plausible that changes in amplitude of RP induced by exogenous melatonin reflect changes in ionic channels (calcium and/or sodium channels) involved in TP.

On the basis that cAMP is able to move  $\text{Ca}^{2+}$  into the cell and that calcium modulates the kinetics of potassium and sodium channels (Verde et al., 2007), it is plausible to propose that according our results (Fig. 1A and B) melatonin is involved, together with pigment dispersing hormone (PDH), in the phototransduction mechanisms regulating  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism

(Hernández-Falcón and Fuentes-Pardo, 1991). In vertebrates, melatonin is involved in cAMP and inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) metabolism; both messengers can modulate intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Korf et al., 1998, Vanecek, 1998). There are evidences that in some invertebrates including crayfish, IP3 participates in the retinal phototransduction (Terakita et al., 1998), and cAMP can be modulated by PDH (Mertens et al., 2005; Hyun et al., 2005).

It is interesting that the effect of exogenous PDH (Verde et al., 2007) or a solution with low external calcium (Hernández-Falcón and Fuentes-Pardo, 1991) on RP amplitude is the opposite (reduction of RP amplitude) of that observed when the eyestalk is perfused in melatonin solution (increases of RP amplitude). As yet, however, it is not possible to give a more complete explanation of the action of melatonin on the phototransduction process.

Exogenous melatonin increases the RP amplitude. This increase, however, is significantly higher at CT 18 than at CT 6; a plausible explanation is that differences occur in number and or sensitivity of membrane receptors to melatonin. Although it is not possible to discard the possibility that melatonin could be acting by some other mechanisms. More detailed studies are necessary to validate this hypothesis.

#### 4.2. Melatonin as synchronizer of the ERG circadian rhythm

The daily application of a melatonin dose, always at the same external time (13:00 h, in these experiments) produces, after several days, a precise adjustment of both phase and period of the ERG circadian rhythm which initially was free-running. During the first days of the synchronization process there is a shortening in the activity period ( $\alpha$ ) which progressively return to its original value. This could be explained by different velocities of entrainment of evening and morning oscillators. A similar effect has also been detected in *Acheta domestica* during the daily application of melatonin (Yamano et al., 2001). Once the rhythm has been synchronized, the beginning of  $\alpha$  coincides with the moment when the melatonin is applied. Something similar has been found in nocturnal vertebrates (Redman et al., 1985; Pitrosky et al., 1999; Slotten et al., 1999). On the other hand, in diurnal vertebrates, melatonin application marks the initiation of the rest period ( $\rho$ ) (Slotten et al., 2002; Slotten et al., 2005). Application of control solution without melatonin induces, on the other hand, a clear tendency of the rhythm to return towards the initial condition, i.e., it moves toward the free-running condition (Fig. 2).

#### 4.3. Injection of melatonin into crayfish during the 24-hour cycle

A single melatonin dose injected into a crayfish during a long term recording of the ERG produces either advances or delays in the ERG circadian rhythm depending on the moment when the hormone had been injected. The phase response curve (PRC) generated as a consequence of these phase changes shows that the maximum phase advance and delay (CT 14 and CT 18, respectively) occurred during subjective

day, and no phase changes (CT 4 to CT 8) occurred during subjective night (Fig. 3). These results, suggest that exogenous melatonin reaches the circadian pacemaker (which has been located in the cerebroid ganglion, probably in the protocerebrum (Hernández and Fuentes-Pardo, 2001) acting like a non-photic synchronizer.

Comparing the PRC produced by melatonin with that produced in the same species and the same circadian rhythm by the application of a single light stimulus (Fuentes-Pardo and Ramos-Carvajal, 1983), it is evident that between both PRCs there is a phase difference of 12 h; i.e. when melatonin does not produce any effect on ERG circadian rhythm (CT 4–8), the light stimulus has its maximum effect. In contrast, melatonin produces phase changes (delays or advances) between CT 14 and 20, time during which the light does not produce any detectable phase change (Fig. 4). This difference supports the interpretation that melatonin operates in crayfish, similarly as to be the case in vertebrates, i.e., as a signal indicating to circadian clock the beginning of the darkness period. In turn, light would induce changes in light sensitivity rhythm, in  $180^\circ$  out of phase with respect to melatonin effect supporting the proposal that light could be the signal initiating the PDH release to general circulation in crayfish.

These data support the interpretation that the daily application of the same melatonin dose is differentially detected by the circadian pacemaker which changes day by day the profile of the ERG circadian rhythm.

In summary, we propose that melatonin is involved in synchronization of the ERG circadian rhythm in crayfish, by means of the following mechanisms:

1. Melatonin acts on effectors of ERG circadian rhythm increasing the sensitivity to light of retinal photoreceptors. This action could be regulated by periodic changes in density and or sensitivity of membrane receptors located in the photoreceptor cells; these determine a low activity level by midnight and a high activity by midday.

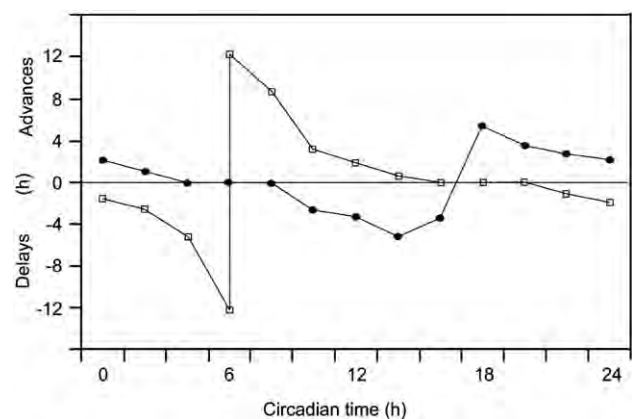


Fig. 4. Phase response curves (PRC) for melatonin and light pulses of 15 min duration for the ERG circadian rhythm in the crayfish *Procambarus clarkii*. Filled circles correspond to the melatonin PRC, and open squares correspond to the light PRC (modified from Fuentes-Pardo and Ramos-Carvajal, 1983).



2. Melatonin acts on pacemaker of ERG circadian rhythm as a non-photoc synchronizer. This proposal is based on: a) the daily application, at the same hour, of melatonin adjusts both period and phase of the ERG circadian rhythm; b) observation that application of a single exogenous melatonin dose to a crayfish induces phase changes (advances or delays) on the ERG circadian rhythm.

In this species, the highest endogenous melatonin level is nocturnal, coinciding with maximal sensitivity to light in photoreceptors and a minimum circulating level of PDH. (Verde et al., 2007). By night, melatonin induces an increase in RP amplitude and PDH produces the opposite effect.

These facts suggest that both melatonin and PDH participate in the modulation of the ERG circadian rhythm by reporting to the pacemaker on the initiation and ending of the darkness phase, respectively.

### Acknowledgements

Authors are in debt with Professor Dr. David Lloyd for his assistance in revision of the manuscript. Supported by IN-200207 DGAPA grant.

### References

- Balzer, I., Espindola, I.R., Fuentes Pardo, B., 1997. Daily variations of immunoreactive melatonin in the visual system of crayfish. *Biol. Cell* 89, 539–543.
- Benítez-King, G., Antón-Tay, F., 1993. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49, 635–641.
- Benítez-King, G., Huerto-Delgado, L., Antón-Tay, F., 1993. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53, 201–207.
- Carlberg, C., 2000. Gene regulation by melatonin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 917, 387–396.
- Enright, J.T., 1965. Accurate geophysical rhythms and frequency analysis. In: Aschoff, J. (Ed.), *Circadian clocks*. North-Holland, Amsterdam, pp. 31–41.
- Fuentes-Pardo, B., Inclán-Rubio, V., 1981. Correlation between the motor and electroretinographic circadian rhythms in crayfish *Procambarus bouvieri*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 68, 477–485.
- Fuentes-Pardo, B., Ramos-Carvajal, J., 1983. The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 74, 711–714.
- Fuentes-Pardo, B., Solís-Chagoyán, H., Egido, W., 2007. Melatonin as a synchronizer of circadian rhythms in vertebrates and invertebrates. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 12, 1–11.
- Girard, C., 1852. A revision of the North American Astaci, with observations on their habits and geographical distribution. *Proc. Acad. Natl. Sci. Philadelphia* 6, 87–91.
- Hardeland, R., Poeggeler, B., 2003. Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34, 233–241.
- Hernández-Falcón, J., Fuentes-Pardo, B., 1991. Crayfish reticular cells: influence of extracellular sodium and calcium upon receptor potential. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A, 823–832.
- Hernández, O.H., Fuentes-Pardo, B., 2001. Cerebroid ganglion is the presumptive pacemaker of the circadian rhythm of electrical response to light in the crayfish. *Biol. Rhythm Res.* 32, 125–144.
- Huang, H., Lee, S.C., Yang, X.L., 2005. Modulation by melatonin of glutamatergic synaptic transmission in the carp retina. *J. Physiol.* 569, 857–871.
- Hyun, S., Lee, Y., Hong, S.T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Shin, J., Lee, J., Jeon, K., Hwang, S., Bae, E., Kim, J., 2005. *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron* 48, 267–278.
- Isorna, E., Guijarro, A., Delgado, M., Alonso-Bedate, M., Alonso-Gómez, A., 2004. Characterization of melatonin binding sites in the brain and retina of the frog *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 259–267.
- Korf, H.W., Schomerus, C., Stehle, J.H., 1998. The pineal organ its hormone melatonin and the photoneuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 146, 1–100.
- Mertens, I., Vandingenen, A., Johnson, E.C., Shafer, O.T., Li, W., Trigg, J.S., De Loof, A., Schoofs, L., Taghert, P.H., 2005. PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron* 48, 213–219.
- Miller, C.S., Glantz, R.M., 2000. Visual adaptation modulates a potassium conductance in reticular cells of the crayfish. *Vis. Neurosci.* 17, 353–368.
- Naka, K., Kuwabara, M., 1959. Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Biol.* 36, 51–61.
- Natesan, A.K., Cassone, V.M., 2002. Melatonin receptor mRNA localization and rhythmicity in the retina of the domestic chick, *Gallus domesticus*. *Vis. Neurosci.* 19, 265–274.
- Pévet, P., 2003. Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J. Neuroendocrinol.* 15, 422–426.
- Pitrosky, B., Kirsch, R., Malan, A., Mocaer, E., Pevet, P., 1999. Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, 812–828.
- Redman, J., Armstrong, S., Ng, K.T., 1985. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219, 1089–1091.
- Reppert, S.M., 1997. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G Protein-coupled receptors. *J. Biol. Rhythms* 12, 528–531.
- Slotten, H.A., Krekling, S., Sicard, B., Pevet, P., 2002. Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav. Brain Res.* 133, 11–19.
- Slotten, H.A., Krekling, S., Pevet, P., 2005. Photic and nonphotic effects on the circadian activity rhythm in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav. Brain Res.* 165, 91–97.
- Slotten, H.A., Pitrosky, B., Pevet, P., 1999. Entrainment of rat circadian rhythms by daily administration of melatonin. Influence of the mode of administration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460, 279–281.
- Smirnov, A.N., 2001. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry* 66, 19–26.
- Soto-Vega, E., Meza, I., Ramírez-Rodríguez, G., Benítez-King, G., 2004. Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C. *J. Pineal Res.* 37, 98–106.
- Terakita, A., Takahama, H., Hariyama, T., Suzuki, T., Tsukahara, Y., 1998. Light regulated localization of the beta-subunit of Gq-type G-protein in the crayfish photoreceptors. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.* 183, 411–417.
- Underwood, H., Steele, C.T., Zivkovic, B., 2001. Circadian organization and the role of the pineal in birds. *Microsc. Res. Tech.* 53, 48–62.
- Underwood, H., 1990. The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia* 46, 120–128.
- Vanecek, J., 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 78, 687–721.
- Verde, M.A., Barriga-Montoya, C., Fuentes-Pardo, B., 2007. Pigment dispersing hormone generates a circadian response to light in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 147, 983–992.
- Vivien-Roels, B., Pevet, P., Beck, O., Fevre-Montange, M., 1984. Identification of melatonin in the compound eyes of an insect, the locust (*Locusta migratoria*), by radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Neurosci. Lett.* 49, 153–157.
- Von Gall, C., Stehle, J.H., Weaver, D.R., 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309, 151–162.
- Witt-Enderby, P.A., Bennett, J., Jarzynka, M.L., Firestone, S., Melan, M.A., 2003. Melatonin receptor and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72, 218–219.
- Yamano, H., Watari, Y., Arai, T., Takeda, M., 2001. Melatonin in drinking water influences a circadian rhythm of locomotor activity in the house cricket, *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.* 47, 943–949.