

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



**RELOJES PERIFÉRICOS EN EL TRACTO
DIGESTIVO DEL CARPÍN (“*Carassius auratus*”):
SÍNTESIS CIRCADIANA DE MELATONINA Y SU
FUNCIÓN EN LA MOTILIDAD INTESTINAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elena Velarde Fernández

Bajo la dirección de los doctores

M^a Jesús Delgado Saavedra
Ángel Luis Alonso Gómez

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-9499-1

© Elena Velarde Fernández, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
(FISIOLÓGÍA ANIMAL II)**



**RELOJES PERIFÉRICOS EN EL TRACTO
DIGESTIVO DEL CARPÍN (*Carassius
auratus*): SÍNTESIS CIRCADIANA DE
MELATONINA Y SU FUNCIÓN EN LA
MOTILIDAD INTESTINAL**

MEMORIA PRESENTADA POR ELENA VELARDE FERNÁNDEZ PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA POR LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

MADRID, 2010

M^a Jesús Delgado Saavedra, Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid, y Ángel Luis Alonso Gómez, Profesor Titular de la Universidad Complutense de Madrid.

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Relojes periféricos en el tracto digestivo del carpín (*Carassius auratus*): síntesis circadiana de melatonina y su función en la motilidad intestinal" realizada por D^a Elena Velarde Fernández bajo nuestra dirección y supervisión en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 14 de mayo de 2010

Dra. María Jesús Delgado Saavedra

Dr. Ángel Luis Alonso Gómez



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. M^a Jesús Delgado Saavedra, y la codirección del Dr. Ángel Luis Alonso Gómez. Este trabajo se realizó con ayuda del apoyo económico del Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL2004-08137-C04-01), del Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto AGL2007-65744-C03-03) y de la Universidad Complutense de Madrid/Comunidad Autónoma de Madrid (proyecto CCG07-UCM/AGR-2500). Elena Velarde Fernández ha sido beneficiaria de una beca de postgrado de Formación de Personal Investigador (BES-2005-7252) del Ministerio de Educación y Ciencia.

ABREVIATURAS

- **4-P-PDOT** 4-Fenil-2-propionamidotetralina
- **5CT** 5-Carboxamidotriptamina
- **5HT** Serotonina (5-hidroxitriptamina)
- **5MT** 5-Metoxitriptamina
- **Φ** Acrofase
- **A** Amplitud
- **AADC** Aminoácido aromático descarboxilasa
- **AANAT** Arilalquilamina *N*-acetiltransferasa
- **AC1** Adenilato ciclase 1
- **ACh** Acetilcolina
- **ACoA** Acetil coenzima A
- **AFMK** *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxikinuramina
- **AMK** *N*¹-acetil-5-metoxikinuramina
- **AMPc** Adenosín monofosfato cíclico
- **ANAT** Arilamina *N*-acetiltransferasa
- **ARNm** Ácido ribonucleico mensajero
- **AVP** Arginina-vasopresina
- **bHLH-PAS** Hélice-lazo-hélice con dominio PAS
- **C** Citosina
- **CCG** Gen controlado por el reloj
- **CCK** Colecistokinina
- **cdNA** Ácido desoxirribonucleico complementario
- **CKI** Caseín kinasa I
- **Cry** Gen *Cryptochrome*
- **CT** Tiempo circadiano
- **DBP** Proteína de unión al elemento D
- **DEPC** Dietil pirocarbonato
- **DMSO** Dimetil sulfóxido
- **dNTP** Desoxirribonucleótido trifosfato
- **DTT** Ditioneitol
- **EC** Células enterocromafines
- **EtOH** Etanol absoluto
- **FAA** Actividad anticipatoria al alimento
- **FEO** Oscilador sincronizable por el alimento
- **G** Guanina
- **GABA** Ácido gamma-aminobutírico
- **HIOMT** Hidroxindol-*O*-metiltransferasa

- **HPLC-ED** Cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica
- **HPLC-FD** Cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia
- **ICCs** Células intersticiales de Cajal
- **K_m** Constante de Michaelis
- **LB** Caldo Luria-Bertoni
- **LEO** Oscilador sincronizable por la luz
- **LM** Agarosa de bajo punto de fusión
- **L-NAME** L-nitroarginina metilester
- **LRM** Módulo de respuesta a la luz
- **MEL** Melatonina
- **MMC** Complejo motor mioeléctrico
- **NKA** Neurokinina A
- **NO** Óxido nítrico
- **NOS** Óxido nítrico sintetasa
- **NPY** Neuropeptido Y
- **NSQ** Núcleo supraquiasmático
- **PACAP** Polipéptido activador de adenilato ciclasa hipofisiaria
- **PCA** Ácido perclórico
- *Per* Gen *Period*
- **PKA** Proteína kinasa A
- **PLC** Fosfolipasa C
- **qRT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
- **RACE** Amplificación rápida de extremos de cDNA
- **RIA** Radioinmunoensayo
- **RT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
- **SNP** Nitroprusato sódico
- τ Período
- **TAE** Tris acetato
- **TP** Tampón fosfato
- **TPH** Triptófano hidroxilasa
- **TRH** Tracto retinohipotalámico
- **UV** Ultravioleta
- **VIP** Péptido intestinal vasoactivo
- **V_{max}** Velocidad máxima
- **ZT** Tiempo *zeitgeber*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CARPÍN DORADO (<i>Carassius auratus L.</i>).....	3
1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA (Cyprinidae).....	3
1.2. EL CARPÍN DORADO (<i>Carassius auratus</i>).....	4
1.3. EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE <i>Carassius auratus</i>	5
2. RITMOS BIOLÓGICOS.....	7
2.1. FUNDAMENTOS DE CRONOBIOLOGÍA.....	7
2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS.....	8
2.3. RITMOS CIRCADIANOS.....	9
2.4. BASE MOLECULAR DE LOS RELOJES ENDÓGENOS.....	11
2.5. ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO.....	13
2.5.1. Osciladores centrales en vertebrados.....	13
2.5.2. La retina de vertebrados y la sincronización por la luz.....	14
2.5.3. Vías de salida del oscilador sincronizable por la luz.....	15
2.5.4. Osciladores periféricos.....	16
2.5.5. Sincronización por el alimento.....	17
3. MELATONINA.....	19
3.1. BIOSÍNTESIS, METABOLISMO Y REGULACIÓN.....	19
3.1.1. Biosíntesis y degradación.....	19
3.1.2. Lugares de biosíntesis de melatonina.....	22
3.1.3. Arilalquilamina <i>N</i> -acetiltransferasa y la regulación de la síntesis de melatonina.....	23
3.2. ACCIONES DE LA MELATONINA.....	26
3.2.1. Receptores de melatonina.....	26
3.2.2. Efectos de la melatonina.....	27
3.3. MELATONINA Y TRACTO GASTROINTESTINAL.....	29

3.3.1. Funciones de la melatonina en el tracto gastrointestinal.....	30
4. MOTILIDAD INTESTINAL Y SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO.....	32
4.1. ANATOMÍA GENERAL DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.....	32
4.2. MOTILIDAD INTESTINAL.....	35
4.3. SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO.....	37
4.4. AGENTES REGULADORES DE LA MOTILIDAD INTESTINAL.....	39
4.4.1. Acetilcolina.....	40
4.4.2. Serotonina.....	41
4.4.3. Otros reguladores de la motilidad intestinal.....	43
II. OBJETIVOS.....	45
III. RESULTADOS.....	51
1. RELOJES MOLECULARES EN LOCALIZACIONES CENTRALES Y PERIFÉRICOS DEL CARPÍN, <i>Carassius auratus</i>.....	53
1.1. Resumen.....	55
1.2. Circadian clock genes of goldfish, <i>Carassius auratus</i> : cDNA cloning and rhythmic expresión of Period and Cryptochromes transcripts in retina, liver and gut.....	59
1.3. Circadian clocks in retina of goldfish.....	71
2. LAS ENZIMAS DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN LOCALIZACIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DE <i>Carassius auratus</i>.....	83
2.1. Resumen.....	85
2.2. Melatonin-synthezising enzymes in pineal, retina, liver and gut in the goldfish (<i>Carassius auratus</i>): cloning, mRNA	

expression pattern and regulation of daily rhythms by lighting conditions.....	91
2.3. Evidences of melatonin synthesis in the liver and gut of teleost: <i>in vitro</i> activity and cloning of AANAT-1.....	117
3. MELATONINA Y MOTILIDAD INTESTINAL EN EL CARPÍN (<i>Carassius auratus</i>).....	129
3.1. Resumen.....	131
3.2. Melatonin attenuates the acetylcholine-induced contraction in isolated intestine of a teleost fish.....	137
3.3. Melatonin effects on gut motility are independent of the relaxation mediated by the nitrenergic system in the goldfish.....	149
3.4. Serotonin-induced contraction in isolated intestine from a teleost fish (<i>Carassius auratus</i>): characterization and interaction with melatonin.....	159
IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	171
1. RELOJES MOLECULARES EN LOCALIZACIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DEL CARPÍN, <i>Carassius auratus</i>	173
2. LAS ENZIMAS CLAVE EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE MELATONINA EN LOCALIZACIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DE <i>Carassius auratus</i>	180
3. MELATONINA Y MOTILIDAD INTESTINAL EN EL CARPÍN (<i>Carassius auratus</i>).....	187
V. CONCLUSIONES	199
VI. ANEXOS METODOLÓGICOS.....	203
I. BAÑO DE ÓRGANOS.....	205
I.1. Principios generales del ensayo.....	205

I.2. Procedimiento.....	206
II. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA.....	211
II.1. Principios generales del ensayo.....	211
II.2. Reacción enzimática.....	212
II.3. Cuantificación cromatográfica.....	213
III. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	217
III.1. Amplificación de secuencias de ARN por retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	219
III.2. Valoración de ADN mediante detección por PCR cuantitativa.....	222
III.3. Clonación.....	224
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	231

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

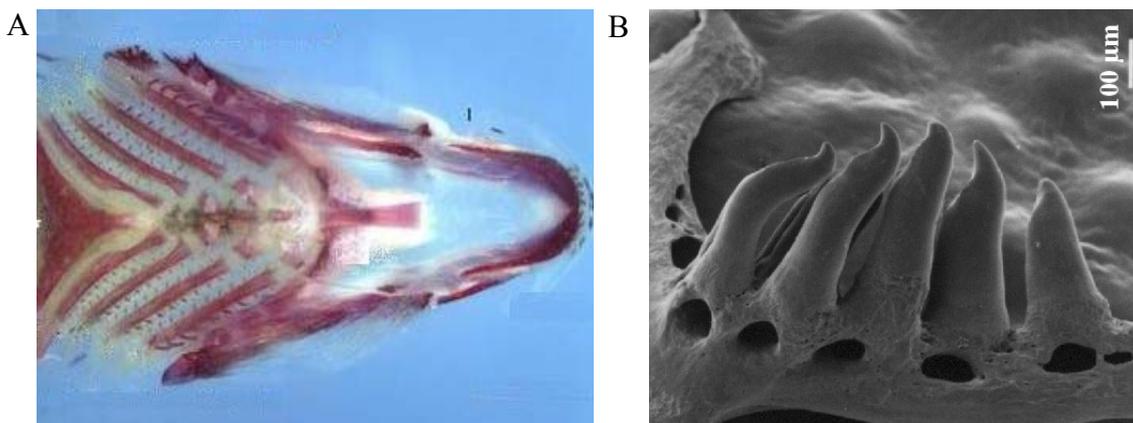
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CARPÍN DORADO

(*Carassius auratus L.*)

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA (*Cyprinidae*).

El carpín o carpa dorada es un teleósteo de agua dulce perteneciente a la Clase *Osteichthyes*, Subclase *Actinopterygii*, Infraclase *Neopterygii*, Superorden *Otophysi*, Orden *Cypriniformes*, Familia *Cyprinidae*, Subfamilia *Cyprininae*. Los ciprínidos son una familia ampliamente distribuida en el planeta a excepción de Madagascar, Australia, Nueva Zelanda y América del Sur. Se conocen más de dos mil especies pertenecientes a esta familia, con gran variedad de formas, hábitats y modos de vida (Kottelat y Freyhof, 2007).

Morfológicamente se caracterizan por tener sólo una aleta dorsal y una anal. Fundamentalmente se distinguen por sus poderosos huesos faríngeos inferiores, conocidos como dientes faríngeos, que les sirven para triturar el alimento (Fotografía 1). Los dientes faríngeos se localizan en el quinto arco branquial o arco faríngeo, y se disponen de una a tres filas, pudiendo variar el número entre ambos lados de un mismo individuo (suele haber más en el arco izquierdo). Su número, forma y distribución se utilizan como carácter distintivo entre especies y, al igual que en otras familias de peces, las piezas suelen perderse y reponerse varias veces durante la vida del animal (Wautier *et al.*, 2001; Stock, 2007).



Fotografía 1. Parte ventral de la cabeza del pez cebra (*Danio rerio*) mostrando las filas de dientes faríngeos (A) y detalle de la vista ventral de la mandíbula izquierda tomado por microscopía electrónica de barrido (B) (con permiso del grupo de la doctora Wautier en la Universidad de Gante, Bélgica).

1.2. EL CARPÍN DORADO (*Carassius auratus*).

El carpín dorado (*Carassius auratus*) es un ciprínido domesticado en China hace más de mil años e introducido en Japón en el siglo XVI, desde donde fue exportado a Europa en 1611 (Portugal), 1691 (Inglaterra) y 1765 (Francia) (Kottelat y Freyhof, 2007).

Morfológicamente presenta el cuerpo macizo, con la aleta dorsal de base amplia y sin barbillones bucales. Originalmente de color pardo amarillento o verdoso con reflejos blanco-plateados por los costados y el vientre (Fotografía 2). Los adultos suelen medir entre 10 y 20 cm, pero pueden llegar hasta unos 45 cm como máximo. Su crecimiento por lo general es rápido, aunque viene determinado por la cantidad de alimento que pueda obtener de su hábitat.



Fotografía 2. Ejemplar adulto de carpín dorado (*Carassius auratus*).

Prefiere hábitats eutróficos, de aguas poco profundas en lagunas y ríos de corriente lenta, con fondos blandos y ricos en vegetación, con temperaturas suaves o frías (de 10 °C a 21 °C). Durante el invierno permanecen casi completamente enterrados en el barro, limitando su actividad hasta la llegada de la primavera. Se adaptan con facilidad a condiciones extremas, tanto de temperatura como de oxígeno, especialmente si han sido criados bajo esas condiciones (Muus y Dahlström, 1981).

El *C. auratus* es un animal omnívoro y bentónico. Según su comportamiento alimentario se incluyen en un grupo de teleósteos que nadan constantemente, buscando y persiguiendo su comida. En su hábitat natural se alimenta fundamentalmente de organismos planctónicos (pequeños crustáceos

y moluscos), gusanos, larvas de insectos y plantas acuáticas (Muus y Dahlström, 1981). En condiciones de laboratorio, selecciona principalmente para su dieta carbohidratos, seguido de grasas y proteínas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998).

Alcanzan la madurez sexual a partir de los 8-10 meses, aunque comienzan con puestas pequeñas, que a los 3-4 años pueden alcanzar los 170.000-380.000 huevos. La freza se produce entre los meses de mayo y julio, aunque depende de la temperatura del agua.

En libertad, se pueden encontrar poblaciones equilibradas de machos y hembras, especialmente en China, y poblaciones en las que la totalidad de la población son ejemplares hembras, lo que sucede en muchas regiones de Europa. En estos casos, la reproducción se produce por ginogénesis, es decir, las hembras procrean con ejemplares machos de especies afines, como la carpa, aunque no se produce fecundación. No obstante, la entrada del espermatozoide en el óvulo desencadena la división espontánea del núcleo del óvulo, originando nuevos individuos que sólo reciben la dotación génica materna y, por tanto, son hembras (Muus y Dahlström, 1981).

Se cultivan en cautividad, principalmente como especie ornamental, siendo muy utilizados en investigación debido a su fácil manejo y mantenimiento. Además, se pueden obtener fácilmente de proveedores comerciales y muestran una rápida adaptación a las condiciones de laboratorio (Kottelat y Freyhof, 2007).

1.3. EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE *Carassius auratus*.

El tracto digestivo del carpín es una estructura tubular que comienza en la boca y termina en el ano, y se puede dividir en tres regiones, una porción anterior, que se inicia en el borde branquial posterior e incluye el esófago, un intestino anterior que se extiende hasta la apertura del conducto biliar, y una porción intestinal posterior, más larga y con numerosos giros intestinales que acaban en el ano (Figura 1) (Smith, 1980).

La parte anterior del tubo digestivo está conectada con la musculatura de la cabeza y contiene los dientes faríngeos (cuatro filas a cada lado) unidos a los huesos faríngeos posteriores (McVay y Kaan., 1940). Al igual que la mayoría de los peces, el carpín no produce enzimas digestivas en la boca o la faringe (Kapoor *et al.*, 1975).

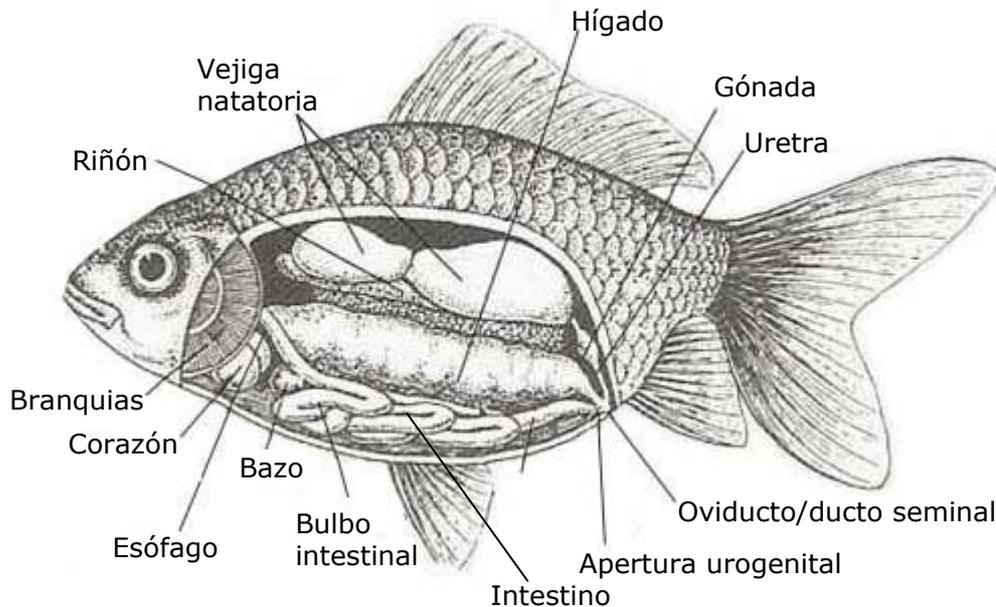


Figura 1. Representación esquemática de la organización visceral en el carpín dorado, *Carassius auratus*.

La característica más notable es la ausencia de estómago. Esófago e intestino se unen mediante el esfínter intestinal, que desemboca en el bulbo intestinal, región que no presenta diferencias histológicas con el intestino propiamente dicho, pero que se distingue tanto por su tamaño relativo mayor como por el mayor grosor de las capas mucosas, lo que permite una gran expansión. En el bulbo intestinal se produce el vertido de los productos biliares permitiendo iniciarse la digestión enzimática (McVay y Kaan, 1940).

El intestino propiamente dicho tiene un diámetro mucho menor que el bulbo intestinal y una, también menor, capacidad de distensión. Su gran longitud, característica de su tipo de alimentación, permite distribuir el alimento a lo largo de toda la superficie intestinal, maximizando los procesos de digestión y absorción. El intestino se encuentra enormemente plegado y está separado completamente de la vejiga natatoria, ocupando la porción ventral del cuerpo del animal (McVay y Kaan, 1940; Smith, 1980).

La última porción intestinal es el recto, de menor grosor que el resto del tubo y sin pliegues, abriéndose al exterior a través del ano.

2. RITMOS BIOLÓGICOS.

2.1. FUNDAMENTOS DE CRONOBIOLOGÍA.

El movimiento de rotación de la tierra sobre su eje originando los días y las noches y el movimiento de traslación alrededor del sol han supuesto una gran presión evolutiva para los organismos, que han adaptado sus procesos vitales para anticipar dichos periodos de luz y oscuridad. Así, de manera inconsciente, somos capaces de percibir el momento del día, del mes o del año a través de estímulos medioambientales (Pittendrigh, 1993; Koukkari y Sothorn, 2006).

Esta capacidad de los organismos para responder ante cambios cíclicos del medio se traduce en una serie de respuestas rítmicas, tanto comportamentales (ciclos sueño/vigilia, períodos de actividad y reposo, alimentación y excreción, percepción sensorial, aprendizaje y memoria) como fisiológicas (temperatura corporal, secreción hormonal, períodos reproductores, floración y germinación, funciones cardiovasculares y digestivas) (Refinetti, 2006).

Según la Real Academia de la Lengua Española, un ritmo es un orden acompasado en la sucesión o acaecimiento de las cosas, es decir, un cambio que se repite según un patrón. En la naturaleza se pueden encontrar numerosos fenómenos que siguen un patrón rítmico y que inducen respuestas en los individuos. Además de los mencionados ritmos de luz y oscuridad, se observan ciclos de temperatura ambiental, de fases lunares, de aparición de mareas e incluso de oscilación de las ondas electromagnéticas en el espectro visible (Koukkari y Sothorn, 2006; Refinetti, 2006). Cada uno de estos fenómenos naturales tiene una duración determinada, lo que permite realizar una clasificación de estos ritmos.

La posibilidad de medir el tiempo es algo que ha preocupado a los seres humanos desde el principio de su existencia, habiéndoles llevado a construir distintos tipos de relojes, desde los más primitivos relojes de sol hasta el primer reloj de precisión en 1756 (Madrid, 2006). De la observación del

tiempo y los procesos cíclicos presentes en el medio y los organismos nació una disciplina científica denominada Cronobiología (del griego *kronos*, tiempo, *bios*, vida y *logos*, ciencia). El término se acuñó y aceptó de forma oficial por primera vez a mediados del siglo XX, promovido fundamentalmente por Colin S. Pittendrigh y Jürgen Aschoff, considerados los padres de la Cronobiología moderna (Refinetti, 2006).

2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS.

Para poder describir los distintos ritmos biológicos, en Cronobiología se emplean una serie de parámetros definitorios y característicos de un ritmo (Figura 2), que son expresables en unidades numéricas y permiten, por tanto, cuantificar el ritmo (Koukkari y Sothorn, 2006):

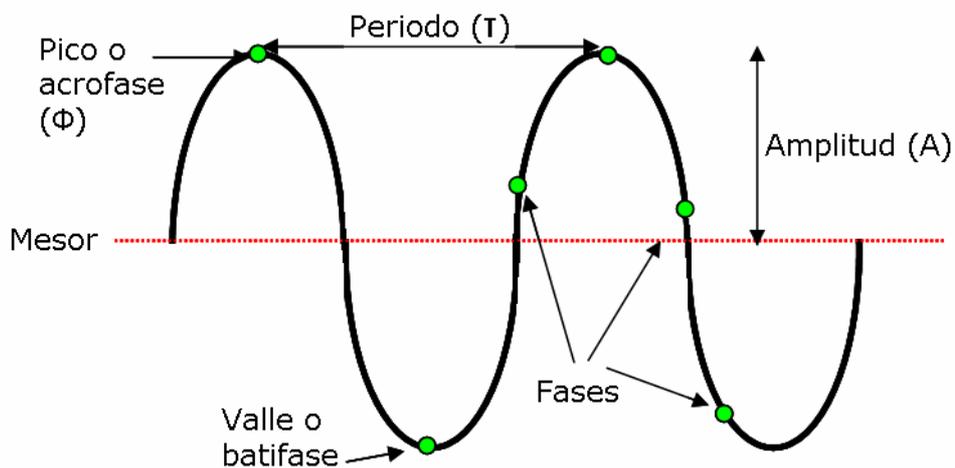


Figura 2. Representación de los parámetros rítmicos característicos sobre una onda sinusoidal.

- Periodo (τ). Representa el tiempo necesario para completar un ciclo, por lo que se expresa en unidades de tiempo. A menudo se emplea el parámetro recíproco, la frecuencia, que es el número de ciclos por unidad de tiempo ($1/\tau$). Por ejemplo, un suceso que oscile con un periodo de 15 minutos tendrá una frecuencia de cuatro ciclos por hora.
- Amplitud (A). Si el ritmo se ajusta a un perfil sinusoidal (Figura 2), se llama amplitud a la distancia entre el valor medio (mesor) y el máximo del parámetro; si el perfil no es sinusoidal, es la distancia entre el máximo y el mínimo.
- Mesor. Es el valor medio de un ritmo ajustado a una función sinusoidal.

- Fase. Es un punto de referencia temporal de un ritmo. Los más característicos serían el valor máximo, denominado pico, y el valor mínimo, o valle. Si el ritmo se ajusta a un perfil sinusoidal, al pico se le llama acrofase (Φ), y al valle batifase.

El cosinor es un método matemático de análisis de ritmos que ajusta los valores a una función sinusoidal, teniendo en cuenta el mesor, la amplitud, la frecuencia y la acrofase (Nelson *et al.*, 1979).

Los ritmos biológicos se suelen clasificar en base a la duración de su periodo (Tabla 1). Así, los ritmos con una periodicidad cercana a 24 horas se denominan circadianos (del latín *circa*, aproximadamente, y *diem*, día) (Refinetti, 2006).

Duración del período	Denominación
1 hora	Circahoral
Menos de 20 horas	Ultradiano
Entre 20-28 horas	Circadiano
Más de 28 horas	Infradiano
12.4 horas	Circamareal
7 días	Circaheptano
28 días	Circalunar
1 mes	Circamensual
Entre 10-14 meses	Circanual

Tabla 1. Ejemplos de la terminología empleada para clasificar los ritmos biológicos en función de la duración del periodo.

2.3. RITMOS CIRCADIANOS.

La existencia de ritmos circadianos se produce como respuesta adaptativa a los cambios del medio, pero no como una respuesta pasiva, sino como una anticipación a los mismos. En 1960 Pittendrigh evidenció la presencia de un reloj endógeno, que se manifiesta en ausencia de las oscilaciones ambientales de luz/oscuridad o de temperatura. En estas condiciones, se sigue observando ritmicidad en algunos procesos biológicos, pero con un periodo cercano a 24 horas que es propio de cada ritmo y de cada especie.

En general, las características fundamentales de los ritmos circadianos se podrían resumir en tres (Refinetti, 2006; Cambras Riu, 2006):

- Tienen carácter **endógeno**, es decir, persisten en el organismo en ausencia de los estímulos ambientales con un periodo cercano a 24 horas.
- Se pueden **sincronizar** a condiciones ambientales rítmicas diarias, permitiendo a los organismos experimentar adelantos o retrasos en sus ritmos endógenos para estar en fase con el medio externo.
- Tienen la capacidad de **compensar** los cambios de temperatura, es decir, que si se miden las características del ritmo bajo distintas temperaturas ambientales, los cambios del periodo serán mínimos.

El carácter endógeno de un ritmo implica la existencia de un reloj interno con un periodo característico que se mantiene invariable en condiciones denominadas de "curso libre" (*free-running*), es decir en ausencia de estímulos externos (Aschoff, 1981). Los estímulos rítmicos externos pueden actuar como sincronizadores o *zeitgebers* ("dadores de tiempo"), modificando el funcionamiento del reloj endógeno de manera que el periodo del reloj interno se iguale con el periodo del estímulo ambiental (sincronización o "encarrilamiento") (Cahill y Besharse, 1991). De la misma manera, algunos de dichos estímulos rítmicos pueden actuar directamente sobre el sistema efector, generándose un ritmo observable pero no sincronizado, lo que se denomina "enmascaramiento". El enmascaramiento se distingue del encarrilamiento en que, si se ha producido sincronización, al retirar el estímulo el ritmo continúa con la fase determinada por el *zeitgeber* (Cambras Riu, 2006). En definitiva, para poder generar un ritmo biológico son necesarios los siguientes elementos (Figura 3):

- Una entrada (*input*), que puede ser un estímulo endógeno o ambiental y que sincroniza al reloj.
- Un oscilador circadiano (*pacemaker*, marcapasos), que es un sistema capaz de generar por si mismo la oscilación.
- Una salida (*output*) en forma de ritmo observable.

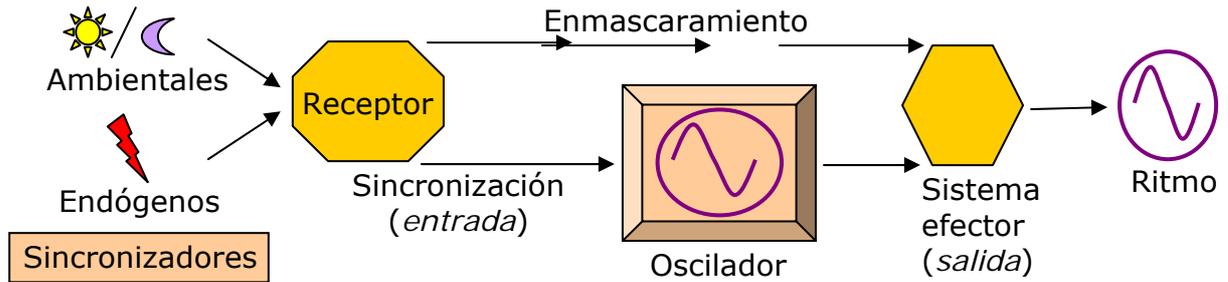


Figura 3. Esquema mostrando los elementos que intervienen en la generación y regulación general de un ritmo circadiano (modificado de Cambras Riu, 2006).

2.4. BASE MOLECULAR DE LOS RELOJES ENDÓGENOS.

El mecanismo utilizado por los relojes endógenos para generar ritmicidad está muy conservado filogenéticamente, desde organismos unicelulares hasta mamíferos, y consta de un sistema de bucles de retroalimentación entre los procesos de transcripción y transducción de los denominados genes reloj y sus productos proteicos (Panda *et al.*, 2002a).

En vertebrados, estos bucles están formados por una serie de elementos positivos y negativos (Figura 4). Los elementos positivos son factores de transcripción con un dominio básico hélice-lazo-hélice (HLH) y un dominio PAS (bHLH-PAS), siendo *Clock* y *Bmal1* los mejor conocidos. Los productos proteicos de ambos genes heterodimerizan y facilitan la expresión de los elementos negativos (genes *Period* y *Cryptochrome*), por reconocimiento de secuencias reguladoras denominadas caja E (*E-box*; CACGTG) en los promotores de dichos genes. Las proteínas PER y CRY se translocan al citoplasma donde PER se fosforila por una serie de caseína kinasas. Los complejos resultantes pasan nuevamente al núcleo, donde inhiben la transcripción mediada por CLOCK:BMAL1 y, por lo tanto, inhiben su propia expresión. Este bucle negativo genera un ritmo diario en la expresión de *Per* y *Cry*, que va acompañado por otros bucles accesorios que permiten estabilizar la duración del ciclo. De estos bucles, uno de los mejor estudiados implica a los receptores huérfanos RORA y *Rev-Erb α* , cuya transcripción también está regulada por CLOCK:BMAL1. En el promotor del gen *Bmal1* hay elementos RORE que responden a las proteínas de RORA (activadoras) y *Rev-Erb α* (inhibitorias), generando de este modo el pico de expresión de *Bmal1* durante

la noche, en antifase con el pico de expresión de los elementos negativos, *Cry* y *Per* (Iuvone *et al.*, 2005; Hastings *et al.*, 2008a).

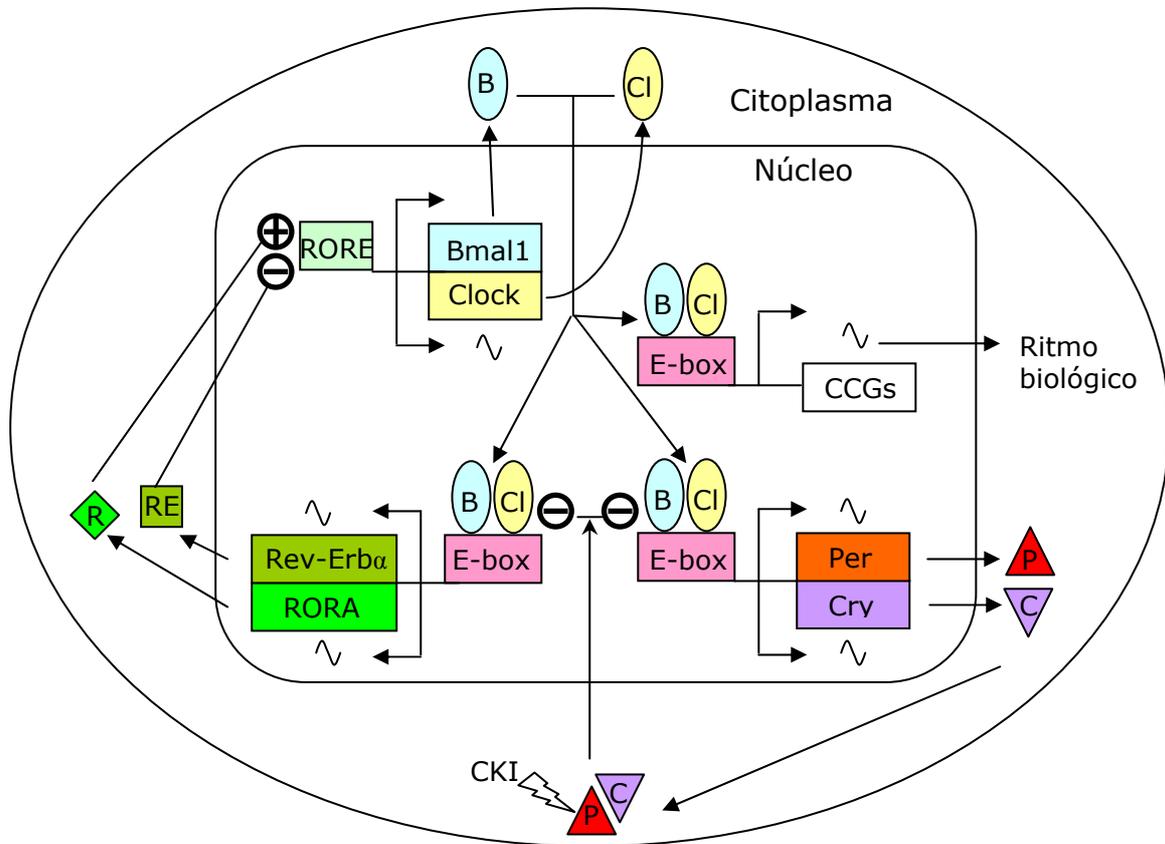


Figura 4. Funcionamiento molecular del oscilador celular de mamíferos (modificado de Iuvone *et al.*, 2005). Abreviaturas: caseína kinasa I (CKI), *clock controlled gene* (CCG), RORA (R), *Rev-Erba* (RE), *Bmal1* (B), *Clock* (Cl), *Per* (P), *Cry* (C).

Este mecanismo molecular también permite la regulación circadiana de un conjunto de genes con secuencias *E-box* o RORE en sus promotores y cuya expresión supone la salida o *output* del oscilador en forma de ritmo observable. Son los denominados genes controlados por el reloj (CCGs, del inglés *clock-controlled genes*). Entre los genes que se encuentran bajo regulación circadiana se incluyen enzimas metabólicas, canales iónicos y péptidos, como arginina-vasopresina (AVP), DBP (*D element-binding protein*) o, en algunas especies, la enzima arilalkilamina *N*-acetiltransferasa (AANAT), limitante de la síntesis de melatonina (Iuvone *et al.*, 2005; Hastings *et al.*, 2008b).

El funcionamiento del reloj molecular en los peces teleósteos se ha estudiado fundamentalmente en el pez cebra, en el que se han clonado homólogos de algunos genes reloj de mamíferos, con una diferencia principal respecto a los mamíferos, se han identificado hasta seis genes *Cryptochrome* todos ellos con expresión rítmica (Kobayashi *et al.*, 2000; Cahill, 2002).

2.5. ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO.

2.5.1. Osciladores centrales en vertebrados.

En vertebrados no mamíferos, el modelo de organización circadiana aceptado en la actualidad consta de un sistema múltiple de osciladores acoplados en el que las estructuras fundamentales serían la retina, la glándula pineal y algunos núcleos hipotalámicos con cierta equivalencia con el núcleo supraquiasmático de los mamíferos (Menaker *et al.*, 1997). La pineal es una parte del sistema nervioso central que se forma a partir de una evaginación del techo diencefálico, y constituye el principal lugar de síntesis de melatonina (Ekström y Meissl, 1997). En los peces, la pineal es un órgano fotosensible, las células que la constituyen (pinealocitos) son fotorreceptores modificados muy similares morfológicamente a los conos retinianos, y poseen todos los elementos de un oscilador: una vía de entrada, ya que captan directamente la señal ambiental de luz/oscuridad, un oscilador, ya que poseen los elementos moleculares necesarios para generar ritmicidad, y una vía de salida en forma de síntesis de melatonina (Falcón, 1999; Falcón *et al.*, 2007). No obstante, este modelo se cuestiona en algunas especies de teleósteos, como la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), que no parece tener un oscilador funcional aunque posea las vías de entrada y salida y, por tanto, la síntesis de melatonina dependería exclusivamente de un control directo del fotoperiodo (Besseau *et al.*, 2006).

En mamíferos, la glándula pineal es una estructura internalizada en la que los pinealocitos han perdido su capacidad de fotorrecepción directa (Ekström y Meissl, 2003). El reloj central de mamíferos está localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) de la zona ventral del hipotálamo, sobre el quiasma óptico y a ambos lados del tercer ventrículo (Reppert y Weaver, 2002). La mayoría de las neuronas que integran el NSQ contienen los elementos moleculares necesarios para generar oscilación rítmica, y funcionan acopladas

entre sí, aunque una vez aisladas mantienen su ritmicidad en condiciones *in vitro* (Liu *et al.*, 2007). Este acoplamiento es crucial, no sólo para la sincronización y la transmisión de las salidas del reloj, sino también para el mecanismo oscilatorio (Sumová *et al.*, 2008). El mecanismo por el que se consigue este acoplamiento no es bien conocido aún, aunque se han considerado diversas formas de sincronización intercelular, como el acoplamiento eléctrico (Aton y Herzog, 2005) o la implicación de determinados neurotransmisores, como el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) (Aton *et al.*, 2005) o el GABA (Maywood *et al.*, 2006). En mamíferos, la principal vía de entrada al NSQ procede del tracto retinohipotalámico (TRH), que lleva la información lumínica directamente desde la retina, permitiendo que el NSQ sea un oscilador sincronizable por la luz (LEO, *light entrainable oscillator*). Además, al NSQ también llegan vías no fóticas, procedentes de distintos núcleos encefálicos, con información sobre el estado fisiológico del organismo (Reppert y Weaver, 2002).

2.5.2. La retina de vertebrados y la sincronización por la luz.

La retina es un tejido que presenta una marcada ritmicidad diaria en gran cantidad de procesos incluyendo, entre otros, sensibilidad visual, expresión génica, tasa de recambio de los fotorreceptores, niveles de segundos mensajeros, neurotransmisores y actividades enzimáticas, expresión de la enzima AANAT y síntesis de melatonina (Iuvone *et al.*, 2005). En 1983 se publicó la primera evidencia definitiva de la existencia de un reloj circadiano en cultivos de retinas de *Xenopus laevis*, donde se encontró un ritmo diario de actividad AANAT (Besharse y Iuvone, 1983). Este ritmo se traduce en la liberación rítmica de melatonina controlada por un reloj localizado en los fotorreceptores (Cahill y Besharse, 1993). Este reloj se ha identificado posteriormente en las retinas de muchos otros vertebrados, incluyendo aves (Ivanova e Iuvone, 2003a) y mamíferos (Tosini y Menaker, 1996).

El ciclo de luz/oscuridad también desempeña un papel crucial en la sincronización del ritmo de síntesis de melatonina en peces (Falcón, 1999), siendo importante no sólo la presencia del fotociclo, sino también la intensidad y la longitud de onda de la luz (Bayarri *et al.*, 2002; Reeb, 2002; Oliveira *et al.*, 2007).

La sincronización de los ritmos endógenos del NSQ, la glándula pineal y la retina de mamíferos con los ciclos diarios de luz/oscuridad ha sido la más estudiada, conociéndose la importancia de pigmentos como la melanopsina (Panda *et al.*, 2002b) o neurotransmisores, como el glutamato o el PACAP, que en última instancia conducen a un aumento en los niveles intracelulares de calcio y AMPc, aumentando la expresión de genes como *Per1* y *Per2* (Ginty *et al.*, 1993; Albrecht *et al.*, 1997).

2.5.3. Vías de salida del oscilador sincronizable por la luz.

En peces, una gran variedad de ritmos biológicos están sincronizados a los ciclos de luz/oscuridad, tanto humorales (ritmos de hormonas como el cortisol o la melatonina, ritmos de glucosa), como comportamentales (ritmos de actividad locomotora, ritmos de alimentación) y fisiológicos (reproducción, desarrollo larvario, pigmentación, termorregulación) (Falcón *et al.*, 2007).

El carpín presenta distintos patrones de actividad locomotora en condiciones de luz/oscuridad (Figura 5), pudiendo mostrar ritmos diurnos, nocturnos, o bien una elevada actividad a lo largo del fotociclo (Iigo y Tabata, 1996). Este amplio espectro de actividades pone de manifiesto la gran plasticidad del sistema circadiano del carpín. Además, se ha comprobado que dicho patrón de actividad en el carpín es independiente del patrón de alimentación del animal cuando éste tiene libre acceso al alimento (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996).

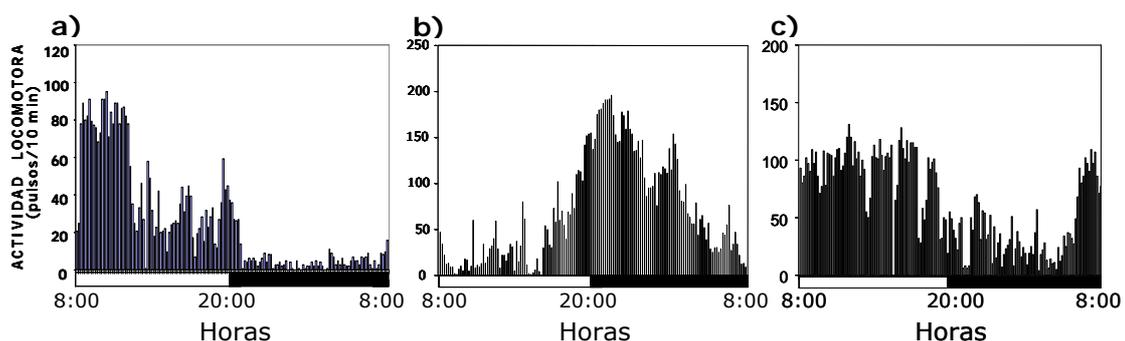


Figura 5. Registros de actividad locomotora representativos de los posibles tipos de patrones que puede presentar el carpín (*Carassius auratus*) obtenidos en nuestro laboratorio: diurnos (a), nocturnos (b) y activos durante todo el fotociclo (c) (cortesía de C. Azpeleta e Y. Vivas).

2.5.4. Osciladores periféricos.

Tras la identificación de los genes reloj, y gracias al espectacular desarrollo de las técnicas de biología molecular, en los últimos años se ha determinado que la expresión de dichos genes no se restringe al reloj central, sino que algunos tejidos periféricos también los expresan de forma rítmica. Así, se han descrito ritmos de expresión de genes reloj en tejidos periféricos de mamíferos (hígado, corazón, músculo, tejido adiposo, páncreas, riñón, pulmón, ovario) (Balsalobre, 2002; Muhlbauer *et al.*, 2004; Zvonic *et al.*, 2006; Peirson *et al.*, 2006), aves (hígado, corazón, intestino, músculo) (Chong *et al.*, 2003), reptiles (pulmón, corazón, hígado, músculo, testículo) (Della Ragione *et al.*, 2005; Vallone *et al.*, 2007) y peces (corazón, bazo y vesícula biliar) (Kaneko *et al.*, 2006).

En principio, estos relojes no se pueden sincronizar directamente a los ciclos de luz/oscuridad, excepto en organismos semitransparentes como *Drosophila* o el pez cebra (Plautz *et al.*, 1997; Pando *et al.*, 2001). En mamíferos se ha comprobado que están bajo control del reloj central mediante señales humorales, como por ejemplo los glucocorticoides (Balsalobre *et al.*, 2000). La fase de estos relojes está retrasada respecto al reloj central, aunque los relojes periféricos no parecen estar sincronizados entre sí, si no que cada uno presenta una ritmicidad propia en cada tejido (Pardini y Kaeffer, 2006).

No obstante, la perspectiva de estudio de los relojes periféricos cambió cuando Balsalobre y colaboradores demostraron, en 1998, que fibroblastos de mamífero en cultivos de larga duración recuperaban los ritmos de expresión de genes reloj tras tratar las células con un choque de suero enriquecido. Además se comprobó que en tejidos periféricos había CCGs regulados directamente por los relojes periféricos. Por ejemplo, el *Dbp* es un CCG que controla la expresión de distintas enzimas digestivas en el hígado (Lavery *et al.*, 1999). Así, los relojes periféricos funcionan igual que los centrales, aunque con algunas diferencias. En primer lugar, se ha observado que el gen *Clock* es fundamental para la generación de oscilaciones periféricas, mientras que no lo es en el NSQ, donde el gen *Npas2* compensa su ausencia (DeBruyne *et al.*, 2007). En segundo lugar, en mamíferos es necesaria la presencia de *Per1* y *Cry1* para que funcione el reloj molecular periférico, aunque no el del NSQ (Liu

et al., 2007). Además, los relojes periféricos son capaces de sincronizarse a estímulos distintos al ciclo de luz/oscuridad, como la temperatura, el ciclo reproductor o la hora de alimentación (Brown *et al.*, 2002; Mendoza, 2007; Vallone *et al.*, 2007).

2.5.5. Sincronización por el alimento.

En la naturaleza, la disponibilidad de alimento suele estar restringida a momentos del día en los que conseguir comida es más sencillo o en los que la probabilidad de ataque de un depredador es menor. Así, que el organismo sea capaz de anticipar el horario de alimentación para prepararse y optimizar la ingesta y la posterior digestión del alimento es un rasgo evolutivo importante para la supervivencia (Strubbe y Van Dijk, 2002). En el laboratorio, esta anticipación se manifiesta en la denominada actividad anticipatoria al alimento (FAA, *food anticipatory activity*), fenómeno descrito por primera vez en ratas por Richter y que consiste en un aumento de la actividad y la temperatura corporal del animal previo a la hora de alimentación (Richter, 1922). Esta FAA se ha encontrado en la mayoría de los animales sometidos a un régimen de alimentación programada (Mistlberger, 1994). En peces, el aumento en la actividad locomotora entre una y tres horas antes de la alimentación se observó por primera vez en 1963 (Davis, 1963) y ha sido confirmada en diversas especies (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001).

El estudio de esta FAA en mamíferos puso de manifiesto la existencia de un oscilador sincronizable por el alimento (FEO, *food entrainable oscillator*), capaz de coordinar parámetros fisiológicos y comportamentales con el horario diario de alimentación (Stephan, 2002; Bechtold, 2008). En la actualidad se desconoce la localización anatómica del FEO, a pesar de los numerosos estudios realizados mediante lesiones en núcleos encefálicos orientados a eliminar la FAA en ratas (Mendoza, 2007). Sólo se ha podido abolir la FAA provocando lesiones eléctricas o químicas sobre los núcleos parabraquiales de la formación reticular en mamíferos, lo que se traduce en una interrupción del relevo de la información sensorial entre sistema digestivo y cerebro (Davidson *et al.*, 2000). Esta incapacidad para definir una localización cerebral para el FEO apunta a localizaciones periféricas como lugar físico donde situar a los osciladores, o al menos como estructuras implicadas en la sincronización de los animales al alimento. Se ha comprobado que la expresión de genes reloj

en el hígado de ratas mantenidas en un fotociclo normal (12L:12D) pero con alimentación restringida es independiente del NSQ (Stokkan *et al.*, 2001). No obstante, el NSQ en roedores también es capaz de sincronizarse al horario de alimentación bajo diversas condiciones, como en ausencia del fotoperiodo (Lamont *et al.*, 2005), utilizando dietas de alta palatabilidad (Mendoza *et al.*, 2005a) o mediante dietas hipo o hipercalóricas (Mendoza *et al.*, 2008a y 2008b).

El mecanismo de sincronización del FEO aún no ha sido esclarecido. Se ha determinado la necesidad tanto de *Per2* como de *Bmal1* para la generación de la FAA (Feillet *et al.*, 2006; Fuller *et al.*, 2008), así como de otros factores, como las orexinas (Akiyama *et al.*, 2004) y el receptor de melanocortinas tipo 3 (Sutton *et al.*, 2008). De la misma manera, se ha encontrado en todos los niveles del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal de rata una elevada sincronización a la alimentación restringida, revelando un importante papel de este sistema como mediador de la sincronización del organismo al FEO (Girotti *et al.*, 2009).

En peces, ritmos sincronizados con la alimentación y la FAA se han descrito en numerosas especies (Boujard y Leatherland, 1992; Madrid *et al.*, 2001). En nuestro laboratorio hemos encontrado en el carpín patrones muy claros de FAA que se manifiestan independientemente de la fase del fotociclo en la que se suministra la alimentación, o de la ausencia de alternancia de luz y oscuridad (Figura 6). Podría decirse que, en esta especie, la FAA parece ser endógena (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997). Además, Sánchez-Vázquez y colaboradores observaron una sincronización más rápida a la alimentación en función del tamaño del alimento, sugiriendo una implicación de la distensión intestinal (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2001). Así mismo, ciertos parámetros fisiológicos como la secreción de amilasa, el contenido hipotalámico de NPY, los niveles de proteasa alcalina, la melatonina gastrointestinal (Vera *et al.*, 2007) y la absorción de carbohidratos (López-Olmeda *et al.*, 2009) pueden sincronizarse con la alimentación en los peces.

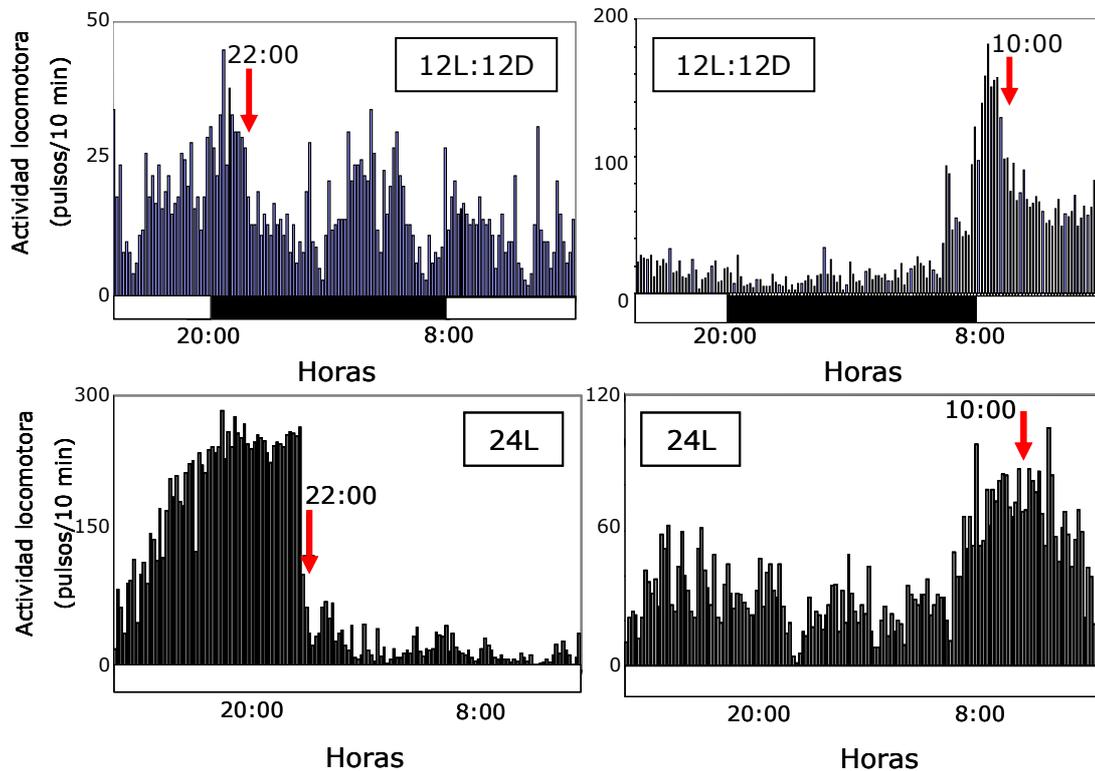


Figura 6. Registros de actividad locomotora del carpín (*Carassius auratus*) mostrando FAA en distintas condiciones de iluminación y alimentación (12L:12D cortesía de Y. Vivas; 24L de A. Feliciano, 2009). Las flechas rojas indican el momento de administración del alimento.

3. MELATONINA.

3.1. BIOSÍNTESIS, METABOLISMO Y REGULACIÓN.

3.1.1. Síntesis y degradación.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MEL, Figura 7) es una indolamina identificada por primera vez por Lerner y colaboradores (1958). Se denominó melatonina por su capacidad para agregar el pigmento en los melanóforos dérmicos de las larvas de los anfibios anuros, propiedad observada por McCord y Allen en 1917 con extractos de glándula pineal de bóvidos. Su presencia se ha demostrado en todos los vertebrados estudiados (Reiter, 1993), así como en algunos invertebrados, bacterias, protozoos

(Hardeland y Poeggeler, 2003) y plantas (Hardeland *et al.*, 2007). La MEL es una molécula muy lipófila, lo que permite su paso a través de las membranas biológicas, encontrándose MEL no sólo intracelularmente, sino también en orgánulos, incluido el núcleo (Shida *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1995).

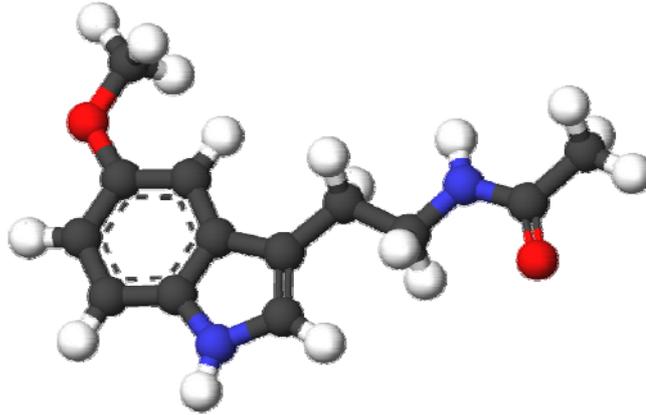


Figura 7. Estructura de la molécula de melatonina. En gris se representan los átomos de carbono, en blanco los de hidrógeno, en rojo los de oxígeno y en azul los de nitrógeno.

La MEL se sintetiza a partir del triptófano en una ruta con cuatro pasos enzimáticos (Figura 8). La triptófano hidroxilasa (TPH) cataliza la transformación de triptófano a 5-hidroxitriptófano, que es descarboxilado por la aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) para producir serotonina. La enzima arilalquilamina *N*-acetiltransferasa (AANAT) se encarga de la acetilación de la serotonina en *N*-acetilserotonina que, tras la acción de la hidroxindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT) produce MEL (Reiter, 1991). Esta ruta biosintética es común en la glándula pineal y la retina neural de todos los vertebrados estudiados (Falcón, 1999; Iuvone *et al.*, 2005).

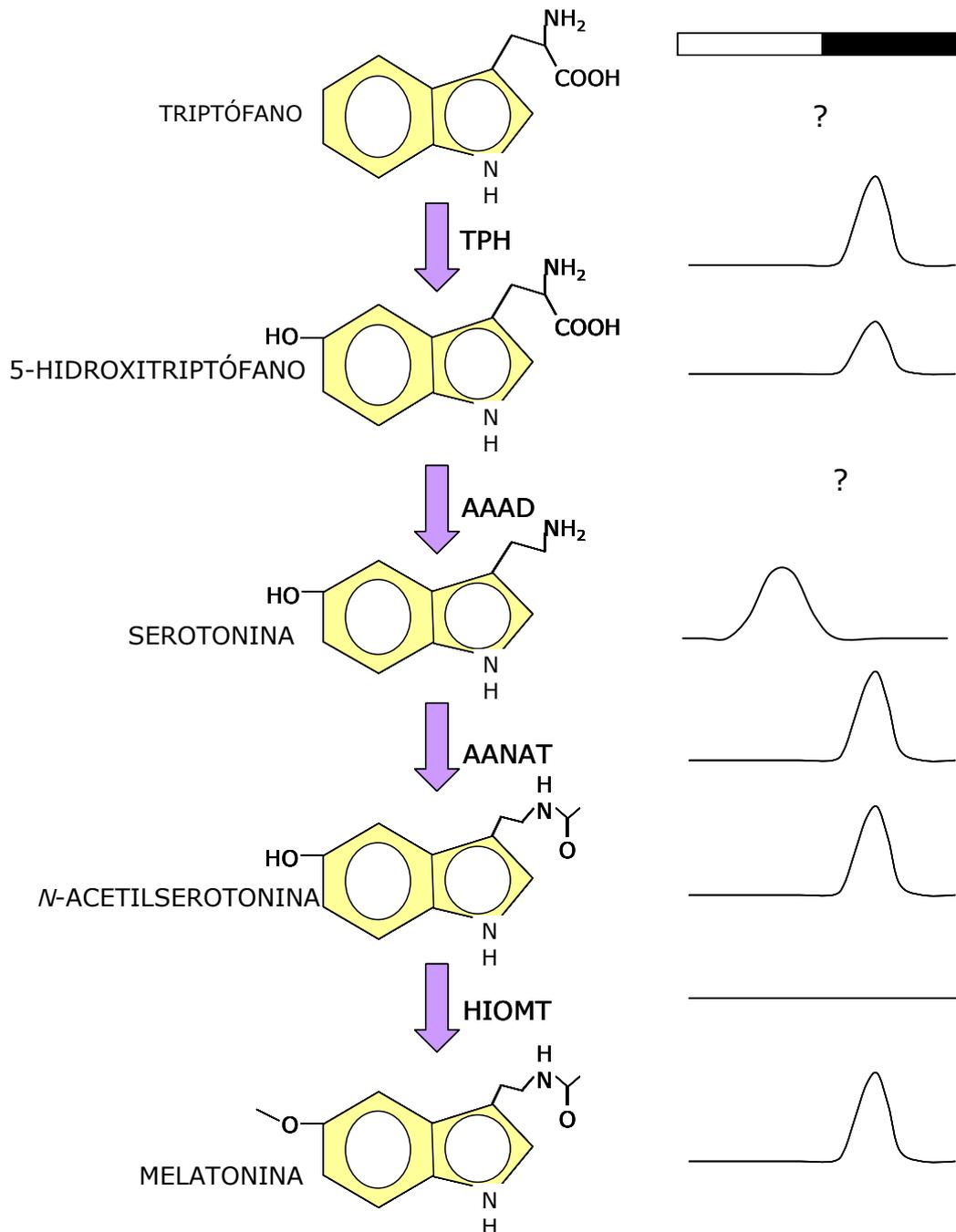


Figura 8. Ruta biosintética de melatonina. Las gráficas de la derecha muestran el perfil del ritmo diario de la actividad de las enzimas de la ruta y del contenido de los compuestos intermedios. TPH: triptófano hidroxilasa; AAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa; AANAT: arilalquilamina-*N*-acetiltransferasa; HIOMT: hidroxindol-*O*-metiltransferasa. La barra negra indica el periodo de oscuridad del fotociclo diario.

La vida media de la MEL en el plasma de los mamíferos es de sólo 20 minutos (Gibbs y Vriend, 1981), y su catabolismo presenta bastante complejidad. La hormona circulante se metaboliza mediante una vía periférica a través de la formación en el hígado de compuestos excretables por la orina,

como la 6-sulfatoximelatonina, por la acción enzimática de las citocromo P₄₅₀ monooxigenasas y sulfatotransferasas (Pandi-Perumal *et al.*, 2006). En la retina y la pineal, una desacetilasa específica transforma la MEL en 5-metoxitriptamina, que por la acción de una monoamino oxidasa se transforma en ácido 5-metoxiindolacético, que es excretable (Cahill y Besharse, 1989; Hardeland, 2008), lo que también ocurre en otros tejidos pero con enzimas no específicas (Hardeland y Poeggeler, 2007). En el cerebro, el catabolismo de la MEL contenida en el líquido cefalorraquídeo produce como principales metabolitos kinuraminas, como la AFMK (*N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxikinuramina) y la AMK (*N*¹-acetil-5-metoxikinuramina) (Hirata *et al.*, 1974; Hardeland y Poeggeler, 2007).

3.1.2 Lugares de biosíntesis de melatonina.

La síntesis y la secreción de MEL siguen un patrón rítmico diario con un pico de producción durante la noche, tanto en especies diurnas como nocturnas, e independientemente del régimen fotoperiódico al que estén sometidos los animales (Reiter, 1991; Pévet, 1998). De esta manera, la secreción rítmica de MEL lleva información circadiana a todos los órganos y tejidos, lo que ha permitido considerar a esta indolamina como una señal neuroendocrina clave en el sistema circadiano de los organismos (Falcón, 1999).

En aves y mamíferos, la MEL de origen pineal parece ser la principal responsable de los ritmos plasmáticos de la hormona (Cassone, 1990; Falcón, 1999). En algunos anfibios, la fuente principal de MEL plasmática es la retina (Delgado y Vivien-Roels, 1989; Wright *et al.*, 2006). En los peces, dependiendo de la especie, puede darse uno u otro caso. La pineal es el principal órgano secretor de MEL en plasma, siendo minoritaria la contribución de origen ocular, en especies como el carpín (Kezuka *et al.*, 1992) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Bayarri *et al.*, 2003). Sin embargo, en otras especies, como la tilapia (*Oreochromis niloticus*), o el pez gato (*Ictalurus punctatus*) el contenido de MEL plasmático se reduce de manera significativa tras enucleación ocular, sugiriendo una contribución importante de la retina en el aumento nocturno de MEL circulante (Migaud *et al.*, 2007).

No obstante, numerosos tejidos extrapineales y extraoculares de los vertebrados que carecen de estructuras fotosensibles han sido también propuestos como lugares de síntesis de MEL. Entre éstos, el más estudiado es el tracto gastrointestinal, que se tratará más extensamente en el apartado 3.3 de esta introducción. Además de la síntesis gastrointestinal, se han propuesto como tejidos productores de MEL el timo (Naranjo *et al.*, 2007), células del sistema inmune (Conti *et al.*, 2000; Carrillo-Vico *et al.*, 2004), la piel (Kobayashi *et al.*, 2005; Slominski *et al.*, 2008), y las gónadas (Tijmes *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1997).

3.1.3. Arilalkilamina *N*-acetiltransferasa y la regulación de la síntesis de melatonina.

El ritmo de MEL, tanto en la pineal como en la retina, viene determinado por la actividad rítmica de la enzima AANAT (Iuvone *et al.*, 2005; Klein, 2007). La AANAT pertenece a una familia de enzimas que utilizan el acetil coenzima A como donante de acetilo en la acetilación de grupos amino de compuestos aromáticos (Deguchi, 1992). Las AANATs se han encontrado en bacterias *Gram* positivas, hongos, algas, cefalocordados y vertebrados, pero no en plantas o insectos (Klein, 2006). No obstante, las formas más primitivas de las AANATs carecen de determinadas regiones implicadas en la unión de los ligandos y en la actividad catalítica, lo que sugiere para ellas funciones diferentes a la síntesis de MEL, como por ejemplo la detoxificación de aminas (Coon y Klein, 2006).

En vertebrados, las AANATs fueron inicialmente clonadas en mamíferos (Coon *et al.*, 1995), pero en la actualidad se conocen secuencias pertenecientes a otros grupos incluyendo aves (Bernard *et al.*, 1997), anfibios (Isorna *et al.*, 2006) y peces teleósteos (Coon *et al.*, 1999; Zilberman-Peled *et al.*, 2004; Vuilleumier *et al.*, 2007; Isorna *et al.*, 2009). Los teleósteos constituyen un caso particular en los vertebrados, ya que poseen dos familias de AANATs, la AANAT-1 y la AANAT-2, e incluso en algunas especies (percomorfos y salmónidos) pueden encontrarse dos subtipos (a y b) de la AANAT-1 (Falcón *et al.*, 2009). La existencia de estas dos familias de AANAT en teleósteos se puede justificar en base a la duplicación genómica que tuvo lugar próxima al origen del linaje teleósteo, mientras que una segunda

duplicación explicaría los dos subtipos de AANAT-1 en los grupos de teleósteos más modernos (Hoegg *et al.*, 2004; Coon y Klein, 2006).

Las dos enzimas presentes en teleósteos se diferencian en su distribución tisular. Así, la AANAT-1, más parecida a la enzima de mamíferos, es casi exclusiva de la retina, mientras que la AANAT-2 se expresa mayoritariamente en la glándula pineal (Coon *et al.*, 1999). Además de este distinto patrón de expresión, muestran diferencias notables en su cinética enzimática y preferencia de sustratos. Mientras la AANAT-2 prefiere como sustrato las indoletilaminas (especialmente la serotonina) y no muestra inhibición por sustratos o productos, la AANAT-1 acetila, además de indolaminas, otras arilalkilaminas, es más afín por sus sustratos y su actividad se ve inhibida por concentraciones elevadas de los mismos (Benyassi *et al.*, 2000; Zilberman-Peled *et al.*, 2004). En cuanto a la cinética enzimática, se ha comprobado que la actividad de la AANAT-1 ocular aumenta de forma lineal con la temperatura hasta alcanzar un máximo dependiente de la especie (Falcón *et al.*, 1996; Benyassi *et al.*, 2000; Zilberman-Peled *et al.*, 2004). Por el contrario, la temperatura óptima para la actividad de la AANAT-2 suele corresponderse con la temperatura preferida por la especie estudiada, lo que sugiere un carácter termosensor que permitiría a los niveles circulantes de MEL reflejar los cambios de temperatura ambiente, proporcionando información al organismo del momento del día, del año o de la posición en la columna de agua (Coon *et al.*, 1999; Benyassi *et al.*, 2000; Falcón *et al.*, 2009).

Estas diferencias encontradas en las dos AANATs presentes en peces pueden estar indicando diferencias funcionales específicas de tejido. Así, la AANAT-2 de la pineal estaría especializada en la producción de grandes cantidades de MEL, que tendría un papel principalmente endocrino (Falcón *et al.*, 2009). Por otro lado, la AANAT-1 de la retina contribuiría a la síntesis local de MEL pudiendo, además, estar implicada en procesos de detoxificación (Klein, 2006), o acetilando otros compuestos como dopamina (Zilberman-Peled *et al.*, 2006). Estas funciones alternativas de la AANAT-1 también se han propuesto para la AANAT de la retina de mamíferos, especialmente en primates y ungulados, en los que la HIOMT no está presente en la retina, lo que impide la síntesis de MEL intraocular (Coon *et al.*, 2002; Klein, 2006).

En la mayoría de las especies de vertebrados estudiados, la actividad AANAT de la retina y, como consecuencia, la producción de MEL se encuentran bajo un control circadiano similar al de la pineal (Iuvone *et al.*, 2005). La regulación diaria de la AANAT incluye un sistema circadiano que sincroniza la enzima a la información lumínica (Reppert y Weaver, 2002; Falcón *et al.*, 2003) y una inactivación enzimática por proteólisis que asegura la degradación de la enzima inducida por la luz (Gastel *et al.*, 1998; Falcón *et al.*, 2001). De forma general (Figura 9), el reloj celular genera un ritmo en la transcripción del gen *Aanat* mediante la interacción del dímero BMAL1:CLOCK con un elemento *E-box* presente en el promotor del gen de la enzima, produciéndose un aumento nocturno tanto del ARNm como de la actividad enzimática (Chong *et al.*, 2000; Appelbaum *et al.*, 2005).

La regulación de la síntesis de MEL presentada en la figura 9 muestra un sistema regulado directamente por el ciclo de luz/oscuridad. Este ciclo actúa de forma directa en los pinealocitos de los peces, ya que son fotorreceptores modificados con características estructurales análogas a los conos de la retina (Ekstrom y Meissl, 1997; Falcón, 1999). Así, en la pineal de vertebrados poiquilotermos y en la retina de vertebrados, en oscuridad, la despolarización de los fotorreceptores produce un flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula (Iuvone y Besharse, 1986; Bégay *et al.*, 1994), estimulando la formación de AMPc (Zatz, 1992; Ivanova e Iuvone, 2003b). La proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc actúa fosforilando a dos niveles. Por un lado, aumenta la transducción de AANAT al fosforilar factores de transcripción CRE (Baler *et al.*, 1997), y por otro fosforila la propia AANAT, permitiendo la interacción con proteínas 14-3-3 y aumentando la síntesis y liberación de MEL a la vez que se protege a la enzima de la degradación proteolítica (Ganguly *et al.*, 2001). Las proteínas 14-3-3 pertenecen a una familia de chaperonas muy conservadas en la evolución, implicadas en procesos de señalización, regulación del ciclo celular, estructura del citoesqueleto y transcripción génica (Aitken *et al.*, 2002). Durante el día, los fotorreceptores se hiperpolarizan, disminuyen el Ca^{2+} y el AMPc intracelulares y la AANAT se disocia de las proteínas 14-3-3, produciéndose la proteólisis de la enzima en proteosomas y disminuyendo la síntesis de MEL (Gastel *et al.*, 1998; Falcón *et al.*, 2001).

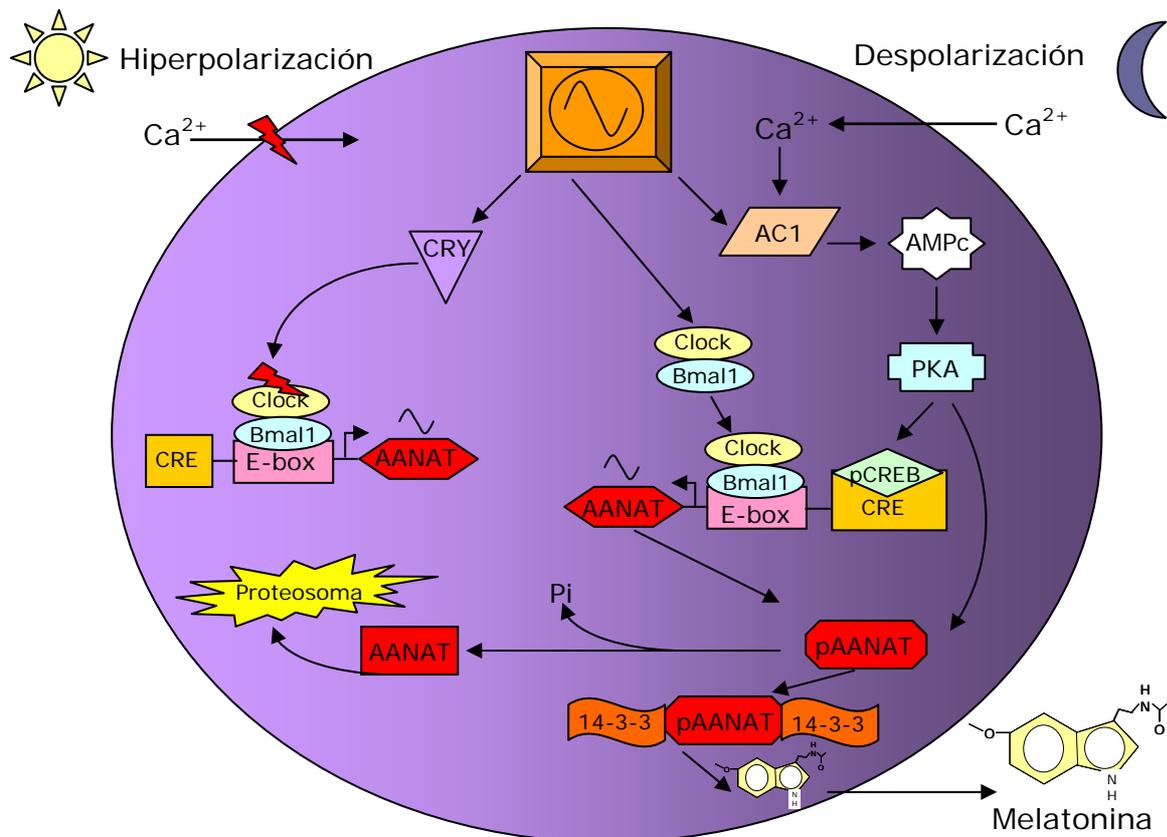


Figura 9. Representación esquemática de la síntesis de melatonina regulada por el ciclo luz/oscuridad en células fotorreceptoras. A la izquierda del esquema se representan los eventos diurnos que tienen como consecuencia la degradación proteolítica de la AANAT, y a la derecha se resumen los eventos durante la escotofase que dan lugar a la síntesis de melatonina (modificado de Iuvone *et al.*, 2005).

3.2. ACCIONES DE LA MELATONINA.

3.2.1. Receptores de melatonina.

La mayoría de las acciones llevadas a cabo por la MEL están mediadas por receptores de membrana de alta afinidad que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G conocidos como MT1, MT2 y Mel1c (característico este último de todos los vertebrados excepto mamíferos placentarios y marsupiales) (Reppert *et al.*, 1996; Pévet, 2003). En mamíferos hay un tercer sitio de unión de baja afinidad denominado MT3, caracterizado como una quinona reductasa 2, enzima citosólica implicada en procesos detoxificadores (Nosjean *et al.*, 2000; Mailliet *et al.*, 2005). Estudios

realizados fundamentalmente en estos vertebrados indican que los receptores de MEL pueden estar asociados a distintas rutas intracelulares, aunque en general su mecanismo de acción implica la disminución del AMPc o la activación de la fosfolipasa C (PLC) (Dubocovich y Markowska, 2005).

En mamíferos los receptores de MEL se distribuyen ampliamente a nivel central (Dubocovich y Markowska, 2005; Savaskan *et al.*, 2007), y también se han descrito a nivel periférico, por ejemplo en distintas regiones del tracto gastrointestinal (Poirel *et al.*, 2003; Sallinen *et al.*, 2005; Stebelová *et al.*, 2010).

En los peces se han clonado las secuencias completas de los receptores de MEL en *O. mykiss* (Gaildrat *et al.*, 2002), *Siganus guttatus* (Park *et al.*, 2006), *D. rerio* (Falcón *et al.*, 2007), *Esox lucius* (Falcón *et al.*, 2007), *D. labrax* (Sauzet *et al.*, 2008) y *Solea senegalensis* (Confente *et al.*, 2009), y las secuencias parciales de *C. auratus* (Ikegami *et al.*, 2009a y 2009b). Además, en pez cebra, trucha arcoiris, carpín y pez globo japonés se han identificado dos subtipos del receptor MT1, denominados 1.4 y 1.7 (Reppert *et al.*, 1995; Mazurais *et al.*, 1999; Ikegami *et al.*, 2009a y b). La distribución central de los receptores es más amplia que en el encéfalo de los mamíferos (Iigo *et al.*, 2003; Bayarri *et al.*, 2004; López-Patiño *et al.*, 2008), asociándose en general a las áreas relacionadas con funciones de percepción e integración visual (Bayarri *et al.*, 2004; López-Patiño *et al.*, 2008; Sauzet *et al.*, 2008). En algunas especies, incluyendo el carpín, se ha descrito la existencia de un ritmo diario en la densidad de receptores de MEL en el encéfalo (Iigo *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2006; López-Patiño *et al.*, 2008). A nivel periférico, se han encontrado sitios de unión de MEL en iris, riñón, tubo digestivo, bazo, corazón, hígado y branquias de distintas especies (Kulczykowska *et al.*, 2006; López-Patiño *et al.*, 2007), mientras que el ARNm de los receptores de MEL se ha identificado en tejidos periféricos de lubina (Sauzet *et al.*, 2008) y carpín (Ikegami *et al.*, 2009a).

3.2.2. Efectos de la melatonina.

Como se ha indicado anteriormente, la secreción rítmica de MEL es utilizada como transmisor de la información fotoperiódica, permitiendo sincronizar los cambios fisiológicos con los cambios ambientales (Reiter,

1993). Los mamíferos son los vertebrados más estudiados en este contexto, con funciones de la MEL bien caracterizadas en procesos como el ciclo sueño-vigilia, la reproducción, la hibernación, el equilibrio energético y los cambios estacionales de peso corporal (Falcón, 1999; Arendt y Skene, 2005; Hardeland, 2008).

Además de estas funciones derivadas de su papel como cronobiótico, se han descrito otras muchas acciones para la MEL, lo que se explica tanto por la amplia distribución de sus receptores a nivel central y periférico como por sus propiedades moleculares. Estas acciones son, entre otras, una alta capacidad como antioxidante endógeno (Reiter *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2007), oncostático (Ravindra *et al.*, 2006; Pandi-Perumal *et al.*, 2008) e inmunomodulador (Carrillo-Vico *et al.*, 2006).

En los peces, algunas funciones esenciales como el desarrollo, el crecimiento y la reproducción, siguen patrones dependientes del fotoperiodo y la temperatura ambientales. La importancia de la MEL en el ciclo reproductor de los peces se ha observado mediante distintas aproximaciones experimentales, sugiriendo una actuación de esta hormona en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Mayer *et al.*, 1997; Sébert *et al.*, 2008; Falcón *et al.*, 2010). Respecto al crecimiento, los peces presentan un patrón estacional de crecimiento dependiente de la duración del día (Boeuf y Le Bail, 1999) y de la alimentación (Boujard y Leatherland, 1992). La MEL también presenta un papel regulador de la alimentación en peces, y estudios realizados en varias especies de teleósteos han revelado una disminución de la ingesta en tratamientos agudos con la indolamina (Pinillos *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004; López-Olmeda *et al.*, 2006a) y una reducción del peso corporal a medio plazo (De Pedro *et al.*, 2008).

La MEL también está implicada en la modulación de algunas respuestas comportamentales en peces. La MEL induce un estado similar al sueño en larvas de pez cebra (Zhdanova, 2001). Respecto a la actividad locomotora, los efectos de la administración de MEL parecen depender del patrón diario de actividad, observándose diferencias en función de la especie. Así, en carpines con un patrón de actividad diurno se observa una disminución de la actividad tras una administración intraperitoneal de MEL (López-Olmeda *et al.*, 2006a), al igual que en lubinas con una dieta enriquecida en triptófano (Herrero *et al.*,

2007). Por otro lado, en una especie nocturna como la tenca, *Tinca tinca*, los efectos de la inyección intraperitoneal de MEL dependen del momento de su administración en el fotociclo diario (López-Olmeda *et al.*, 2006a). Además, la MEL en el carpín puede actuar como antioxidante reduciendo la peroxidación lipídica inducida por hipoxia (López-Olmeda *et al.*, 2006b), y como hormona antiestrés, disminuyendo los niveles de cortisol plasmático en un modelo de estrés agudo (Azpeleta *et al.*, 2008, 2010).

3.3. MELATONINA Y TRACTO GASTROINTESTINAL.

Aunque la MEL ha sido considerada clásicamente como una hormona sintetizada exclusivamente en estructuras fotosensoriales, en el año 1975 fue detectada por Raikhlin y colaboradores en células enterocromafines de la mucosa digestiva mediante técnicas inmunohistoquímicas. Desde entonces, varios estudios han aportado pruebas indirectas de la existencia de MEL en el tracto gastrointestinal de distintos vertebrados incluyendo mamíferos (Bubenik y Brown, 1997; Bubenik *et al.*, 1999), aves y reptiles (Bubenik y Pang, 1997), sugiriendo una posible síntesis local de esta indolamina. La presencia de MEL en el tracto gastrointestinal ha sido confirmada por distintas técnicas como el radioinmunoensayo (RIA) (Bubenik y Pang, 1997) o la cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED) (Chau y Patel, 2009) y de fluorescencia (HPLC-FL) (Muñoz *et al.*, 2009). Además, estos niveles de MEL en el intestino no se ven alterados en animales pinealectomizados (Vakkuri *et al.*, 1985; Bubenik y Brown, 1997), lo que apoyaría una posible síntesis local.

En los peces se ha detectado MEL por RIA en el tracto gastrointestinal de varias especies (*Acipenser fulvescens*, *O. mykiss* y *Cyprinus carpio*) (Bubenik y Pang, 1997). Además, en el carpín y la lubina se detectan niveles plasmáticos diurnos de MEL en ejemplares pinealectomizados y con enucleación ocular bilateral, pudiendo atribuirse a hormona de origen gastrointestinal (Kezuka *et al.*, 1992; Bayarri *et al.*, 2003).

No obstante, hay que tener en cuenta que, debido al carácter altamente lipófilo de la molécula, no toda la MEL que se encuentre en el intestino ha de tener, necesariamente, un origen local, sino que puede proceder de fuentes luminales, como el alimento (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005), los

microorganismos intestinales (Hardeland y Poeggeler, 2003), la bilis (Messner *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2009) e incluso tener origen pineal y ser captada de forma local a través de la circulación sanguínea (Bubenik, 2008).

La síntesis gastrointestinal de MEL parece factible debido a la elevada cantidad de su precursor, la serotonina (5HT), presente en el tejido (Gershon y Tack, 2007). Sin embargo, es necesaria la presencia de las enzimas responsables de la transformación de 5HT en MEL. Se identificó actividad HIOMT por primera vez en 1976 en el intestino de conejo (Quay y Ma, 1976). Desde entonces, el ARNm de la AANAT se ha encontrado en el tracto gastrointestinal de trucha (Fernández-Durán *et al.*, 2007), *Rana perezi* (Isorna *et al.*, 2006), *Coturnix coturnix* (Fu *et al.*, 2001), hámster siberiano (Gauer *et al.*, 1999) y rata (Stefulj *et al.*, 2001). No obstante, se ignora si ambas enzimas son funcionalmente activas en el intestino de estas especies, lo que proporcionaría una evidencia definitiva de la síntesis gastrointestinal de MEL.

En la actualidad se desconocen los mecanismos de síntesis y liberación de dicha MEL de origen gastrointestinal, aunque diversos estudios realizados fundamentalmente en mamíferos proporcionan evidencias del aporte de MEL al plasma procedente de dicho sistema gastrointestinal. Por ejemplo, en mamíferos con dietas suplementadas con triptófano se observan incrementos en el contenido gastrointestinal y plasmático de MEL (Huether *et al.*, 1992), pero no se observa en estudios similares realizados en lubina (Herrero *et al.*, 2007). Este aumento en la concentración plasmática de MEL no se observa en la trucha tras realizar una ligadura en la vena porta hepática (Lepage *et al.*, 2005), lo que sugeriría un origen biliar.

3.3.1. Funciones de la melatonina en el tracto gastrointestinal.

La presencia de MEL en el tracto gastrointestinal puede estar revelando una relación funcional entre la indolamina y el sistema digestivo. Algunos estudios realizados en mamíferos apuntan a la MEL como un modulador de la motilidad intestinal. A mediados de la década de los 60 se observó un antagonismo entre la administración de MEL y el efecto contráctil y peristáltico de la serotonina (Quastel y Rahamimoff, 1965). Se ha descrito que dosis bajas de MEL inyectadas intraperitonealmente favorecen el tránsito intestinal y el vaciado gástrico en la rata (Drago *et al.*, 2002), mientras que dosis altas lo

inhiben (Kasimay *et al.*, 2005). En preparaciones aisladas de músculo liso intestinal de rata, la MEL reduce la frecuencia, pero no la amplitud, de las contracciones intestinales espontáneas, y atenúa la contracción provocada por la serotonina (Bubenik, 1986; Harlow y Weekly, 1986; Reyes-Vázquez *et al.*, 1997). En estos estudios, la efectividad de las dosis bajas de MEL y el bloqueo de su actividad por antagonistas melatoninérgicos como el luzindol, ponen de manifiesto una acción de la indolamina mediada por receptores específicos situados a nivel local.

Además de su papel en la motilidad intestinal, se han descrito otros efectos de la MEL en el tracto gastrointestinal de los mamíferos. Es un modulador de la proliferación de las células de las criptas intestinales en roedores (Lewinski *et al.*, 1991). En ratas, participa en la regulación de la secreción de bicarbonato (Sjoblom y Flemstrom, 2003), ácido clorhídrico (Chan *et al.*, 1998) y colecistokinina (Leja-Szpak *et al.*, 2004a), y actúa a nivel pancreático, ya que se ha observado que ratas diabéticas pinealectomizadas sufren hiperinsulinemia y acumulación de triglicéridos (Nishida *et al.*, 2003), mientras que las tratadas con MEL disminuyen el nivel plasmático de insulina y ven favorecido el metabolismo lipídico (Nishida *et al.*, 2002). Igualmente, el tratamiento con triptófano previene la pancreatitis aguda (Leja-Szpak *et al.*, 2004b). Además, la elevada concentración de MEL hallada en la bilis de distintos mamíferos ha llevado a sugerir que puede ayudar a prevenir el daño oxidativo producido por los ácidos biliares en el epitelio intestinal (Tan *et al.*, 1999; Messner *et al.*, 2001).

A favor de estas acciones de la MEL en la funcionalidad gastrointestinal se han encontrado sitios de unión de MEL en el tracto gastrointestinal de aves (Pontoire *et al.*, 1993) y mamíferos (Lee y Pang, 1993; Poon *et al.*, 1997; Sallinen *et al.*, 2005). En el intestino de rata, quizá el modelo más estudiado, se ha investigado la distribución tanto rostro-caudal como en las distintas capas de la pared intestinal, de los receptores MT1 y MT2 (Stebelová *et al.*, 2008).

En los peces, al inicio de la presente Tesis Doctoral, no existían estudios previos sobre el posible papel de la MEL en la funcionalidad del sistema gastrointestinal. No obstante se ha demostrado un papel regulador de esta indolamina en la ingestión de alimento (Pinillos *et al.*, 2001; López-Olmeda *et*

al., 2006a) y en la regulación del peso corporal (De Pedro *et al.*, 2008) en varias especies. Hasta la fecha se desconoce el mecanismo por el que la MEL ejerce dicha acción anoréxica en los peces. Se han detectado lugares de unión a 2-[¹²⁵I]-melatonina en el intestino de *O. mykiss*, *Platichthys flesus* y *Sparus aurata* (Kulczykowska *et al.*, 2006), y con técnicas moleculares se han identificado receptores de MEL en el intestino de *D. labrax* (Sauzet *et al.*, 2008), *C. auratus* (Ikegami *et al.*, 2009a) y *Takifugu niphobles* (Ikegami *et al.*, 2009b), resultados que apoyarían acciones locales de MEL en el intestino.

4. MOTILIDAD INTESTINAL Y SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO.

4.1. ANATOMÍA GENERAL DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

El tracto gastrointestinal de la mayoría de los vertebrados se caracteriza por ser una estructura tubular que permite el transporte del alimento ingerido por diferentes regiones especializadas en tareas digestivas distintas. En general, desde el punto de vista funcional se puede dividir en cuatro regiones (Randall *et al.*, 2002):

- Tracto cefálico, donde se produce la entrada del alimento, se realiza la deglución y comienza la digestión mecánica.
- Tracto anterior, formado por el esófago, cuya función es transportar el alimento desde la zona oral hasta el estómago, y el estómago, que sirve como lugar de almacenamiento y donde comienza la digestión química en la mayoría de las especies, con la secreción de ácido clorhídrico y pepsina. No obstante, algunos grupos de peces (familias *Cyprinidae*, *Catostomidae*, *Labridae*, *Scaridae*, *Odacidae* y *Blenniidae*) carecen de estómago (Horn, 1998). En su lugar, la parte más anterior del intestino se engrosa en el denominado bulbo intestinal, que sirve para el almacenamiento, y en lugar de pepsina o ácido utilizan tripsina como enzima proteolítica más importante (McVay y Kaan, 1940; Al-Hussaini, 1949; Wallace *et al.*, 2005).
- Tracto medio, zona principal de digestión química de proteínas, grasas y carbohidratos gracias a la secreción de enzimas digestivas. Se sitúa en el intestino delgado, cuya longitud depende del tipo de dieta. En vertebrados

en general, y particularmente en peces, el intestino suele ser de menor longitud en especies carnívoras (aproximadamente equiparable a la longitud corporal), que en herbívoras o detritívoras (en los que el intestino puede alcanzar 20 veces la longitud corporal) (Horn, 1998; Randall *et al.*, 2002).

- Tracto posterior, región donde se reabsorben agua e iones y se almacenan los restos del alimento digerido hasta el momento de la defecación.

Desde un punto de vista histológico, el intestino se organiza en una serie de capas concéntricas con una disposición similar en la mayoría de vertebrados. En general, consta de dos capas musculares, una longitudinal, más externa y de menor grosor, y otra perpendicular e interior a ésta, gruesa y densamente inervada, que constituye la capa circular (Figura 10). El grosor de ambas capas varía en función de la especie y de la región intestinal (Withers, 1992; Olsson y Holmgren, 2001).

Dos plexos nerviosos se extienden en la zona muscular intestinal, el plexo mientérico o de Auerbach, situado entre ambas capas musculares, que es ganglionar, y el plexo muscular, localizado entre la región interna y externa de la capa de músculo circular y que es aganglionar y de función menos conocida (Gabella, 1974).

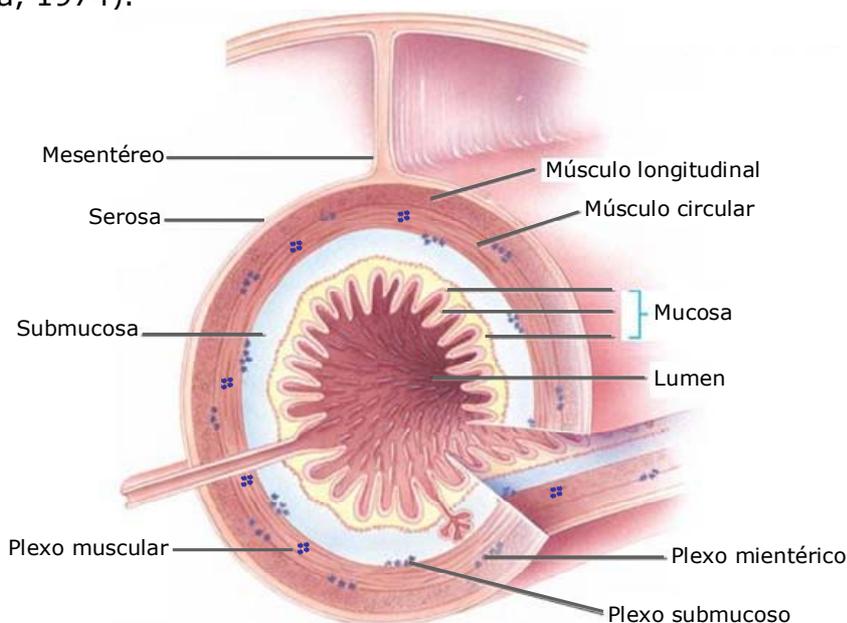


Figura 10. Sección circular del intestino de mamíferos mostrando su estructura en capas concéntricas.

Hacia la parte más interna del músculo circular se encuentra la capa submucosa, seguida de la mucosa y el epitelio de la luz o lumen intestinal. La submucosa contiene tejido conjuntivo, células secretoras y un segundo plexo ganglionar denominado submucoso o de Meissner en su parte más externa, en proximidad con la capa muscular. En ocasiones, dependiendo también de la especie y de la región intestinal, la submucosa y la mucosa están separadas entre sí por una delgada capa muscular, la *muscularis mucosae* (Figura 11). La mucosa recibe gran cantidad de inervación procedente de los plexos, además de contener células endocrinas y paracrinas implicadas en la regulación de las funciones intestinales (Withers, 1992).

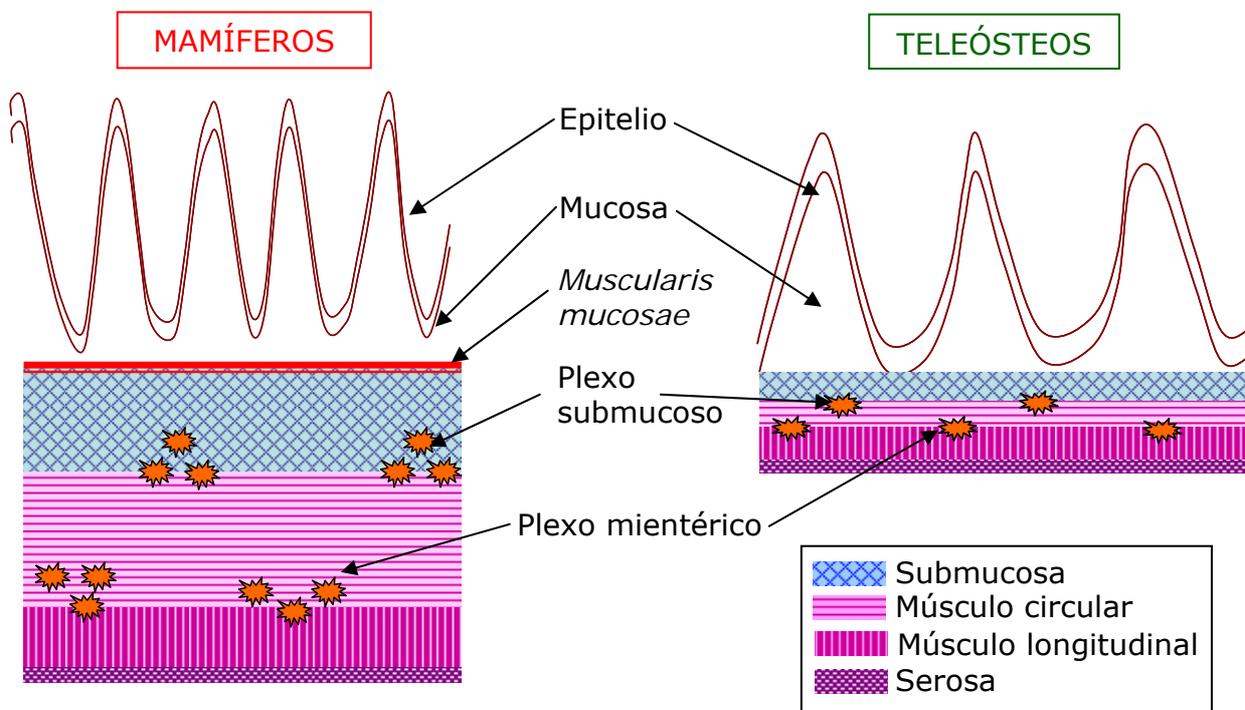


Figura 11. Representación esquemática mostrando las principales diferencias estructurales de la pared intestinal de mamíferos y teleósteos. En teleósteos están presentes todas las capas excepto la *muscularis mucosae*, aunque se aprecia el menor grosor de la pared y un menor número de plegamientos del epitelio.

A pesar de las marcadas diferencias entre especies y regiones gastrointestinales se puede considerar, en general, que las células del músculo liso son alargadas, con núcleo central, y con uniones de tipo *gap* que conectan unas con otras permitiendo su acoplamiento eléctrico (Gabella y Blundell,

1981; Nakamura *et al.*, 1998). Esta particularidad de las células musculares del intestino es una característica conservada filogenéticamente, y ha sido observada en distintos vertebrados, incluyendo los peces (Halasy *et al.*, 1988).

Situadas fundamentalmente en las capas musculares, dentro de ellas o entre la longitudinal y la circular y los plexos se encuentran las células intersticiales de Cajal (ICC, *interstitial cells of Cajal*). Son células mesenquimáticas unidas a las células musculares a través de uniones *gap*, estando ambos tipos eléctricamente acoplados (Van der Winden, 1999). Son las responsables de originar el denominado ritmo de ondas lentas, funcionando como osciladores rítmicos de la pared intestinal (Sanders *et al.*, 2006).

4.2. MOTILIDAD INTESTINAL.

Se entiende por motilidad intestinal una serie de procesos integrados que incluyen actividad mioeléctrica, actividad contráctil, tono y tránsito. En general, estos movimientos intestinales se generan y controlan de manera local a través del sistema nervioso entérico, aunque puede haber una cierta modificación producida por señales procedentes del sistema nervioso central o de otras regiones del intestino (Withers, 1992; Hansen, 2003).

La motilidad intestinal, tanto en mamíferos como en otros vertebrados, está controlada por la presencia de alimento en el tubo digestivo, por inervación autónoma y por hormonas. El intestino modifica sus patrones de motilidad por medio de reflejos cefálicos, simplemente ante la vista, el olor o la anticipación al alimento. Tras la ingesta, estímulos centrales y locales en el tubo digestivo producidos por la presencia del alimento provocan el inicio de patrones de motilidad específicos, como el reflejo de deglución, el vaciado gástrico, o la peristalsis, necesarios tanto para el tránsito del bolo alimenticio a lo largo del tracto digestivo como para la realización de la digestión mecánica. Así, la motilidad gastrointestinal se podría dividir en distintos componentes: las contracciones locales mezclan el alimento, mientras que los movimientos peristálticos lo propulsan bien de forma anterógrada (de boca a ano) o retrógrada (vómito, regurgitación). Por otra parte, los distintos esfínteres localizados a lo largo del tubo gastrointestinal permiten la

compartimentación del mismo mediante su contracción (Olsson y Holmgren, 2001).

En un estado interdigestivo, el patrón de motilidad se caracteriza por la aparición del complejo motor mioeléctrico (MMC, *myoelectric motor complex*). El MMC fue observado por primera vez por Boldyreff en el laboratorio de Pavlov a principios del siglo XX, pero el fenómeno no fue propiamente descrito hasta los experimentos realizados por Szurszewski en perros (1969). Los MMC se podrían definir como agrupaciones o complejos de contracciones que se originan juntas y migran en sentido anal. Se caracterizan por cuatro fases: fase I, de quiescencia mioeléctrica, fase II, de actividad mioeléctrica irregular, fase III, que sería el complejo migrador propiamente dicho, y fase IV, de actividad de menor intensidad (Kunze y Furness, 1999). Los MMC actúan facilitando el vaciado del tubo digestivo en los períodos interdigestivos, a la vez que regulan el crecimiento de la flora bacteriana y evitan el paso de las bacterias hacia la parte anterior del intestino delgado (Vantrappen *et al.*, 1997; Nieuwenhuijs *et al.*, 1998). En mamíferos hay diferencias en la actividad de los MMC entre carnívoros, en los que la propagación sólo se observa en el período interdigestivo, y herbívoros, en los que también se aprecia en el estado recién alimentado (Wingate, 1981). En aves no se han encontrado diferencias en función de los hábitos alimenticios, y las ondas ocurren durante ambos estados (Clench *et al.*, 1989; Mueller *et al.*, 1990). La propagación de los MMC en el intestino de los peces teleósteos apenas ha sido estudiada; no obstante en el bacalao (*Gadus morhua*) se ha descrito un patrón similar al de aves y mamíferos, aunque sin fase de quiescencia (Karila y Holmgren, 1995).

En general, cuando el organismo se encuentra en un estado de digestión activa, el patrón de motilidad intestinal se caracteriza por una actividad contráctil de carácter fásico, que sirve tanto para el mezclado (movimiento pendular o segmentado) como para la propulsión (movimientos peristálticos) del alimento (Kunze y Furness, 1999; Hansen, 2003). La máxima frecuencia y la dirección de propagación de las contracciones fásicas están reguladas por ondas lentas, que son cambios cíclicos en el potencial de membrana debidos a la activación e inactivación de bombas o canales iónicos. Estas ondas lentas suponen un tono espontáneo de contracciones con frecuencia y amplitud

variable en función de la especie, y dependiente de un tono neurogénico procedente de la inervación intestinal y de un tono miogénico característico del músculo, que posee las ya mencionadas ICC, aunque la naturaleza de esta actividad de ondas lentas no es del todo bien conocida (Rumessen y Thuneberg, 1996; Sanders *et al.*, 2006).

Los estudios de motilidad intestinal realizados hasta la fecha en peces teleósteos no habían detectado presencia de un ritmo de ondas lentas en la trucha arco iris (Johansson y Holmgren, 2003), pero sí en otras especies como el salmón chinook, *Oncorhynchus tshawytscha* (Forgan y Forster, 2007), o el pez cebra (Holmberg *et al.*, 2007). Actualmente no se tienen resultados concluyentes sobre la presencia de ICCs en el intestino de teleósteos (Holmberg *et al.*, 2007). Estudios realizados en la primera mitad del siglo XX identificaron células teñidas con azul de metileno en el intestino de varios teleósteos (Kirtisinghe, 1940). Fue en 1992 cuando Maeda y colaboradores descubrieron que era necesaria la expresión de la proteína transmembrana c-kit, receptor de tirosina kinasa, para el correcto funcionamiento de las ICC, lo que permitió el desarrollo de anticuerpos específicos para esta proteína, que permitirían identificar con mayor exactitud las poblaciones de ICC. Este anticuerpo ha sido utilizado tanto en inmunohistoquímica como en estudios de hibridación *in situ* en el intestino de larvas de pez cebra, aunque sin éxito, sugiriendo que, en peces la proteína c-kit o no es necesaria para el desarrollo de las ICCs o es muy diferente de su ortólogo en mamíferos (Mellgren y Johnson, 2005; Wallace *et al.*, 2005). No obstante, estudios posteriores sí han identificado los dos ortólogos de c-kit del pez cebra en el tracto gastrointestinal de ejemplares adultos mediante hibridación *in situ* y RT-PCR, observando además que en larvas mutadas para estas proteínas el patrón de contracciones intestinales espontáneas se ve alterado, disminuyendo su frecuencia (Rich *et al.*, 2007).

4.3. SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO.

El sistema nervioso autónomo controla funciones viscerales no conscientes, como la respiración, la circulación o la digestión. Pueden establecerse tres subdivisiones: el simpático, el parasimpático y el sistema nervioso entérico, que constituye la inervación intrínseca del tracto gastrointestinal y está

formado por los plexos ganglionares y aganglionares mencionados anteriormente (mientérico, muscular y submucoso) (Withers, 1992).

La inervación extrínseca del intestino procede fundamentalmente del par craneal X o nervio vago (hacia el estómago y el intestino anterior), de los nervios espláncnicos (hacia estómago e intestino) y del nervio pélvico (hacia el intestino posterior). En especies de peces sin estómago, como el pez cebrá, el vago inerva la totalidad del intestino (Olsson, 2009).

Las aferencias vagales son parasimpáticas en todos los vertebrados, aunque mayoritariamente son fibras sensitivas con los cuerpos neuronales situados en el ganglio nodoso, encargadas de transmitir información desde el estómago y glándulas anejas hacia el sistema nervioso central. Los nervios espláncnicos son fundamentalmente simpáticos, mientras el nervio pélvico envía aferencias tanto simpáticas como parasimpáticas. La inervación procedente del sistema simpático mediante liberación de noradrenalina actúa de forma inhibitoria (evita que se desarrollen potenciales de acción). La inervación parasimpática es excitadora (aumenta la motilidad y las secreciones gastrointestinales) gracias a la liberación de acetilcolina (Randall *et al.*, 2002). Esta inervación extrínseca tiene un papel importante en la coordinación de la actividad intestinal y en la integración de sensaciones como apetito, saciedad o estímulos dolorosos (Wood *et al.*, 1999).

El sistema nervioso entérico está constituido por neuronas cuyos somas se localizan dentro de la pared intestinal, mayoritariamente en el plexo mientérico, y puede funcionar con independencia del resto del sistema nervioso autónomo (Kunze y Furness, 1999). Generalmente, en el sistema nervioso entérico se pueden encontrar tres tipos celulares distintos, células unipolares, bipolares y multipolares, aunque en las especies de peces estudiadas (*G. morhua* y *Squalus acanthias*) predominan las bipolares (Olsson y Karila, 1995; Olsson y Holmgren, 2001). En los mamíferos, las neuronas del plexo mientérico se agrupan en microganglios, mientras que en los peces parecen estar dispersas por el plexo, lo que clásicamente ha sido interpretado como consecuencia de un menor grado de desarrollo (Kirtisinghe, 1940; Kunze y Furness, 1999). No obstante, utilizando marcadores de células nerviosas de mamíferos se pueden observar ciertos patrones de distribución en los haces de fibras que recorren el intestino de peces (Olsson, 2009). Estas neuronas

mientéricas inervan las capas musculares, actuando como motoneuronas e interneuronas, además de inervar las ICCs (Kunze y Furness, 1999; Sanders *et al.*, 2006). Las neuronas del plexo submucoso son fundamentalmente motoneuronas (Olsson y Holmgren, 2001).

4.4. AGENTES REGULADORES DE LA MOTILIDAD INTESTINAL.

La motilidad intestinal, además de por las ICCs, está controlada por el sistema nervioso autónomo y las hormonas gastrointestinales. La motilidad intestinal se modifica en función de los estímulos recibidos gracias a los reflejos entéricos (Figura 12). Los estímulos, tanto químicos como mecánicos, son captados por terminales sensitivos que activan neuronas excitadoras e inhibitoras del plexo mientérico. Así, en la totalidad del tubo se produce un reflejo que implica excitación del movimiento peristáltico en dirección oral y relajación o inhibición peristáltica en dirección anal. Este reflejo polarizado se ha descrito tanto en mamíferos como en peces (Karila y Holmgren, 1995; Kunze y Furness, 1999).

En el control de la motilidad intestinal intervienen hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores que actúan a través de receptores situados en terminales nerviosos y en células enteroendocrinas del epitelio intestinal (Hansen, 2003). Los reguladores más comunes descritos tanto en mamíferos como en peces incluyen la acetilcolina, la serotonina, la neurokinina A (NKA), la sustancia P y la colecistokinina (CCK), todos excitadores, y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), el polipéptido activador de adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP) y el óxido nítrico (NO), como inhibidores (Olsson, 2009).

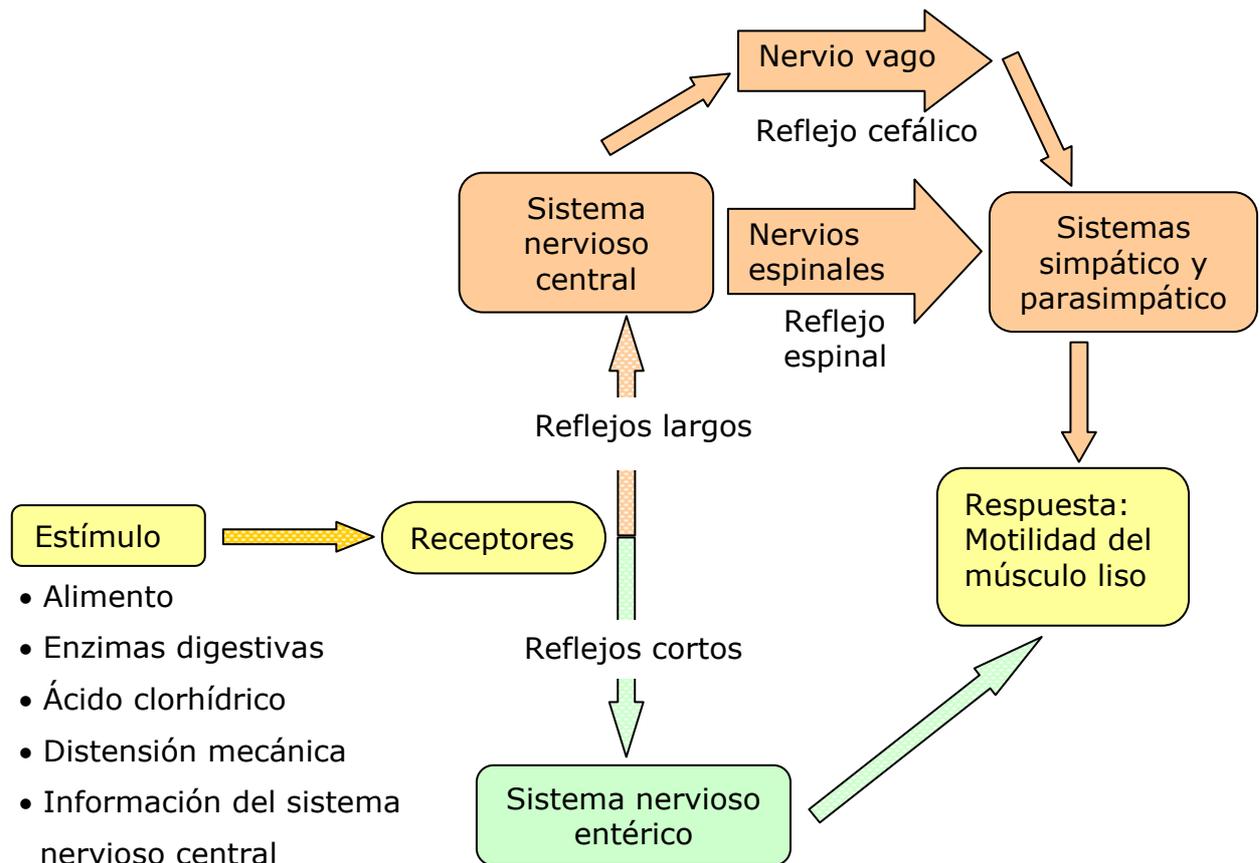


Figura 12. Diagrama esquemático de los reflejos entéricos del intestino, tanto largos (espinales y cefálicos, integrados a nivel del sistema nervioso central) como cortos (integrados a nivel local en el sistema nervioso entérico) (modificado de Olsson y Holmgren, 2001).

4.4.1. Acetilcolina.

La acetilcolina (ACh) es el principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático. Es liberada por las aferencias vagales al tracto gastrointestinal donde ejerce su acción contráctil a través de receptores muscarínicos situados en el músculo liso intestinal, o bien a través de receptores nicotínicos localizados en interneuronas de la pared intestinal (Uchiyama y Chess-Williams, 2004). En los peces, y concretamente en el carpín, se confirmó la presencia de ambos tipos de receptores colinérgicos que median dos tipos de respuesta excitatoria (neurogénica y miogénica) en estudios realizados en 1971, utilizando estímulos eléctricos en preparaciones de intestino aislado de *C. auratus* y bloqueando las repuestas con tetrodotoxina, D-tubocuramina o atropina (Ito y Kuriyama, 1971).

En los peces la respuesta contráctil producida por la ACh se ha descrito en la trucha (Burnstock, 1958), la carpa (Kitazawa et al., 1990) o el bacalao, en

el que también se han descrito fibras colinérgicas que se proyectan tanto anterior como posteriormente (Karila *et al.*, 1998).

Además de su papel como neurotransmisor estimulador de la motilidad intestinal, la ACh tiene un importante papel en la regulación del transporte de agua y sales a través del epitelio (Hubel, 1985). En los peces esta función es especialmente importante para las especies eurihalinas, como la anguila (Trishitta *et al.*, 1999), en la que se ha descrito el efecto de la ACh sobre la actividad ATPasa y la movilización de iones mediante receptores muscarínicos presentes en los enterocitos (Muscella *et al.*, 2002).

4.4.2. Serotonina.

En mamíferos, la serotonina (5HT) se sintetiza y secreta principalmente en las células enterocromafines (EC), que son células enteroendocrinas abundantes en el epitelio intestinal, y en menor medida por interneuronas entéricas (Gershon y Tack, 2007). La 5HT se libera desde las EC como respuesta a diversos estímulos luminales, como la distensión, la estimulación vagal, la ingestión de alimento, presencia de ácido o de aminoácidos en el duodeno. Esta 5HT procedente de las EC actúa de manera paracrina y participa en procesos secretores, sin alcanzar el sistema nervioso entérico debido tanto a su baja liposolubilidad como a su recaptura mediante un transportador específico (Hansen y Witte, 2008). No obstante también se han descrito proyecciones serotoninérgicas hacia la mucosa implicadas en la regulación de la motilidad (Beattie y Smith, 2008).

En la actualidad se han descrito un elevado número de subtipos de receptores para esta indolamina en mamíferos, hasta catorce tipos distintos pertenecientes a siete subfamilias (Gershon y Tack, 2007). Los subtipos implicados en las respuestas contráctiles del tracto gastrointestinal son el 5-HT_{1B} y el 5-HT_{1D} (especialmente abundantes en interneuronas del estómago), el 5-HT₂ (en los plexos, enterocitos y músculo liso), el 5-HT₃ (único subtipo que es un canal iónico, presente en las neuronas de los plexos y en las ICCs) y el 5-HT₄ (receptores presinápticos localizados en terminales colinérgicos) (Gershon y Tack, 2007; Beattie y Smith, 2008). En los peces, aunque algunos subtipos de receptores serotoninérgicos han sido identificados en diferentes

especies, en la actualidad se desconoce la localización precisa de dichos receptores en el intestino (Holmgren y Olsson, 2009).

En el intestino de peces, al contrario que en los mamíferos, las fibras serotoninérgicas son más abundantes que las células endocrinas ricas en serotonina, tal y como se ha observado en el pez cebra (Olsson *et al.*, 2008), la trucha arco iris (Caamaño-Tubío *et al.*, 2007) o el carpín (Anderson y Campbell, 1988). En algunas especies de teleósteos con gran cantidad de neuronas serotoninérgicas, como *D. rerio* o *C. auratus*, la liberación de serotonina se produce directamente por dichas neuronas, y no habría EC productoras de serotonina (como ocurre en el intestino de los ciclóstomos) (Anderson y Campbell, 1988; Olsson *et al.*, 2008), mientras que otros teleósteos (como *Zacco platypus*, *O. mykiss*, *O. mossambicus* o *G. morhua*) sí poseen una pequeña proporción de EC (Kiliaan *et al.*, 1989; Karila *et al.*, 1998; Ku *et al.*, 2004; Caamaño-Tubío *et al.*, 2007).

Respecto al efecto ejercido por la 5HT en el intestino de peces, se ha encontrado una acción estimuladora de la contracción del músculo intestinal en especies como *O. mykiss* (Burnstock, 1958), *C. auratus* (Kiliaan *et al.*, 1989), *C. carpio* (Kitazawa *et al.*, 1990) o *G. morhua* (Karila *et al.*, 1998). En estas especies se ha observado una disminución total o parcial de esta contracción serotoninérgica en presencia de atropina y tetrodotoxina, sugiriendo un papel indirecto de la serotonina en la contracción muscular. No obstante, en la tilapia la 5HT produce una relajación de la pared intestinal que no es bloqueada por tetrodotoxina, lo que indica que, en esta especie, la acción serotoninérgica se produce directamente en las fibras musculares (Kiliaan *et al.*, 1989).

4.4.3. Otros reguladores de la motilidad intestinal.

La sustancia P y la NKA forman parte de la familia de las taquikinas, y se encuentran en todas las capas de la pared intestinal, y especialmente inervando ambas capas de músculo liso. Se caracterizan por poseer en la región carboxi terminal un pentapéptido común (Phe-Xaa-Gly-Leu-Met) responsable de su acción biológica, y median motilidad, procesos secretores y respuesta inflamatoria intestinales. En mamíferos ambos péptidos colocalizan en las mismas áreas y son codificados por el mismo gen (Shimizu *et al.*,

2008). En peces se han encontrado en distintos grupos y especies, siempre actuando como excitadores, bien directamente sobre el músculo liso, o de forma indirecta vía motoneuronas colinérgicas o setoninérgicas (Kitazawa *et al.*, 1990; Jensen y Holmgren, 1991; Jensen, 1997; Karila *et al.*, 1998).

La CCK es un péptido similar a la gastrina importante en la regulación de la respuesta gastrointestinal al alimento, que produce contracción especialmente de la capa de músculo circular (Hansen, 2003). Tanto en mamíferos como en peces se ha observado que no sólo actúa como señal de saciedad (Volkoff, 2006), sino que enlentece el vaciado gástrico, regula la secreción de enzimas pancreáticas e interviene en el movimiento peristáltico (Nelson y Sheridan, 2006).

Respecto a los péptidos inhibidores, el VIP y el PACAP están estructuralmente relacionados, y en mamíferos se unen a los mismos receptores con afinidades similares (Olsson y Holmgren 2001). En peces, tanto fibras VIP/PACAP-reactivas como los receptores para estos péptidos han sido identificados en varias especies de teleósteos, como el bacalao (Olsson y Karila, 1995), la tilapia, el carpín (Kiliaan *et al.*, 1993; Chow *et al.*, 1997), el pez cebra (Wei *et al.*, 1998; Olsson *et al.*, 2008) o el pez rata, *Uranoscopus japonicus* (Matsuda *et al.*, 2000). El óxido nítrico y la enzima responsable de su síntesis, la óxido nítrico sintasa (NOS), se han identificado mediante técnicas de inmunohistoquímica o por detección de NADPH-diaforasa en el sistema nervioso entérico de todos los grupos de vertebrados (Olsson y Holmgren, 1997). En teleósteos es común que las células que contienen VIP y PACAP también expresen NOS (Olsson y Karila, 1995).

La mayoría de los estudios realizados sobre la motilidad intestinal en peces se basan en la identificación de péptidos ya encontrados en mamíferos. Actualmente, diferentes técnicas están comenzando a aplicarse en este campo, enfocadas fundamentalmente al estudio del desarrollo ontogénico de la inervación del sistema nervioso entérico y de patrones complejos de motilidad intestinal.

II. OBJETIVOS

La melatonina es una neurohormona utilizada por los vertebrados como mensajero transductor de la información ambiental, siendo una molécula clave del sistema circadiano de los vertebrados. El descubrimiento de la presencia de melatonina en el tracto gastrointestinal, no sólo de peces, sino también de mamíferos y aves, junto con la hipótesis de la síntesis local de esta indolamina, hacen del estudio de los efectos melatoninérgicos en el tracto gastrointestinal un tema de investigación de actualidad con grandes perspectivas y posibilidades. Así, en mamíferos, la melatonina ha sido asociada a diversos aspectos tanto fisiológicos como patológicos del tracto gastrointestinal. Sin embargo, estas funciones en los peces no han sido investigadas hasta la fecha.

En el ámbito de la Cronobiología, en los últimos años ha surgido un creciente interés centrado en el estudio de los ritmos sincronizables a la alimentación y la identificación de la estructura o estructuras responsables de dicho encarrilamiento. El carpín es un teleósteo clásicamente utilizado en el estudio de los ritmos biológicos en peces, y en el que se ha observado una elevada capacidad de sincronización a la hora de alimentación. No obstante, los parámetros estudiados hasta el momento en el carpín han sido de tipo comportamental o metabólico, dado que no se disponía de las herramientas necesarias para su estudio a nivel molecular.

Por otro lado, la melatonina en los peces en general y en el carpín en particular actúa como regulador de la ingesta, siendo un factor anorexigénico periférico, lo que se traduce en una reducción del peso corporal en tratamientos crónicos. En la última década, y según la FAO, la acuicultura ha visto duplicada su producción, siendo una de las principales fuentes de proteínas animales en el mercado mundial. Así, el estudio de la regulación de la ingesta en los peces se convierte en una de las piezas claves para el desarrollo de la acuicultura actual, justificándose plenamente la investigación de aquellos agentes que, como la melatonina, puedan estar implicados.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la caracterización de relojes periféricos en el carpín dorado, desde la identificación de la maquinaria molecular de los osciladores, hasta el estudio de una de las posibles vías de salida en forma de síntesis rítmica de melatonina. Para abordarlo hemos desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Búsqueda e identificación de los marcapasos moleculares en tejidos periféricos del carpín. Los ritmos de los osciladores a nivel molecular se automantienen a través de lazos de retroalimentación entre los distintos productos proteicos de los genes reloj. En el caso del carpín, no se dispone de la secuencia de ninguno de dichos genes reloj ni se conoce su expresión. Por ello, abordamos los siguientes objetivos parciales:
 - Clonación en el carpín de los genes reloj responsables del bucle de retroalimentación negativo del oscilador molecular de vertebrados.
 - Análisis de la localización en tejidos centrales y periféricos, así como de la expresión circadiana de los genes reloj clonados en el carpín.

- ❖ Caracterización de las vías de salida de los osciladores periféricos del carpín. Los relojes moleculares controlan la expresión de una serie de genes, responsables de la salida del reloj en forma de una función fisiológica rítmica. En el caso de la retina y la glándula pineal de peces, los genes más estudiados a este respecto son las enzimas de síntesis de melatonina, y particularmente la arilalquilamina *N*-acetiltransferasa. Se sabe que el carpín tiene un ritmo robusto de liberación de melatonina en la pineal y la retina, y que dicha indolamina está presente en su tracto gastrointestinal probablemente debido a una síntesis local. Sin embargo, ni la expresión ni la actividad de las enzimas responsables directas de la síntesis de melatonina han sido estudiadas aún en esta especie. Para abordar esta cuestión nos planteamos los siguientes objetivos parciales:
 - Clonación de las dos enzimas responsables de catalizar el paso de serotonina a melatonina en el carpín: la AANAT y la HIOMT.
 - Análisis de su localización en tejidos centrales y periféricos del carpín. Caracterización de la ritmicidad diaria de dichas enzimas, como evidencia de un posible control por el oscilador molecular.
 - Estudio y caracterización de la actividad enzimática NAT *in vitro*, como prueba de la capacidad de síntesis local de melatonina en tejidos del sistema digestivo.

- ❖ Estudio de la función fisiológica de la melatonina en la motilidad intestinal del carpín. Como se ha mencionado al principio, en mamíferos se han

descrito algunos efectos de la melatonina sobre el intestino, entre ellos una acción sobre la motilidad tanto sobre la actividad espontánea como sobre la contracción mediada por diferentes agentes. Con el fin de identificar esta función aún no investigada de la melatonina sobre el músculo liso intestinal en los peces desarrollamos los siguientes objetivos parciales:

- Caracterización del patrón de motilidad intestinal del carpín tanto en reposo como en respuesta a distintos agentes reguladores de la motilidad.
- Estudio farmacológico del efecto de la melatonina sobre los patrones de motilidad intestinal descritos anteriormente, tanto sobre la actividad basal como sobre la contracción inducida.
- Búsqueda del mecanismo de acción subyacente al efecto de la melatonina en el músculo liso intestinal del carpín.

III. RESULTADOS

CAPÍTULO I

RELOJES MOLECULARES EN LOCALIZACIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DEL CARPÍN, *Carassius auratus*

- *Journal of Biological Rhythms*, Vol. 24 No. 2, pp. 104-113 (2009).
- *Biological Clock in Fish*, Chapter 12, pp. 251-260 (2009), Ed. Oxford.

1.1. Resumen.

Los seres vivos poseemos relojes endógenos capaces de sincronizar las funciones biológicas con el ciclo diario de luz/oscuridad, permitiendo a los organismos, de este modo, anticipar cambios cíclicos tanto en su medio interno como en su entorno exterior. Esta generación de ritmicidad es consecuencia de la actividad de los denominados “relojes maestros”, cuya localización en el caso de los peces se ha descrito en la actualidad en la glándula pineal y en la retina (Falcón, 1999).

Las oscilaciones endógenas de los relojes biológicos se consiguen gracias a un mecanismo muy conservado mediante lazos de transcripción-transducción de los denominados genes reloj (Panda *et al.*, 2002). Estos lazos incluyen elementos positivos (proteínas CLOCK y BMAL1) y negativos (proteínas PERIOD y CRYPTOCHROME) (Okamura *et al.*, 2002). No obstante, en los últimos años se ha identificado el ARNm de estos genes en localizaciones distintas a las clásicamente consideradas como “relojes maestros”, incluyendo tejidos periféricos. Además, existe una ritmicidad diaria del transcrito que puede sincronizarse a estímulos diferentes del ciclo de luz/oscuridad, como la temperatura, el ciclo reproductor, o el horario de alimentación (Brown *et al.*, 2002; Vallote *et al.*, 2007; Mendoza *et al.*, 2007).

El carpín dorado es una especie con un robusto sistema circadiano y una desarrollada capacidad de sincronización al horario de alimentación (Aranda *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2007), aunque no existen datos disponibles sobre la existencia y expresión de genes reloj en esta especie. Con objeto de investigar la base molecular del sistema circadiano del carpín diseñamos el presente estudio con el objetivo concreto de identificar y caracterizar el perfil rítmico de los elementos principales que constituyen el reloj molecular de esta especie (los genes *Period* y *Cryptochrome*). Para ello, en primer lugar clonamos dichos genes, realizamos un estudio de su distribución, y posteriormente analizamos su expresión diaria en tejidos centrales y periféricos.

Para la clonación de los transcritos de los genes *Per1a*, *Cry1a*, *Cry2a* y *Cry3* diseñamos cebadores específicos para las secuencias homólogas del pez cebra, *Danio rerio*, y cebadores degenerados a partir de las secuencias de varias especies disponibles en las bases de datos para los transcritos *Per2a* y *Per3*. Los productos de PCR obtenidos a partir de cDNA procedente de cerebro y

retina de carpín fueron ligados en vectores pGemT (Promega), y posteriormente transformados en bacterias *Escherichia coli* JM101. Los clones positivos fueron secuenciados por *Agencourt Bioscience Corporation* con cebadores específicos del vector (T7 y SP6). Comparando las secuencias obtenidas en nuestro estudio con las homólogas del pez cebra, se observa alrededor de un 80-90% de identidad. Teniendo en cuenta que los genes *Per* y *Cry* (especialmente *Cry1a* y *Cry2a*) del pez cebra son homólogos de los correspondientes genes de mamíferos, estos resultados apoyan la funcionalidad de estos genes en el reloj molecular del carpín.

Estas secuencias se utilizaron para diseñar cebadores específicos, y para caracterizar el patrón de distribución de su expresión en cerebro, retina, hígado, intestino y corazón. La señal positiva obtenida para todos los genes investigados en los tejidos estudiados revela la existencia de osciladores moleculares en todos los tejidos mencionados.

Para investigar la posible ritmicidad diaria en la expresión de estos transcritos, utilizamos muestras de retina, hígado e intestino recogidas cada 6 horas durante un ciclo completo de 24 horas procedentes de carpines mantenidos bajo un fotoperiodo 12L:12D (inicio del periodo luminoso a las 8:00 h) y alimentados una vez al día en ZT2. Tras obtener el cDNA de estas muestras, cuantificamos los cambios en la expresión mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Todos los transcritos analizados en la retina muestran expresión rítmica diaria significativa, confirmada tanto por el análisis de la varianza como por el análisis cosinor. En los tejidos periféricos (hígado e intestino), tan sólo *Per2a*, *Per3*, *Cry2a* y *Cry3* presentan oscilaciones diarias en su expresión. Además, el análisis cosinor de la expresión rítmica de estos genes en hígado e intestino demuestra que la amplitud y la fase de las oscilaciones en estos tejidos son distintas respecto a los valores correspondientes en la retina. Así, la acrofase de *Per3* en la retina del carpín ocurre al principio del ciclo, en ZT0, mientras que en ambos tejidos periféricos se sitúa en torno a la mitad de la escotofase (ZT19). Del mismo modo, la acrofase de *Cry2a* ocurre en la mitad del fotociclo (ZT12) en la retina, pero durante la fase luminosa en hígado e intestino (ZT6). No obstante, el máximo de expresión de *Cry3* coincide en retina e intestino (ZT18), pero se adelanta en el hígado (ZT13). Estos resultados permiten

sugerir que estímulos diferentes al ciclo de luz/oscuridad, como por ejemplo el horario de alimentación, pueden contribuir a la sincronización de los osciladores hepáticos e intestinales en el carpín. Además, los resultados obtenidos de expresión de genes reloj en tejidos periféricos, junto con la capacidad del carpín de presentar actividad anticipatoria al alimento (FAA) durante el ciclo de luz/oscuridad y con alimentación restringida (Aranda *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2007) justifican el uso de este teleósteo como modelo idóneo para el estudio de la funcionalidad de los osciladores sincronizables por la alimentación en peces.

1.2. Genes reloj en el carpín, *Carassius auratus*: clonación y expresión de transcritos de cDNA de *Period* y *Cryptochrome* en retina, hígado e intestino.

Journal of Biological Rhythms, Vol. 24 No. 2, pp. 104-113 (2009).

Los genes reloj constituyen la base molecular de los relojes biológicos de los vertebrados. Se expresan no sólo en aquellos tejidos considerados osciladores centrales, sino también en tejidos periféricos. En el presente estudio se clonaron los cDNA parciales correspondientes a seis de los principales genes reloj (*Period 1a, 2a y 3* y *Cryptochrome 1a, 2a y 3*) del carpín (*Carassius auratus*). Estos genes mostraron una elevada homología (aproximadamente el 90%) respecto a las respectivas secuencias del pez cebra (*Danio rerio*), único teleósteo en el que, hasta esta fecha, se habían clonado sus genes reloj. El patrón de expresión diaria de cada gen en retina, hígado e intestino del carpín se cuantificó utilizando qRT-PCR a tiempo real y análisis cosinor. Todos los genes reloj analizados en la retina mostraron ritmicidad circadiana; sin embargo, sólo *Per2a y 3* y *Cry2a y 3* fueron rítmicos en el intestino e hígado del carpín. La amplitud y la fase de los ritmos de expresión en hígado e intestino fueron diferentes respecto a los encontrados en retina. Estas diferencias sugieren que estímulos distintos al ciclo luz-oscuridad, como el horario de alimentación, pueden estar contribuyendo a la sincronización de los osciladores en el hígado y el intestino del carpín. Nuestros resultados apoyan la utilización del carpín como modelo de teleósteo válido para el estudio de la localización y el funcionamiento de los osciladores circadianos en peces.

1.3. Relojes circadianos en la retina del carpín.

En: Biological Clock in Fish, Chapter 12, pp. 251-260 (2009), Ed. Oxford.

La retina de la mayoría de los vertebrados contiene relojes circadianos que permiten la anticipación fisiológica de los cambios diarios en la intensidad de luz, consecuencia del ciclo solar día-noche. Estos relojes regulan la adaptación a la luz y la oscuridad, el recambio de los segmentos externos de los fotorreceptores, la expresión génica, el metabolismo, y la liberación de neurotransmisores. El carpín (*Carassius auratus*) constituye un modelo extremadamente útil para el estudio de los mecanismos circadianos de adaptación a los ciclos de luz/oscuridad. No obstante, hasta fechas recientes las moléculas del reloj responsables de la generación de dichos ritmos circadianos en la retina del carpín no habían sido estudiadas. En este capítulo hemos revisado los estudios existentes hasta la fecha en relación con la regulación circadiana de aspectos básicos fisiológicos y bioquímicos en la retina, así como los conocimientos actuales relativos a la clonación y expresión circadiana de genes reloj en la retina del carpín con un enfoque comparado con otras especies de vertebrados.

CAPÍTULO II

LAS ENZIMAS DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN LOCALIZACIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DE *Carassius auratus*

- *Chronobiol. Int. Vol. 6 (2010) Aceptada.*
- *J. Pineal Res. Enviada.*

2.1. Resumen.

La melatonina (MEL) se sintetiza a partir de la serotonina en dos pasos, el primero catalizado por la AANAT (arilalquilamina *N*-acetiltransferasa), que acetila la serotonina para dar *N*-acetilserotonina, y el segundo por la HIOMT (hidroxiindol-*O*-metiltransferasa), que transforma el producto de la AANAT en MEL. La AANAT está regulada directamente por el reloj molecular, lo que permite la síntesis y liberación rítmica de MEL (Klein, 2007), mientras que la actividad HIOMT apenas presenta variaciones diarias (Ribelayga *et al.*, 2000). En los peces teleósteos, debido a un proceso de duplicación genómica, existen, al menos, dos AANATs codificadas por dos genes distintos: *Aanat-1*, característico de la retina, y *Aanat-2*, más específico de la glándula pineal (Coon *et al.*, 1999).

Desde que la MEL se detectó en el tracto gastrointestinal de los vertebrados, incluyendo a los peces, se ha propuesto el sistema digestivo como un lugar de síntesis periférica de esta hormona (Bubenik, 2008), lo cual parece factible debido a la elevada concentración del precursor, serotonina, presente en este tejido (Gershon y Tack, 2007). El RNA mensajero de las enzimas responsables de la transformación de la serotonina en MEL se ha encontrado en distintas especies de vertebrados. No obstante, no existen estudios ni sobre su posible regulación circadiana ni hay evidencias directas de la actividad enzimática catalizada por dichas enzimas en los tejidos digestivos, quedando aún abierto el debate sobre si la MEL encontrada en el tracto gastrointestinal de vertebrados tiene un origen local o procede de fuentes lumbinales o plasmáticas.

Por otro lado, otra subfamilia de enzimas *N*-acetiltransferasas, las aril *N*-acetiltransferasas (ANATs), presentes en el hígado y el intestino de los vertebrados, donde desempeñan un papel importante como detoxificantes (Sim *et al.*, 2008), pueden en determinadas circunstancias igualmente catalizar la acetilación de aminas aromáticas *in vitro*, introduciendo una complejidad adicional a la demostración de la biosíntesis de MEL en estas localizaciones.

Así, los objetivos del presente capítulo son, por un lado, identificar dos de las enzimas clave en la síntesis de MEL, la AANAT y la HIOMT, en los tejidos digestivos del carpín e investigar si podrían estar funcionando como genes

controlados por los osciladores periféricos del hígado e intestino. Además, nos propusimos por otro lado, estudiar si dichos tejidos, hígado e intestino, presentan AANAT funcionalmente activa en ensayos *in vitro*, como evidencia de su capacidad de síntesis de MEL *in vivo*.

Para realizar el primer objetivo, clonamos secuencias de cDNA parciales de AANAT-2 e HIOMT del carpín, y a partir de ellas obtuvimos las secuencias completas de ambas enzimas por el método RACE. El alineamiento de la secuencia de proteína de la AANAT-2 con otras secuencias pertenecientes a otras especies de peces reveló una identidad del 85-95% con otras AANAT-2, y del 70% con otras AANAT-1, confirmando el presente resultado como la *gAANAT-2*. De la misma forma, la secuencia *gHIOMT* presentó una elevada identidad con las otras secuencias disponibles en las bases de datos. Respecto a la HIOMT, observamos además que dichas secuencias disponibles se agrupaban en dos ramas diferenciadas, las HIOMT-1 y las HIOMT-2, lo que nos permite proponer, por primera vez en vertebrados, que la duplicación genómica que tuvo lugar en el teleosteo ancestral también afectó al gen de la HIOMT, y que la secuencia del carpín clonada por nosotros corresponde a la *gHIOMT-2*.

La realización de un patrón de expresión de *gAanat-2* en distintos órganos del carpín confirmó su presencia mayoritaria en la glándula pineal, aunque también detectamos señal positiva en hipófisis, retina, corazón, hígado, intestino anterior y posterior, vesícula biliar, riñón y gónada. Del mismo modo, detectamos la *gHiomt-2* principalmente en retina y pineal, apareciendo también, pero con una señal menor, en órganos periféricos como el hígado, la gónada, el intestino anterior y posterior y el corazón. La demostración de la presencia de ambas enzimas en el tracto digestivo del carpín es un resultado que apoya la existencia de una síntesis local de MEL en estos tejidos.

Posteriormente, diseñamos cebadores específicos para ambas secuencias del carpín, con la finalidad de analizar mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR) los ritmos diarios de expresión de dichas enzimas bajo diferentes condiciones de iluminación. Así, mantuvimos cuatro grupos de carpines durante 30 días bajo cuatro condiciones distintas de iluminación diaria, un fotoperiodo normal (12L:12D), un fotoperiodo invertido (12D:12L), luz constante (24L) y oscuridad constante (24D). Analizamos los ritmos diarios de expresión de

estas enzimas tanto en órganos centrales (pineal, retina neural) como periféricos (hígado, intestino anterior e intestino posterior).

Cuantificamos la expresión de *gHiomt-2* sólo en el grupo del fotoperiodo normal, obteniendo niveles de expresión más elevados en el caso de la pineal y el intestino posterior. El análisis cosinor confirmó la presencia de ritmos significativos en pineal, hígado e intestino posterior, siendo los presentes los primeros datos en vertebrados sobre ritmos del mensajero de esta enzima, HIOMT-2, en tejidos periféricos.

La *gAanat-2* presentó ritmos de expresión diarios a lo largo del ciclo de luz/oscuridad tanto en tejidos centrales como periféricos. El análisis cosinor reveló que el mesor y la amplitud de estos ritmos de expresión se ven atenuados en condiciones de iluminación constantes en pineal, retina e hígado, aunque no en el intestino posterior. La expresión rítmica diaria del transcrito de AANAT-2 en hígado e intestino del carpín podría ser una consecuencia directa del funcionamiento de los osciladores periféricos localizados en dichos tejidos y estudiados en el apartado 1.2 de los resultados de esta Memoria. De este modo, al igual que ocurre en la glándula pineal y en la retina, la *gAanat-2* sería un gen controlado por el reloj, pero que en los tejidos periféricos la sincronización podría deberse a estímulos no fóticos, como la alimentación.

Para el segundo objetivo del presente capítulo, nos planteamos la importancia de demostrar una actividad funcional de la enzima AANAT en hígado e intestino del carpín, cuya presencia y ritmicidad diaria en dichos tejidos se hizo evidente a partir de los estudios moleculares. Para ello, utilizamos una reacción enzimática *in vitro* siguiendo un método modificado de Alonso-Gómez y colaboradores (1992), consistente en la incubación de homogeneizados procedentes de retina, hígado e intestino de carpín con un sustrato, la triptamina, y el cofactor de la reacción, el acetil coenzima A. La cantidad de producto formado en la reacción se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FD).

Detectamos actividad NAT en los tejidos periféricos, más elevada que en la retina, y caracterizamos la cinética enzimática de la reacción tanto para el sustrato como para el cofactor. El hígado y el intestino mostraron una capacidad de acetilación algo superior que la retina, aunque del mismo orden

de magnitud, además de presentar una inhibición por exceso de sustrato en los tres órganos. Por otro lado, los resultados de la cinética enzimática para la triptamina nos permitieron establecer dos concentraciones de la misma, una elevada (2 mM) y otra baja (50 μ M) para estudiar el comportamiento de la enzima frente a otros dos sustratos, serotonina y 5-metoxitriptamina. Al utilizar la concentración de 50 μ M pudimos comparar la afinidad relativa respecto a los tres sustratos en cada tejido, resultando que el hígado muestra una menor afinidad por la triptamina y la 5-metoxitriptamina comparado con la retina y el intestino. En cambio la afinidad relativa por el sustrato endógeno, la serotonina, es similar en los tres tejidos. De forma similar, con la concentración de 2 mM se comparó el máximo de actividad enzimática (cercana a la V_{max}) en cada tejido respecto a la obtenida con la triptamina, resultando en los tres tejidos una actividad máxima con 5-metoxitriptamina y serotonina del mismo orden de magnitud que la obtenida con triptamina.

Realizamos el estudio de las posibles variaciones de actividad enzimática día/noche, y en el caso del intestino además estudiamos posibles diferencias en la actividad entre distintas regiones del digestivo. Como se esperaba, en la retina la actividad fue mayor durante la noche, presentando el hígado un resultado similar. Sin embargo, este patrón no se observó en el intestino, donde encontramos mayor actividad durante la fotofase y particularmente localizada en la parte posterior del mismo.

Con el fin de discriminar si el producto acetilado que cuantificamos procedía de una reacción catalizada por una ANAT o por la AANAT, utilizamos dos herramientas, un inhibidor de la actividad ANAT (ácido fólico), y un sustrato específico (fenetidina) como competidores enzimáticos de la triptamina. En ninguno de los dos casos se modificó la cantidad de producto formado, permitiendo concluir que en nuestro protocolo de acetilación de triptamina *in vitro* en retina, hígado e intestino del carpín, la reacción está catalizada por una AANAT.

A partir de los resultados obtenidos con la cinética enzimática, encontramos dos evidencias para discernir el subtipo de AANAT responsable de la acetilación de triptamina *in vitro* en el carpín. Por un lado, los tres órganos presentaron afinidad por los tres sustratos utilizados, y por otro lado en los tres órganos ocurrió inhibición de la actividad enzimática con elevadas

concentraciones de sustrato (a partir de 1 mM). Ambas características son propias de la isoenzima AANAT-1 (Coon *et al.*, 1999; Zilberman-Peled *et al.*, 2004). No obstante, para corroborar la presencia de actividad enzimática atribuible a la isoforma AANAT-1 en tejidos periféricos del carpín, utilizamos un sustrato específico de la AANAT-1 (tiramina) como ligando que compita con la triptamina en su unión a la enzima. Encontramos una disminución significativa del producto formado en los tres órganos, siendo más marcada en la retina, donde prácticamente desaparece, seguida del intestino. En el caso del hígado, la actividad sólo se vio reducida al 50%. Por lo tanto, al menos el 50% de la actividad AANAT en el hígado, y el 80% en el intestino posterior del carpín pueden atribuirse a la AANAT-1, pudiendo deberse la actividad restante a la AANAT-2, cuya presencia en estas localizaciones ya se ha comentado en el estudio anterior.

Con el fin de verificar que la actividad AANAT-1 encontrada en esta aproximación funcional se correspondía con la presencia del mensajero de la enzima, realizamos la clonación parcial de la isoenzima 1 en este teleósteo. Se obtuvo una secuencia de 273 bp, con una identidad de entre 85-80% con otras AANAT-1 y del 75-70% con otras AANAT-2, confirmando el transcrito como *gAanat-1*. En una PCR a 30 ciclos, encontramos señal positiva de *gAANAT-1* en retina, hígado, intestino posterior y riñón, el intestino anterior presentó una señal débil, mientras que la pineal y la gónada no mostraron señal. Este patrón de expresión molecular confirma los resultados obtenidos en los ensayos de actividad enzimática *in vitro*.

Por lo tanto, este estudio demuestra, por primera vez en un vertebrado, la presencia de actividad enzimática AANAT *in vitro* en tejidos digestivos, y aporta evidencias tanto moleculares como farmacológicas que nos permiten atribuir parte de esta actividad a la isoforma *gAANAT-1*. Además, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo anterior de esta Memoria, relativos a la presencia de genes reloj en estas localizaciones periféricas, y los obtenidos en la primera parte de este capítulo II, en relación con las enzimas responsables de la biosíntesis de MEL (*gAanat-2* y *gHiomt-2*), los presentes resultados nos permiten confirmar la síntesis periférica de MEL en hígado e intestino de carpín, y su posible regulación por un reloj periférico sincronizable a estímulos no fóticos.

2.2. Las enzimas de síntesis de melatonina en pineal, retina, hígado e intestino del carpín (*Carassius auratus*): clonación, patrón de expresión del ARNm y regulación de los ciclos diarios por la luz.

Chronobiol. Int. Vol. 6 (2010) Aceptada.

Además de los lugares clásicos de síntesis de melatonina (la glándula pineal y la retina), algunos órganos no fotosensibles de los vertebrados se han propuesto también como productores de esta indolamina. No obstante, muy pocos estudios han demostrado la expresión génica de las enzimas de síntesis de melatonina en localizaciones extrapineales o extraoculares. El presente estudio se centra en la expresión circadiana de dos enzimas clave de la ruta melatoninérgica, la arilalquilamina *N*-acetiltransferasa (AANAT) y la hidroxindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT), en localizaciones centrales y periféricas de un teleósteo, el carpín (*Carassius auratus*). Primero, se clonaron las secuencias completas de cDNA de AANAT-2 (*gAanat-2*) y de HIOMT-2 (*gHiomt-2*) del carpín, encontrando una elevada similitud con otras secuencias de teleósteos. La existencia de dos isoformas de AANAT es conocida con anterioridad, pero éste estudio es el primero en que se deducen dos isoformas de HIOMT a partir de un análisis filogenético. Además, las dos enzimas (AANAT y HIOMT) fueron detectadas en diversas localizaciones periféricas incluyendo el hígado y el intestino, siendo también los presentes resultados los primeros en encontrar HIOMT en estructuras no fotosensibles de un pez. Segundo, se realizaron estudios de PCR cuantitativa a tiempo real para investigar la regulación de la *gAanat-2* en pineal y órganos periféricos de carpines mantenidos bajo diferentes condiciones de iluminación. Nuestros resultados muestran la existencia de ritmos circadianos de los transcritos de *gAanat-2* y *gHiomt-2* en hígado e intestino, sugiriendo una síntesis local de melatonina. Además, el análisis de la expresión diaria de *gAanat-2* bajo diferentes condiciones de iluminación, incluyendo luz (24L) y oscuridad (24D) constantes, revelaron ritmos dependientes de la luz en pineal y retina, como cabía esperar, pero también en hígado e intestino. La conservación de estos ritmos de *gAanat-2* en peces mantenidos en las dos condiciones constantes, 24L y 24D, sugieren que la expresión de este transcrito está bajo control de un reloj circadiano y es sincronizada por estímulos no fóticos. Finalmente,

nuestros resultados apoyan la existencia de síntesis de melatonina en el hígado y el intestino del carpín.

*Estos resultados fueron presentados en forma de comunicación oral en el **XI. Congress of the European Biological Rhythms Society**, celebrado del 22-28 de agosto de 2009 en Estrasburgo (Francia).*

2.3. Evidencias directas de síntesis de melatonina en el hígado y el intestino de un teleósteo: actividad *in vitro* y clonación de la AANAT-1.

J. Pineal Res. Enviada.

En peces teleósteos existen al menos dos isoformas de la arilalkil *N*-acetiltransferasa (AANAT), enzima clave en la síntesis de melatonina, con diferencias en su distribución, cinética y afinidad por los sustratos. En el presente estudio, se realizaron ensayos de actividad enzimática NAT *in vitro* con muestras de hígado e intestino de carpines (*Carassius auratus*), utilizando la retina neural como control positivo, como evidencia directa de la posible biosíntesis de melatonina en dichos tejidos. Se observaron variaciones día/noche en los tres órganos estudiados, así como diferencias en la actividad a lo largo del tracto intestinal. La adición a la mezcla de reacción, tanto de un sustrato (fenetidina), como de un inhibidor (ácido fólico) específicos para otra transferasa, la arilamina *N*-acetiltransferasa (ANAT), nos permitió descartar a esta enzima como responsable de la acetilación de triptamina *in vitro* cuantificada en nuestros ensayos. Así mismo, el descenso observado en la cantidad de producto formado enzimáticamente en presencia de tiramina (sustrato específico para la AANAT-1) sugiere que al menos parte de la actividad observada en hígado e intestino ha de ser atribuida a esta isoforma. Además, realizada la clonación de un fragmento parcial de cDNA correspondiente a la AANAT-1 del carpín, hemos encontrado el mensajero de esta enzima en retina neural, hígado, e intestino anterior y posterior, lo que confirma la existencia de una AANAT-1 activa en estos tejidos. Los presentes resultados sobre funcionalidad de actividad AANAT-1 *in vitro* demuestran la existencia de un sistema melatoninérgico funcional en el tracto digestivo del carpín.

Parte de los resultados de este estudio fueron presentados en el VII Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada, celebrado del 6-9 de septiembre de 2009 en Oporto (Portugal), recibiendo el premio al mejor póster.

CAPÍTULO III

MELATONINA Y MOTILIDAD INTESTINAL EN EL CARPÍN (*Carassius auratus*)

- *Journal of Comparative Physiology Part B*, Vol. 179 No. 8, pp. 951-959 (2009).
- *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. En preparación.
- *Neurogastroenterol. Motil.* Enviada en mayo (2010).

3.1. Resumen.

La presencia de melatonina (MEL) en el tracto gastrointestinal de vertebrados puede estar revelando una relación funcional entre esta indolamina y las funciones gastrointestinales (Bubenik, 2008). En los mamíferos, se han descrito acciones de la MEL sobre aspectos fisiológicos y patológicos del tracto gastrointestinal, aunque se desconocen los mecanismos que producen dichos efectos. En los peces aún no se han investigado los posibles efectos de la MEL en la función gastrointestinal. Estudios previos muestran que la MEL actúa como un agente periférico implicado en la regulación de la ingesta, produciendo un efecto anorexigénico en el carpín y en la tenca (Pinillos *et al.*, 2001; López-Olmeda *et al.*, 2006), y una reducción del peso corporal en el carpín a medio plazo (De Pedro *et al.*, 2008), aunque los mecanismos implicados son desconocidos hasta la fecha.

El objetivo general de este último capítulo de la presente Tesis doctoral ha sido investigar si el efecto anoréxico de la MEL en el carpín puede deberse a una acción directa de la hormona sobre la motilidad intestinal, generando de este modo una señal periférica de saciedad. Para ello, hemos caracterizado tanto el efecto de la MEL sobre la actividad espontánea del músculo liso intestinal como sus posibles acciones sobre distintos agentes inductores de la actividad contráctil.

Hemos puesto a punto un sistema *in vitro* de intestino aislado en un baño de órganos acoplado a un transductor isométrico, que detecta los cambios de tensión del músculo liso intestinal. Con este sistema se puede registrar tanto la actividad espontánea basal de la pared intestinal como la respuesta del músculo a la adición de fármacos. Utilizamos preparaciones de la parte más anterior del intestino del carpín, montadas en el baño en sentido longitudinal, y aplicamos un protocolo de estimulación de dichas preparaciones intestinales con concentraciones crecientes de MEL, acetilcolina (ACh), serotonina (5HT) y cloruro potásico (KCl).

Tras un período de estabilización en el baño, las preparaciones intestinales desarrollan una actividad miogénica espontánea basado en un ritmo de ondas lentas que no se vio modificada por la adición de distintas concentraciones de MEL. Tanto la ACh como la 5HT indujeron una contracción de las preparaciones intestinales de forma dependiente de la concentración cuando

se incorporaron al baño, lo que sugiere la presencia de receptores colinérgicos y serotoninérgicos específicos mediadores de este efecto. La MEL ejerció un efecto relajante revirtiendo parcialmente la contracción inducida tanto por ACh como por 5HT, aunque no produjo ningún efecto observable sobre la despolarización inespecífica producida por la adición de una solución saturada de KCl al baño de órganos.

Por otro lado, tanto la adición de MEL como de su agonista, 2-iodomelatonina, indujeron una atenuación de la contracción colinérgica dependiente de la concentración. Para comprobar la especificidad de este efecto producido por la MEL, preincubamos las preparaciones intestinales con antagonistas melatoninérgicos, luzindol (antagonista general), y 4-P-PDOT (antagonista específico del subtipo MT2 de los receptores de MEL). Ambos fármacos bloquearon el efecto de la MEL sobre la contracción colinérgica, de forma concentración-dependiente. Estos resultados revelan que la acción de la MEL sobre la contracción colinérgica está mediada por receptores específicos de membrana situados a nivel local.

Encontramos un resultado similar para el efecto de la MEL sobre la contracción serotoninérgica. La adición de MEL al baño, previamente a la estimulación con 5HT, produjo una relajación concentración-dependiente, presentando además una cinética de inhibición que sugiere la existencia en estas preparaciones intestinales de dos sitios de unión a la MEL, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. Este resultado se confirmó con la adición al baño de los antagonistas de la MEL, el luzindol, que revertió completamente la relajación melatoninérgica, y el 4-P-PDOT, que revertió en torno al 80% de la relajación.

Con el fin de estudiar los mecanismos subyacentes a esta acción relajante de la MEL, empleamos dos aproximaciones experimentales. En primer lugar, utilizamos un medio salino sin calcio en el baño de órganos, para simular un medio sin calcio extracelular. En este caso, la adición de concentraciones bajas de MEL (1 pM) atenuó el efecto contráctil colinérgico de forma similar a la respuesta obtenida en un medio con calcio. Sin embargo, concentraciones más elevadas de la hormona (superiores a 10 nM) no produjeron la mayor relajación esperada, poniendo de manifiesto la importancia del calcio extracelular en el efecto de la MEL sobre la contractilidad intestinal.

Esta relevancia del calcio extracelular nos llevó a pensar en la posible intervención de un proceso de liberación por exocitosis de un agente relajante, como mecanismo de acción de la MEL. Así, la segunda aproximación utilizada se dirigió a investigar el papel de uno de los principales mediadores de relajación en el intestino de los peces, el óxido nítrico (NO), tanto en la actividad espontánea del intestino del carpín como en el efecto relajante de la MEL. Para ello, utilizamos tres agentes implicados en el sistema nitrérgico: L-NAME, inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, SNP (nitroprusato sódico), donante de NO, y L-arginina, precursor del NO. Al igual que en otros vertebrados estudiados (Olsson y Holmgren, 2001), la adición de L-NAME al baño de órganos produjo un incremento de la amplitud de las ondas lentas espontáneas del músculo liso intestinal del carpín, efecto que fue contrarrestado con la adición de L-arginina, tal y como cabría esperar. Además, el donante de NO, SNP, indujo una inhibición de la actividad espontánea. Estos resultados confirman la participación del NO en la motilidad intestinal del carpín dorado, como agente responsable de una inhibición tónica del ritmo basal de ondas lentas. Sin embargo, en todos los ensayos realizados para evaluar la posible implicación del NO en el efecto de la MEL, la relajación inducida por la neurohormona no se vio modificada por los distintos agentes relacionados con el sistema nitrérgico, por lo que concluimos que este gas no parece estar implicado en la relajación melatoninérgica.

Los estudios presentados en esta tesis son los primeros en describir un papel de la MEL sobre la motilidad intestinal de peces, y apoyan la propuesta de atribuir, al menos en parte, el efecto anorexigénico de la hormona en el carpín, a una señal periférica de saciedad generada por una disminución de la motilidad intestinal. Dicha señal se traduce en un bloqueo parcial de las estimulaciones colinérgica y serotoninérgica, y es independiente del sistema nitrérgico.

Por otro lado, considerando la respuesta concentración-dependiente obtenida en el intestino del carpín frente a la serotonina, y la importancia que tiene este neurotransmisor en la regulación de la motilidad intestinal y otros procesos gastrointestinales de los vertebrados (Olsson y Holmgren, 2001), utilizamos el modelo previamente descrito para realizar un análisis farmacológico del efecto de la 5HT en la motilidad intestinal del carpín.

La adición de 5HT al baño de órganos no sólo indujo una contracción de las preparaciones intestinales, sino que también se vieron afectados parámetros del ritmo espontáneo de ondas lentas (amplitud y frecuencia), lo que podría estar indicando la existencia de receptores serotoninérgicos en las células generadoras de dichas ondas (células intersticiales de Cajal) o en las neuronas que las inervan. Por otro lado, la contracción serotoninérgica se bloquea en presencia del antagonista muscarínico atropina, y tampoco se observa en ausencia de calcio extracelular, aún cuando la contracción colinérgica persista. Todos estos resultados nos permiten sugerir un control indirecto de la 5HT en la contractilidad del músculo liso intestinal a través de una activación colinérgica.

En la actualidad se han descrito hasta siete subtipos de receptores de 5HT en mamíferos, siendo los subtipos 5HT₂, 5HT₃, 5HT₄, y 5HT₇ los implicados en las funciones intestinales. No obstante, en peces apenas se conocen las secuencias de dichos receptores ni ha sido estudiada su farmacología, desconociéndose la distribución de los subtipos y su posible papel en el tracto digestivo de estos vertebrados. Con el fin de determinar qué subtipos de receptores serotoninérgicos están involucrados en la respuesta contráctil a este neurotransmisor en el carpín, realizamos una aproximación farmacológica utilizando ligandos comerciales con perfiles agonistas y antagonistas. Hemos obtenido respuestas concentración-dependientes con dos agonistas de amplio espectro, la 5-metoxitriptamina (5MT) y la 5-carboxamidotriptamina (5CT), aunque el uso de otros agonistas más específicos de los subtipos 5HT₃ y 5HT₄ de mamíferos no produjeron una respuesta clara en las preparaciones intestinales del carpín. De la misma forma, encontramos un bloqueo parcial, concentración-dependiente, de la contracción serotoninérgica con un antagonista de amplio espectro. Sin embargo el efecto agonista del 5CT fue antagonizado totalmente con un fármaco bloqueante más específico del subtipo 5HT₇, que no antagonizó a la 5MT. Estas diferentes respuestas a los antagonistas sugieren la existencia de, al menos, dos subtipos de receptores serotoninérgicos en el intestino del carpín, uno 5HT_{4-like}, más sensible a la 5MT, y otro, 5HT_{7-like}, más sensible a la 5CT. En la actualidad, la falta de ligandos farmacológicos específicos para receptores serotoninérgicos de peces dificulta la identificación de los subtipos implicados en la respuesta del

músculo liso intestinal del carpín. Sin embargo los presentes resultados nos permiten concluir que la contracción intestinal producida por la 5HT en el carpín está mediada, al menos, por dos subtipos de receptores de membrana, 5HT₄-*like* y 5HT₇-*like*, ambos situados a nivel local.

3.2. La melatonina atenúa la contracción inducida por la acetilcolina en intestino aislado de un pez teleósteo.

Journal of Comparative Physiology Part B, Vol. 179 No. 8, pp. 951-959 (2009).

El presente estudio investiga las posibles acciones directas de la melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) sobre la motilidad intestinal del carpín (*Carassius auratus*) utilizando un sistema *in vitro* de intestino aislado en un baño de órganos acoplado a un transductor isométrico. Las preparaciones de intestino de carpín en el baño de órganos muestran una actividad miogénica basal en forma de ritmo de ondas lentas que no se ve alterado por la melatonina. La adición de acetilcolina (1 nmol l^{-1} – 10 mmol l^{-1}) al baño de órganos induce una contracción significativa de las preparaciones intestinales de forma concentración-dependiente. Y la adición de melatonina y de su agonista, 2-iodomelatonina, produce una atenuación concentración-dependiente de la respuesta contráctil inducida por la acetilcolina. La especificidad de este efecto es comprobada mediante la preincubación de las preparaciones intestinales en presencia de dos antagonistas melatoninérgicos, luzindol (antagonista no selectivo de los receptores de melatonina MT1/MT2), y 4-P-PDOT (antagonista con afinidad selectiva para el subtipo de receptor MT2). Ambos ligandos contrarrestaron la relajación inducida por la melatonina de manera concentración-dependiente. Finalmente, los presentes resultados demuestran que este efecto melatoninérgico en las preparaciones intestinales es un proceso altamente dependiente del calcio extracelular. En conclusión, éste es el primer estudio que demuestra un papel de la melatonina en el control de la motilidad intestinal de un vertebrado no mamífero. Los efectos de la melatonina sobre el intestino aislado del carpín están mediados por receptores melatoninérgicos de membrana, y pueden sugerir un retraso en el tránsito del alimento, apoyando su efecto anorético observado en estudios *in vivo* en este teleósteo.

Parte de estos resultados fueron presentados en el VI Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada, celebrado del 10-13 de septiembre de 2007 en Cádiz (España).

3.3. Los efectos de la melatonina sobre la motilidad intestinal son independientes de la relajación mediada por el sistema nitrérgico en el carpín.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A. En preparación.

La síntesis de melatonina, transductor fotoneuroendocrino clave en la organización circadiana de los vertebrados, ha sido propuesta en localizaciones extrapineales y extraoculares, fundamentalmente en el tracto gastrointestinal. No obstante, hasta la fecha, las funciones de la melatonina sobre la fisiología intestinal no se han estudiado en profundidad. En el carpín se ha propuesto un papel de la melatonina como modulador de la motilidad intestinal, ya que atenúa la contracción colinérgica. El objetivo de este trabajo es profundizar en la relajación ejercida por la melatonina sobre el músculo liso intestinal del carpín, y estudiar la posible implicación del óxido nítrico en dicho efecto melatoninérgico. Utilizamos un sistema *in vitro* de intestino de carpín aislado en un baño de órganos acoplado a un transductor isométrico para evaluar los efectos de la melatonina sobre la motilidad intestinal. La adición de melatonina (10pM-100µM) al baño de órganos produjo una relajación de ambas estimulaciones, colinérgica y serotoninérgica, pero no se observó ningún efecto de la hormona en las preparaciones despolarizadas con una solución saturada de KCl. La adición de L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintetasaasa) aumentó la contracción de las ondas lentas, mientras que el nitroprusato sódico (SNP, donante de óxido nítrico) anuló el ritmo espontáneo, confirmando el papel clave del sistema nitrérgico en la motilidad intestinal basal del carpín. No obstante, ni la adición de L-NAME, ni de SNP, ni de L-arginina modificaron el efecto relajante de la melatonina, descartando la implicación de este sistema nitrérgico en la relajación inducida por melatonina. Los presentes resultados confirman la existencia de un tono nitrérgico basal en el intestino del carpín, donde la melatonina ejerce un efecto relajante de las contracciones colinérgica y serotoninérgica, independiente del óxido nítrico y dependiente del calcio extracelular.

Parte de estos resultados fueron presentados en VI International Symposium on Fish Endocrinology, celebrado en junio de 2008 en Calgary (Canadá), recibiendo el Premio al mejor póster del congreso.

3.4. Contracción serotoninérgica en intestino aislado de un teleosteo (*Carassius auratus*): caracterización e interacción con melatonina.

Neurogastroenterol. Motil. Enviada en mayo (2010).

La serotonina (5HT) desempeña un papel clave en la regulación de numerosas funciones gastrointestinales en vertebrados. En el presente estudio, utilizamos el intestino anterior de un teleosteo sin estómago, el carpín, para evaluar el efecto *in vitro* de la 5HT en la motilidad intestinal. Además, estudiamos el papel de la melatonina (MEL), indolamina que comparte su ruta biosintética con la 5HT, como regulador de la contracción inducida por la 5HT. Se utilizó un sistema de baño de órganos acoplado a un transductor isométrico con preparaciones longitudinales del bulbo intestinal del carpín para registrar las contracciones del músculo liso intestinal. Las curvas concentración-dependientes de la respuesta contráctil ejercida por la 5HT y sus agonistas, 5-metoxitriptamina (5MT) y 5-carboxamidotriptamina (5CT), sugieren una acción mediada por receptores, apoyada por el bloqueo de la contracción serotoninérgica logrado con un antagonista no selectivo, la metisergida. La contracción serotoninérgica no se produce en presencia del antagonista muscarínico atropina, revelando la implicación de la transmisión colinérgica en la acción de la 5HT sobre la contractilidad intestinal. La MEL inhibe hasta el 50% el efecto contráctil de la 5HT y sus agonistas de manera concentración-dependiente, inhibición contrarrestada por antagonistas de MEL. Dado el escaso conocimiento actual de la farmacología de los receptores serotoninérgicos en peces, a partir de nuestros resultados proponemos provisionalmente la existencia de al menos dos subtipos de receptores de 5HT implicados en la motilidad intestinal de los peces, uno 5HT₄-like (más afín a la 5MT) y otro 5HT₇-like (sensible a la 5CT y a la flufenazina). Por tanto, los resultados muestran que la 5HT regula la actividad contráctil del intestino anterior del carpín a través de receptores específicos situados en neuronas colinérgicas, y que la MEL puede modular esta acción serotoninérgica vía receptores de membrana de alta afinidad.

Estos resultados se presentaron como comunicación oral en el VII Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada, celebrado del 6-9 de septiembre de 2009 en Oporto (Portugal).

IV. DISCUSIÓN GENERAL

El carpín dorado es una especie ampliamente utilizada como modelo para el estudio del funcionamiento general del sistema circadiano en peces. No obstante, hasta la fecha no se disponía de las herramientas necesarias para investigar la generación molecular de dichos ritmos en este teleósteo. Los estudios presentados en esta Tesis Doctoral aportan los primeros resultados sobre el funcionamiento del reloj molecular en el carpín. Además, considerando resultados previos obtenidos en esta especie en relación con el papel de la MEL como regulador periférico de la ingesta, y la hipótesis aún no resuelta sobre la síntesis local de esta neurohormona en el tracto gastrointestinal de los vertebrados, los resultados descritos en la presente Memoria aportan evidencias sobre la existencia de relojes periféricos en el sistema digestivo (intestino e hígado) del carpín. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que estos relojes constarían tanto de la maquinaria básica del reloj molecular (genes *Per* y *Cry*), como de posibles genes regulados por estos relojes periféricos (*gAanat* y *gHiomt*), así como de una salida en forma de síntesis rítmica de MEL, una de cuyas funciones en el tracto gastrointestinal del carpín también se pone de manifiesto en los presentes ensayos. Por otro lado, las evidencias aportadas en estos estudios apuntan a la capacidad de dichos relojes periféricos para sincronizarse a estímulos diferentes del ciclo diario de luz/oscuridad, como puede ser el horario de alimentación.

En la presente Discusión General se pretende abordar de manera global e integrada los distintos resultados obtenidos en los diferentes capítulos que constituyen la presente Tesis Doctoral.

1. RELOJES MOLECULARES EN LOCALIZACIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DEL CARPÍN, *Carassius auratus*.

Con el objetivo de conocer los mecanismos moleculares de los osciladores circadianos en el carpín, hemos clonado las secuencias parciales de seis genes reloj, pertenecientes a las familias *Period* y *Cryptochrome*, ambos elementos del bucle de retroalimentación negativo del reloj molecular de los vertebrados (Iuvone *et al.*, 2005). El análisis de expresión temporal de dichos genes en retina, hígado e intestino del carpín ha revelado oscilaciones robustas de su ARNm a lo largo del ciclo diario de luz/oscuridad.

La retina de los vertebrados es un órgano ampliamente utilizado como modelo para investigar la base de las funciones fisiológicas controladas de manera circadiana, en especial del bucle MEL-dopamina. En los vertebrados, la MEL se sintetiza en los fotorreceptores retinianos en ausencia de luz, y contribuye a la adaptación ocular a la oscuridad, fundamentalmente inhibiendo la liberación de dopamina durante la noche, proceso mediado por receptores específicos de membrana. Por el contrario, y de forma análoga, la liberación de dopamina estimulada durante el día contribuye a la adaptación a la luz y, actuando sobre receptores específicos, inhibe la síntesis de MEL (Iuvone *et al.*, 2005; Tosini *et al.*, 2008). Estos patrones rítmicos de liberación diaria de ambas monoaminas han sido identificados en la retina del carpín (Iigo *et al.*, 1997; Ribelayga *et al.*, 2004). Además, la dopamina parece estar mediando un ritmo circadiano en la señalización desde conos y bastones hasta las neuronas retinianas de segundo orden a través de receptores de la familia D2 (Wang y Mangel, 1996; Ribelayga *et al.*, 2002). La expresión rítmica de los transcritos de los denominados genes reloj *Period* y *Cryptochrome* en la retina del carpín, descrita en esta Memoria, demuestra la existencia de osciladores circadianos autónomos en este órgano capaces de generar los mencionados ritmos fisiológicos de secreción diaria de dopamina y MEL.

En la retina del carpín, los fragmentos de ARNm de los tres genes *Cryptochrome* investigados presentan patrones de ritmicidad circadiana similares, con máximos de expresión durante la escotofase (ZT20). Los genes *Period*, *Per1* y *Per3* coinciden en su acrofase (ZT20), mientras *Per2* tiene su máximo al comienzo de la fase luminosa (ZT2). Estos perfiles de expresión encontrados en el carpín muestran algunas similitudes y diferencias respecto a otras especies de vertebrados. Así, el ritmo de *Per2* de la retina del carpín es similar al encontrado en la retina de la mayoría de especies estudiadas, como *Gallus gallus* (Yoshimura *et al.*, 2000; Chaurasia *et al.*, 2006), *X. laevis* (Zhuang *et al.*, 2000) *Rattus norvegicus* (Kamphuis *et al.*, 2005) o *Mus musculus* (Ruan *et al.*, 2008), al igual que ocurre con la expresión de *Per3* en *D. rerio* (Delaunay *et al.*, 2000) y *C. japonica* (Yoshimura *et al.*, 2000), mientras que el perfil diario de *Per1* es opuesto al encontrado en *Xenopus* (Zhuang *et al.*, 2000). De la misma forma, la elevada expresión nocturna de los genes *Cryptochrome* en la retina del carpín concuerda con los resultados

obtenidos para *Cry2* en el pez cebra (Kobayashi *et al.*, 2000). Sin embargo, tanto *Cry1* como *Cry3* se han encontrado en mayor abundancia durante el día en *D. rerio* (Kobayashi *et al.* 2000), *C. japonica* (Fu *et al.*, 2002) y *G. gallus* (Chaurasia *et al.*, 2006), contrariamente al patrón observado en el carpín. Estas diferencias halladas en los ritmos de expresión de los genes reloj en las retinas de los vertebrados son representativas de la gran variedad interespecífica en la organización circadiana de la retina, siendo sus cambios a lo largo de la filogenia un tema de gran interés poco conocido en la actualidad.

En la presente Memoria se describen por primera vez variaciones en la expresión de genes reloj en localizaciones periféricas del carpín. Estudios previos realizados en otros vertebrados como *D. rerio* (Whitmore *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 2006), *Podarcis sicula* (Della Ragione *et al.*, 2005), *G. gallus* (Chong *et al.*, 2003), *C. japonica* (Fu *et al.*, 2002), *Ovis aries* (Andersson ., 2005) y *M. musculus* (Peirson *et al.*, 2006) así como en humanos (Pardini *et al.*, 2005), muestran variaciones en ciertas localizaciones periféricas, como las gónadas, el corazón, el intestino y el hígado. Los presentes resultados demuestran una expresión rítmica de varios genes reloj en el hígado y el intestino del carpín en condiciones de luz/oscuridad y con un horario fijo de alimentación diaria. Así, el intestino del carpín presenta un ritmo de expresión de *Per2* con un máximo en ZT2, coincidiendo con el máximo observado en la retina y con la hora de alimentación. Esta coincidencia de la acrofase de *Per2* con el horario de alimentación en el intestino se ha observado también en ratones, en los que la expresión del gen aumenta por la noche en los animales alimentados *ad libitum*, pero cambia a la mitad de la fotofase cuando la comida se restringe a esa franja horaria (Hoogerwerf *et al.*, 2007).

Los presentes resultados son los primeros en analizar los ritmos de expresión de *Cry3* en un teleósteo, aunque en este gen, no descrito en mamíferos, sí se habían encontrado variaciones día/noche en el pez cebra (Kobayashi *et al.*, 2000). *Per3* y *Cry2* presentan máximos de expresión durante la fase nocturna, mostrando unos perfiles diarios distintos a los de la retina. Estas diferencias en la fase y en la amplitud de los ritmos de expresión de los genes reloj en hígado e intestino del carpín sugieren una sincronización a estímulos no lumínicos, siendo el horario de alimentación un buen candidato como estímulo capaz de sincronizar dichos ritmos.

El carpín es un teleósteo utilizado en numerosos estudios orientados a caracterizar diversos aspectos comportamentales gracias a su facilidad de manejo y mantenimiento en condiciones de laboratorio. Estos estudios comportamentales han demostrado la existencia de una robusta actividad anticipatoria al alimento (FAA) en esta especie, siendo relevantes las contribuciones realizadas en este campo por el equipo investigador de la Universidad de Murcia (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997; Aranda *et al.*, 2001; Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). Generalmente, se considera que la FAA es una salida directa del oscilador sincronizado por el alimento (FEO). Varios estudios realizados en mamíferos demostraron que la FAA se mantiene tanto en ausencia del núcleo supraquiasmático (NSQ), indicando su independencia del LEO (Stephan *et al.*, 1979), como tras la retirada del *zeitgeber* alimentación, permaneciendo la FAA en condiciones de curso libre (Mistlberger, 1994). Diversos trabajos realizados también en mamíferos han relacionado los genes analizados en nuestro trabajo con la FAA, siendo necesarios tanto *Cry* como *Per* para su aparición (Iijima *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2005b; Feillet *et al.*, 2006). Los resultados presentados en esta Memoria, relativos a los ritmos de expresión de genes reloj en órganos del tracto digestivo, junto con la robustez de la FAA son razones sólidas para utilizar al carpín como especie modelo para investigar múltiples aspectos del FEO (localización, funciones, relevancia) que, en la actualidad, quedan por dilucidar.

Por tanto, los resultados pertenecientes al capítulo I de esta Tesis Doctoral suponen una primera aproximación al estudio del funcionamiento molecular de los osciladores circadianos del carpín, al haberse obtenido por un lado las primeras secuencias de genes reloj en esta especie y por otro las primeras evidencias que demuestran oscilaciones diarias en los niveles de expresión de dichos genes en retina, hígado e intestino. No obstante, no son resultados que permitan el análisis de la sincronización de dichos ritmos de expresión ni al ciclo diario luz/oscuridad ni al horario de alimentación, dado que ambos *zeitgeber*, ciclo luz/oscuridad 12L:12D y horario de alimentación fijado en ZT2, estuvieron presentes en nuestro diseño experimental. Actualmente se sabe que, en mamíferos, la presencia de un horario de alimentación restringido es suficiente para desacoplar los relojes periféricos de los centrales en presencia

del fotociclo, lo que se traduce en un cambio de fase en los ritmos de expresión de los genes reloj respecto al NSQ (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001). Este horario de alimentación restringido también afecta a la expresión de genes reloj en otras regiones hipotalámicas distintas al NSQ, como el núcleo dorsomedial, el ventromedial, el arqueado o el paraventricular (Miñana-Solis *et al.*, 2009), e incluso bajo condiciones de alimentación determinadas (dietas hipo o hipercalóricas) pueden verse modificados los ritmos en el propio NSQ (Mendoza *et al.*, 2005b, 2008b). En peces, resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto, por primera vez, la capacidad de sincronización de los ritmos de expresión de genes reloj a un horario de alimentación programado en dos áreas encefálicas, el techo óptico y el hipotálamo, en carpines mantenidos en luz continua (Feliciano *et al.*, 2010). Todos estos datos planteados justifican nuestra conclusión acerca de que los ritmos de expresión de genes reloj observados en el hígado y el intestino del carpín, en el presente trabajo, parecen estar determinados por el horario de alimentación, ya que, incluso en presencia del fotociclo, una hora predeterminada de administración del alimento es un *zeitgeber* muy potente, especialmente para el funcionamiento de los osciladores periféricos.

Por otro lado, la cercanía temporal de los dos *zeitgebers* presentes en nuestro diseño experimental (comienzo de la fotofase a ZT0 y hora de alimentación a ZT2) podría estar reforzando la sincronización al alimento en las localizaciones periféricas. Así, en ratas se ha observado que, aunque el ciclo luz/oscuridad actúa como un sincronizador débil para los osciladores periféricos, la combinación de este estímulo junto con un horario de alimentación fijo facilita de forma significativa el ajuste del oscilador hepático a un cambio de fase, produciéndose éste con más rapidez que si se utiliza el horario de alimentación como único *zeitgeber* (Wu *et al.*, 2008a). Esta cooperación entre ambos sincronizadores se ha observado también en la glándula pineal de la rata, pero a la inversa, como cabría esperar. Es decir, el *zeitgeber* más potente es la luz, mientras que la alimentación, por sí misma, no es capaz de afectar a los ritmos circadianos de la pineal. Sin embargo, al invertir completamente ambos *zeitgeber*, el reencarrilamiento se produce más rápidamente que si sólo se invierte el ciclo luz/oscuridad (Wu *et al.*, 2008b).

Todos estos resultados ponen de manifiesto las complejas interacciones que existen entre el LEO y el FEO en función del tejido u órgano estudiado.

La localización anatómica del FEO sigue siendo desconocida en la actualidad. Estudios iniciales realizados en mamíferos apuntaban a una estructura hipotalámica, el núcleo dorsomedial, como región clave en la sincronización al alimento, ya que mostraba ritmos de expresión de genes reloj sincronizados a la alimentación (Mieda *et al.*, 2006), y lesiones en dicho núcleo disminuían la FAA (Gooley *et al.*, 2006). Además, se aceptaba la relevancia de estructuras periféricas, aunque éstas no fueran capaces de generar por sí mismas la FAA (Davidson *et al.*, 2003). Es decir, en la última década todos los estudios han utilizado la FAA como salida más relevante del FEO, algo que en la actualidad se está cuestionando, ya que ningún elemento constituyente del reloj circadiano tal como lo conocemos en la actualidad, parece ser necesario para la aparición de esta respuesta comportamental (Storch y Weitz, 2009).

Actualmente, existe gran controversia respecto a la implicación del núcleo dorsomedial en la generación de los ritmos sincronizados a la alimentación en los mamíferos. Por un lado, cada vez surgen más evidencias que indican que esta región hipotalámica, efectivamente, se sincroniza a la hora de alimentación, pero no genera ritmos ni de actividad anticipatoria ni de temperatura (Moriya *et al.*, 2009). Sin embargo, otros estudios siguen apuntando al núcleo dorsomedial como responsable de los ritmos encarrilados por el alimento (Fuller *et al.*, 2008, 2009), lo que ha provocado la división de la comunidad científica dedicada al estudio de este aspecto de la Cronobiología (Mistlberger *et al.*, 2008, 2009). Podemos decir que, hoy en día, la hipótesis más aceptada sobre la localización del FEO en mamíferos implicaría una red de estructuras tanto encefálicas como periféricas, en la que intervendrían órganos periféricos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis metabólica (Escobar *et al.*, 2009), estructuras centrales implicadas en el mantenimiento energético y en los sistemas de recompensa (áreas corticolímbicas e hipotalámicas) (Webb *et al.*, 2009), e incluso agentes reguladores de la ingesta, como la ghrelina secretada por las células oxínticas del estómago (LeSauter *et al.*, 2009).

Todos estos datos obtenidos en mamíferos no hacen sino revelar el trabajo de investigación que aún queda por hacer en lo que respecta al estudio de los ritmos sincronizados por el alimento. La información disponible en otros vertebrados es prácticamente inexistente. Los resultados mostrados en la presente Tesis Doctoral aportan una información esencial para el inicio del estudio de esta cuestión a nivel molecular en un teleósteo del que hasta ahora únicamente se disponía de datos comportamentales (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997, 2001) o metabólicos (Vera *et al.*, 2007). Resultados obtenidos recientemente por nuestro grupo de investigación señalan al hígado del carpín como estructura sincronizable a la alimentación, ya que en animales mantenidos en luz continua y con un horario de alimentación aleatorio se conserva la expresión rítmica de genes reloj, proponiéndose al horario de la última comida como posible "reseteador" del oscilador hepático (Feliciano *et al.*, 2010). Además, y como se ha mencionado anteriormente, se ha comprobado el encarrilamiento al horario de alimentación de algunas regiones encefálicas (Feliciano *et al.*, 2010), por lo que podemos proponer para el carpín un modelo de FEO similar al de los mamíferos, es decir, constituido por una red dinámica de estructuras centrales y periféricas.

Por último, una reflexión importante que queremos indicar es que, aunque el hallazgo de oscilaciones rítmicas en la expresión de genes reloj puede considerarse un indicador de la presencia de un oscilador, no necesariamente implica que este oscilador sea funcional *in vivo*. Para ello, tienen que existir genes controlados por los productos proteicos de estos genes reloj, los denominados genes controlados por el reloj (CCG), y que constituyen la salida de dicho reloj. Así, tras comprobar la presencia de los primeros elementos necesarios para configurar un oscilador circadiano funcional en el hígado y el intestino del carpín, nos planteamos en el siguiente capítulo de esta Tesis Doctoral investigar la enzima clave en la síntesis de melatonina, la arilalquilamina *N*-acetiltransferasa, como un posible candidato a CCG controlado por dicho reloj.

2. LAS ENZIMAS CLAVE EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE MELATONINA EN LOCALIZACIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DE *Carassius auratus*.

El segundo capítulo de la presente Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de las dos enzimas responsables de catalizar el paso de serotonina a MEL, la arilalquilamina *N*-acetiltransferasa (AANAT), y la hidroxiindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT), con un doble propósito. Por un lado, y teniendo en cuenta lo expuesto en el primer capítulo, como posibles genes controlados por osciladores periféricos y, por otro lado, como evidencia de una probable síntesis periférica de MEL.

Así, para el primer objetivo de este capítulo, clonamos las secuencias completas correspondientes a la *gAanat-2* y la *gHiomt-2*, y la secuencia parcial de la *gAanat-1*. Generalmente, se acepta la existencia en teleósteos de, al menos, dos copias de cada gen por cada ortólogo presente en mamíferos, debido a la duplicación completa del genoma producida en el origen de este linaje (Hoegg *et al.*, 2004; Volff 2005). Las dos isoformas de la AANAT son bien conocidas en la pineal y la retina de varias especies de teleósteos, e incluso recientemente se ha comprobado la existencia de una duplicación de la AANAT-1 en salmónidos y percomorfos, denominadas AANAT-1a y AANAT-1b (Falcón *et al.*, 2009). Nuestros resultados amplían la existencia de estas dos AANATs también para el carpín, y además nos han permitido diferenciar por primera vez en vertebrados dos isoformas de la HIOMT, denominadas 1 y 2. Aunque las dos copias de la HIOMT no se han clonado con anterioridad en ninguna otra especie de pez, hay evidencias suficientes en las especies de teleósteos cuyo genoma ha sido secuenciado (*D. rerio*, *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Gasterosteus aculeatus*) para suponer que tras la duplicación del genoma en el teleósteo ancestral, las dos copias de HIOMT se han conservado, como en el caso de la AANAT. Además, hay que tener en cuenta que el carpín, al igual que los otros ciprininos (pertenecientes a la subfamilia *Cyprininae*) es una especie tetraploide, siendo esperable encontrar dos copias de cada gen (Ohno *et al.*, 1967; Larhammar y Risinger, 1994), aunque en este caso deberían ser muy similares debido a la reciente aparición de los ciprininos en comparación con la gran diversidad y antigüedad de los teleósteos como grupo filogenético. Durante el proceso de clonación no hemos

encontrado ninguna evidencia de dicha duplicación en el carpín aunque, en el momento actual, no podemos descartarla.

Un resultado original adicional es que las tres secuencias clonadas en el carpín se han identificado en los órganos digestivos (hígado e intestino), hecho que no se ha descrito con anterioridad en otras especies de teleósteos investigadas, y que apoyaría la síntesis de MEL en estas localizaciones periféricas.

Para que estos genes puedan estar controlados por un oscilador, su expresión debe ser rítmica, ya que en los tetrápodos el reloj celular genera un ritmo en la transcripción del gen *Aanat* mediante la interacción del dímero BMAL1:CLOCK con un elemento E-box presente en el promotor del gen de la enzima, produciéndose un aumento nocturno tanto del ARNm como de la proteína activa (Chong *et al.*, 2000; Appelbaum *et al.*, 2005). Así, al analizar la expresión diaria de *gAanat-2* en la pineal del carpín, encontramos una oscilación rítmica en presencia de un fotociclo, que se reduce notablemente en condiciones de iluminación u oscuridad constantes. En un trabajo reciente realizado por Vatine y colaboradores en el pez cebra, atribuyen esta caída en los niveles de expresión en condiciones constantes de luz u oscuridad a las características del módulo de respuesta a la luz (LRM, *Light responsive module*) presente en el promotor del gen *per2* (Vatine *et al.*, 2009). En este LRM del promotor habría un elemento E-box, responsable del control del reloj circadiano, y un elemento D-box, mediador del control transcripcional inducido por la luz, de forma que en condiciones constantes se sigue observando un ritmo de menor amplitud generado sólo por el reloj a través de E-box, y en presencia del fotociclo habría una activación de la transcripción mediada por D-box (Vatine *et al.*, 2009).

Las oscilaciones rítmicas del ARNm de la *Aanat-2* en la glándula pineal del carpín concuerdan con los resultados encontrados en otras especies de peces, como el lucio (Coon *et al.*, 1998), el pez cebra (Bégay *et al.*, 1998; Gothilf *et al.*, 1999) o la dorada (Zilberman-Peled *et al.*, 2004), aunque no en la trucha, que mantiene constantes sus niveles de expresión a lo largo del ciclo diario (Bégay *et al.*, 1998). No obstante, la secreción rítmica de MEL por la pineal es una característica común en todas las especies mencionadas, poniendo de manifiesto la importancia del procesamiento post-transcripcional y post-

transduccional en la regulación de la síntesis de esta indolamina en peces, al igual que ocurre en mamíferos (Ganguly *et al.*, 2002; Falcón *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

Mientras que en la glándula pineal del carpín sólo se expresa la *gAanat-2*, en la retina hemos encontrado la presencia de las dos isoformas, la *Aanat-1* y la *Aanat-2*. En algunas especies de peces, como el rodaballo (Vuilleumier *et al.*, 2007), el lenguado (Isorna *et al.*, 2009) o la dorada (Zilberman-Peled *et al.*, 2004) se ha descrito la existencia de una expresión específica de la *Aanat-2* en la glándula pineal y de la *Aanat-1* en retina. En el carpín, no sólo hemos encontrado expresión de la *gAanat-2* en la retina, sino que además dicha expresión ocurre de manera rítmica y se mantiene en condiciones constantes de luz y de oscuridad. Esta excepción no es única en los teleósteos ya que en otro ciprínido, el pez cebra, también coexisten ambas isoformas de la AANAT en la retina, y el análisis *in vivo* de la expresión de ambas reveló la existencia de ritmos robustos en la *Aanat-2*, que también se mantienen en oscuridad constante, mientras que las oscilaciones de la *Aanat-1* desaparecen en estas condiciones (Appelbaum *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que en la retina de estos dos ciprínidos, el pez cebra y el carpín, la expresión de la AANAT-2 está controlada por un reloj circadiano intraocular, mientras que la de la AANAT-1 estaría principalmente regulada por la luz. La presencia de estas dos isoformas podría indicar un papel de las AANATs en la retina acetilando compuestos distintos a la serotonina, o incluso para la síntesis de otros compuestos distintos a la MEL (Klein, 2006; Zilberman-Peled *et al.*, 2006). En todo caso, y teniendo en cuenta la expresión rítmica de genes reloj en la retina del carpín descrita en el capítulo anterior, los presentes resultados confirman de forma sólida la existencia de un reloj circadiano intraocular en esta especie, al igual que sucede en la pineal.

Respecto a la periferia, hemos encontrado el ARNm perteneciente tanto a la *gHiomt-2* como a ambas isoformas de *gAanat* en hígado e intestino del carpín. La presencia de la AANAT en localizaciones periféricas se ha identificado en roedores (Gauer *et al.*, 1999; Stefulj *et al.*, 2001), aves (Kato *et al.*, 1999) y anfibios (Isorna *et al.*, 2006), habiéndose encontrado evidencias también en un teleósteo, la trucha arcoiris (Fernández-Durán *et al.*, 2007). Los resultados presentados en esta Memoria aportan las primeras

pruebas sobre la expresión de HIOMT en estructuras no fotosensibles de peces, corroborando los patrones encontrados en rata (Stefulj *et al.*, 2001) y en codorniz (Fu *et al.*, 2001). Los resultados correspondientes a este capítulo constituyen, además, los primeros en la bibliografía que describen ritmos circadianos de expresión de HIOMT en órganos periféricos de un vertebrado. Aunque la actividad enzimática HIOMT aún no ha sido investigada en el carpín, nuestros datos sugieren que, al menos en base a la expresión génica de esta enzima, un ritmo fisiológico de síntesis de MEL puede estar ocurriendo en hígado e intestino de esta especie.

El estudio de los ritmos de expresión de la *gAanat-2* en dos órganos periféricos del carpín, hígado e intestino, ha revelado diferencias interesantes entre ambos. Por un lado, las oscilaciones mostradas por el hígado del carpín sugieren una implicación del fotociclo en el mantenimiento de la ritmicidad, ya que, al igual que ocurría en las estructuras fotosensibles (retina y pineal), la amplitud de dichos ritmos y los niveles de expresión se reducen significativamente en condiciones de iluminación constante. No obstante, los ritmos no desaparecen totalmente, lo que indica la presencia de un oscilador endógeno responsable de su generación. Por otro lado, en el intestino parece existir una diferenciación longitudinal en lo que respecta a variaciones en la expresión de la *gAanat-2*. Así, mientras que en el intestino anterior se observan menores niveles de expresión y no aparecen ritmos diarios significativos bajo ninguna de las condiciones experimentales ensayadas, en el intestino posterior encontramos una ritmicidad circadiana que puede considerarse independiente de la luz, ya que las amplitudes de los ritmos diarios no difieren entre las cuatro condiciones luz/oscuridad ensayadas. Además, aunque no se ha realizado cuantificación, hemos encontrado un patrón de expresión longitudinal similar para la *gAanat-1*, es decir más abundante en intestino posterior que en el anterior. Por tanto, la expresión de las enzimas de síntesis de MEL en intestino posterior y en hígado de carpín estaría regulada por osciladores periféricos sincronizables a estímulos no fóticos, de los que, como se ha indicado en el capítulo anterior, el horario de la alimentación sería el candidato principal. Una sincronización al horario de alimentación, tanto de la síntesis de MEL como de la expresión de la AANAT, ha sido recientemente estudiada en la glándula pineal de ratas (Feillet *et al.*,

2008). En este estudio, un horario de alimentación fijo logra restablecer la ritmicidad de la glándula pineal en ratas con un NSQ lesionado. Este resultado en la rata apoya nuestra propuesta de que en determinados órganos periféricos del carpín existe una síntesis rítmica de MEL encarrilada por la alimentación.

La presencia en localizaciones periféricas del mensajero de las principales enzimas responsables de la biosíntesis de MEL nos llevó a estudiar la capacidad de síntesis de la hormona en el intestino y el hígado del carpín. Una forma directa de demostración de dicha capacidad es investigar la actividad enzimática *in vitro*. Para ello, realizamos ensayos utilizando homogeneizados de dichos órganos en presencia de triptamina, sustrato susceptible de ser acetilado por la AANAT, y cuantificamos la cantidad de producto formado mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FD; Anexo II). Este método de detección proporciona una mayor sensibilidad en la cuantificación de la actividad NAT respecto a la utilización de isótopos radiactivos, y el procesamiento de las muestras es más sencillo que con la detección electroquímica, ya que se evita la extracción orgánica del producto formado enzimáticamente (Thomas *et al.*, 1990).

Nuestros resultados demostrando la existencia de actividad AANAT *in vitro* en tejidos periféricos representan la primera contribución a la demostración directa de una síntesis periférica de MEL en intestino e hígado del carpín. Además, los resultados descritos en la presente Memoria nos permiten descartar la posible interferencia producida potencialmente por otra familia de acetiltransferasas, las arilamina *N*-acetiltransferasas (ANATs). Este último grupo de enzimas es especialmente abundante en el sistema nervioso, hígado, intestino y retina de distintos grupos de vertebrados (Alonso-Gómez *et al.*, 1995; Nowak *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 1998; Windmill *et al.*, 2000), donde catalizan la acetilación de aminas biógenas, fundamentalmente arilaminas, arilhidroxilaminas y arilhidracinas (Sim *et al.*, 2008), adquiriendo un papel importante como detoxificantes. En peces los únicos datos disponibles sobre las ANATs corresponden al pez cebra, donde se han identificado seis genes diferentes dentro de su genoma (Sim *et al.*, 2008). No obstante, su localización en retina, hígado e intestino de otras especies, y su capacidad para acetilar aminas las convierte en posibles candidatas para catalizar la

acetilación de triptamina en el ensayo *in vitro* en estos órganos del carpín. Este hecho podría haber originado interpretaciones erróneas de los resultados al atribuir la producción de triptamina acetilada a las AANATs, cuando teóricamente podrían ser las ANAT las que estuvieran actuando. Con el fin de excluir esta posibilidad hemos realizado varias aproximaciones experimentales que nos han permitido descartar a las ANATs como mediadoras de la reacción enzimática en el ensayo.

El protocolo *in vitro* de determinación de actividad NAT empleado en nuestros ensayos ha sido clásicamente utilizado en los ensayos de actividad AANAT (Thomas *et al.*, 1990; Alonso-Gómez *et al.*, 1995; Benyassi *et al.*, 2000) utilizando arilalquilaminas como sustratos, no sólo triptamina sino también serotonina y 5-metoxitriptamina. Nuestros resultados ponen de manifiesto que existe diferente actividad NAT en muestras extraídas en mitad de la fase luminosa respecto a muestras correspondientes a la mitad de la escotofase, tanto en retina como, por primera vez en un pez, en hígado e intestino. Esta variación diaria en la actividad enzimática justifica nuestra conclusión atribuyendo dicha actividad a la AANAT que, como se ha indicado anteriormente, está regulada por el reloj molecular, exhibiendo ritmicidad diaria tanto en su expresión génica como en su actividad catalítica (Klein, 2007), mientras que las ANATs no presentan fluctuaciones diarias (Nowak *et al.*, 1995). Nuestros resultados no sólo confirman la presencia de una AANAT activa *in vitro* en hígado e intestino del carpín, sino que apoyan la síntesis rítmica diaria de MEL en estos órganos, determinada por un control transcripcional de las enzimas de síntesis de la indolamina mediado por osciladores periféricos. Como última aproximación para demostrar que la actividad cuantificada corresponde a AANAT frente a ANAT, se incluyeron en los ensayos dos agentes farmacológicos clásicamente utilizados para valorar actividad ANAT (Nowak *et al.*, 1995): el ácido fólico, como inhibidor específico de la actividad ANAT, y la fenetidina, considerada un sustrato específico de la ANAT. Ninguno de los dos modificó la cantidad de producto formado en ninguno de los órganos estudiados (retina, hígado e intestino), lo que nos permite confirmar, por primera vez en peces, a la AANAT como catalizadora de la acetilación de triptamina *in vitro* en estas localizaciones periféricas.

Nuestros estudios de clonación de las enzimas implicadas en la biosíntesis de MEL en el carpín nos han permitido identificar en el intestino y el hígado de esta especie el ARNm de las dos isoformas de AANAT presentes en teleósteos. Con los ensayos de actividad enzimática intentamos asignar a una de ellas la capacidad de acetilación de la triptamina *in vitro*. Los resultados correspondientes a la cinética enzimática son similares para los tres órganos, retina, hígado e intestino, con una afinidad menor para la serotonina que para los otros sustratos, corroborando los patrones de actividad de la AANAT-1 descritos en otras especies de peces, como el lucio (Coon *et al.*, 1999) o la dorada (Zilberman-Peled *et al.*, 2004). La adición de tiramina al ensayo, sustrato específico de AANAT-1, produjo un descenso significativo, aunque parcial, en la cantidad de *N*-acetiltriptamina formada enzimáticamente. Tanto los resultados relativos a la cinética enzimática, como el descenso de actividad observado en presencia de tiramina, nos permiten atribuir la acetilación de triptamina *in vitro* en el intestino y el hígado del carpín a la isoforma AANAT-1, al menos parcialmente. Así, los datos obtenidos asignan a la acción enzimática de esta isoforma hasta el 50% de la actividad observada en hígado y el 75% en intestino, aunque el remanente de producto formado y la presencia del mensajero de la AANAT-2 en dichas localizaciones no nos permiten descartar totalmente la implicación de este segundo subtipo enzimático.

Otro resultado relevante del presente estudio concierne a las diferencias observadas en la actividad AANAT a lo largo del intestino. En el carpín hemos encontrado una mayor formación de producto de la reacción en el intestino posterior, lo que concuerda tanto con la expresión de *gAanat-1* como de *gAanat-2* discutida anteriormente. Esta concordancia entre nuestros resultados revela una relación directa entre la cantidad de mensajero y la actividad enzimática *in vitro*, apoyando la existencia de AANATs activas en este órgano.

Por tanto, los resultados obtenidos en el segundo capítulo de la presente Tesis Doctoral representan la primera evidencia directa en un vertebrado de la capacidad de síntesis de MEL en hígado e intestino. Teniendo en cuenta tanto la expresión génica de las enzimas implicadas en la ruta biosintética, como su actividad catalítica *in vitro* en hígado e intestino del carpín, proponemos que esta síntesis periférica de MEL podría tener un patrón rítmico diario análogo al

observado en pineal y retina, y sugerimos que una regulación por osciladores locales es posible en estas localizaciones periféricas.

3. MELATONINA Y MOTILIDAD INTESTINAL EN EL CARPÍN (*Carassius auratus*).

La presencia de MEL en el tracto gastrointestinal del carpín se detectó por primera vez con técnicas de inmunohistoquímica en 1997 (Bubenik y Pang, 1997), sugiriéndose una relación fisiológica entre la hormona y el intestino de este teleósteo, de manera similar a la descrita en 1975 en el tracto digestivo de mamíferos (Raikhlin *et al.*, 1975; Bubenik, 2008). No obstante, en peces no se habían realizado estudios previos que permitieran describir una interacción entre la MEL y la funcionalidad gastrointestinal. Por otro lado, como hemos planteado en los dos capítulos anteriores, el hígado y el intestino del carpín poseen osciladores moleculares que pueden regular el ritmo de expresión de dos enzimas clave en la biosíntesis de MEL, la gAANAT-1 y la gAANAT-2. Así, estos osciladores periféricos tendrían una salida en forma de síntesis de MEL, aunque las posibles funciones fisiológicas de esta indolamina sintetizada periféricamente eran desconocidas en el carpín.

El tercer capítulo de la presente Tesis Doctoral tiene como objetivo caracterizar una posible relación funcional entre MEL y la motilidad intestinal en el carpín. Para ello hemos puesto a punto en nuestro laboratorio la metodología del baño de órganos, que nos ha permitido registrar las contracciones del músculo liso intestinal (Anexo I). Con este método hemos caracterizado, por primera vez en el carpín, un ritmo espontáneo de ondas lentas formado por contracciones periódicas con una amplitud de $2,78 \pm 0,32$ mN y una frecuencia de $5,44 \pm 0,12$ ciclos/min. Patrones similares de actividad espontánea del músculo liso intestinal se han descrito en otras especies de teleósteos, como el salmón Chinook (Forgan y Forster, 2007), o el pez cebra (Holmberg *et al.*, 2007), aunque no en la trucha arcoiris (Johansson y Holmgren, 2003). No obstante, resultados no publicados obtenidos muy recientemente en nuestro laboratorio en colaboración con el equipo de investigación dirigido por el Dr. Míguez en la Universidad de Vigo, demuestran

la existencia de esta actividad endógena también en el intestino de la trucha, pudiendo deberse los resultados negativos encontrados previamente a una menor sensibilidad en el sistema de registro utilizado por otros autores.

El sistema de baño de órganos es una técnica experimental muy utilizada en farmacología para cuantificar la fuerza contráctil del músculo liso y su respuesta a fármacos o a estimulación eléctrica. Es un método de alta sensibilidad que registra la respuesta directa del tejido, permitiendo mantener la preparación durante un largo tiempo experimental (hasta 12 horas) gracias a la combinación de una temperatura adecuada estable, una oxigenación continua y un medio salino fisiológico optimizado. Es un método versátil, ya que en función de la posición del tejido permite registrar las contracciones tanto del componente muscular longitudinal como del circular. Además, la visualización y cuantificación de los registros de actividad intestinal se realizan de manera sencilla gracias a su integración a través de un software específico. Sin embargo, limitaciones propias del sistema de registro empleado en estos estudios nos impiden caracterizar otro tipo de patrones de motilidad, como puede ser el complejo motor mioeléctrico (MMC), ya que sería necesario registrar la actividad del intestino completo.

Los patrones del MMC varían en función del estado digestivo del animal (Kunze y Furness, 1999). Aunque en todos los ensayos pertenecientes a este capítulo las muestras de intestino se tomaron de carpines recién alimentados, el carácter de sistema aislado del baño de órganos no posibilita la diferenciación frente al estado interdigestivo, debido a que, previo a la estabilización a la que se somete el tejido, se eliminan todos los restos de alimento remanente en el interior del lumen, y durante todo el ensayo la preparación está inmersa en una solución con concentraciones constantes de glucosa y sales, no variando el entorno metabólico del sistema. Además, la finalidad del MMC es la propagación anterógrada de las contracciones para facilitar el transporte del bolo alimenticio y el vaciado del tubo gastrointestinal (Olsson y Holmgren, 2001). Teniendo en cuenta la longitud total de los intestinos empleados en estos ensayos ($21,7 \pm 2,3$ cm), los segmentos de 1 cm utilizados en nuestras preparaciones no son suficientes para observar dicha propagación. Este estudio se suele realizar con otras aproximaciones metodológicas que permitan analizar la totalidad del tubo digestivo, situación

que, por ejemplo en el caso del pez cebra se puede hacer *in vivo* y mediante técnicas no invasivas debido a la semitransparencia de su cuerpo (Field *et al.*, 2009). Así, en peces estos patrones de MMC se han descrito en larvas de pez cebra (Holmberg *et al.*, 2007) y en bacalao (Karila y Holmgren, 1995).

El pez cebra es la especie de pez más utilizada en investigación básica en general y en particular en el estudio del desarrollo y la fisiología intestinal (Olsson *et al.*, 2008; Rich, 2009). En esta especie se han identificado las llamadas células intersticiales de Cajal (ICCs) (Rich *et al.*, 2007), responsables del tono miogénico de ondas lentas del músculo liso intestinal de vertebrados (Sanders *et al.*, 2006). Así, podemos atribuir el perfil de contracciones rítmicas observado en las preparaciones de músculo liso intestinal de carpín y descrito en el tercer capítulo de esta Tesis a la actividad de estas ICCs.

En mamíferos, se han descrito efectos directos de la MEL sobre las contracciones espontáneas observadas en preparaciones aisladas de músculo liso intestinal, reduciendo la frecuencia, pero no la amplitud de las mismas (Bubenik, 1986; Harlow y Weekly, 1986). En el caso del intestino del carpín, esta acción directa no se ha observado ni sobre la frecuencia ni sobre la amplitud de las contracciones espontáneas, lo cual en principio descartaría a las ICCs generadoras de ondas lentas como dianas para la acción de la MEL en situación de actividad basal.

No obstante, en mamíferos también se han descrito acciones de la MEL sobre el efecto de otros agentes reguladores de la motilidad intestinal, particularmente contrarrestando el efecto contráctil de la serotonina (Bubenik, 1986; Harlow y Weekly, 1986; Reyes-Vázquez *et al.*, 1997). Con el objeto de estudiar el posible efecto regulador de la MEL sobre las funciones desempeñadas por los principales mediadores de contracción en el músculo liso intestinal del carpín, en primer lugar caracterizamos la acción contráctil de dichos mediadores, ACh y 5HT.

La ACh procedente de las motoneuronas excitadoras del sistema parasimpático y del sistema entérico constituye el principal neurotransmisor implicado en la contracción en el músculo liso intestinal de vertebrados (Mandl y Kiss, 2007). En el carpín hemos encontrado una respuesta contráctil dependiente de la concentración por parte de las preparaciones intestinales tras la adición de ACh, lo que sugiere un efecto directo de este

neurotransmisor sobre los receptores muscarínicos de las células musculares. Junto a este incremento del tono contráctil, se produce un incremento de la frecuencia y una ligera disminución de la amplitud de las ondas lentas. En mamíferos, esta alteración del tono miógeno parece estar mediada por un subtipo de receptores muscarínicos, los M3, localizados en las ICCs (Lecci *et al.*, 2002). Estudios farmacológicos pioneros identificaron la presencia de receptores muscarínicos y nicotínicos en intestino aislado de carpín, aunque no se caracterizaron los distintos subtipos (Ito y Kuriyama, 1971). Trabajos recientes realizados en otro teleósteo, la tilapia, han identificado el ARNm de cinco subtipos de receptores muscarínicos en las distintas regiones del intestino, y mediante aproximaciones farmacológicas han atribuido el efecto contráctil de la ACh en el músculo liso intestinal a los subtipos M1 y M3 (Seo *et al.*, 2009). Estas evidencias apoyan la conclusión de que la motilidad inducida por ACh en el músculo liso intestinal del carpín estaría mediada por receptores muscarínicos situados a nivel local, en las células musculares y probablemente en las ICCs.

La 5HT en el intestino de los mamíferos se sintetiza y secreta mayoritariamente en las células enterocromafines (EC), siendo la 5HT de origen neural mucho más escasa. En varias especies de peces, incluyendo el carpín, estas EC están muy reducidas en número o son inexistentes, por tanto la 5HT intestinal procede mayoritariamente de proyecciones neurales serotoninérgicas desde los plexos nerviosos hacia la mucosa (Anderson y Campbell, 1988; Olsson *et al.*, 2008). Esta inervación serotoninérgica está implicada en la regulación de la motilidad intestinal (Beattie y Smith, 2008). La acción contráctil de la 5HT sobre las preparaciones intestinales de carpín es más lenta y prolongada que la inducida por la ACh, y también afecta a la actividad miogénica espontánea, aumentando la frecuencia y la amplitud de las ondas lentas, lo que sugiere la presencia de receptores específicos sobre las ICCs, en las células musculares, o más bien sobre las neuronas colinérgicas, aunque no se puede excluir que la 5HT esté actuando a todos estos niveles. En especies como la carpa (Kitazawa *et al.*, 1990), el bacalao (Karila *et al.*, 1998), la trucha (Burnstock, 1958) o el carpín (Kiliaan *et al.*, 1989; presentes resultados), la acción contráctil de la 5HT se ve disminuida total o parcialmente en presencia de atropina, antagonista general de los

receptores muscarínicos colinérgicos. Este resultado apoyaría una posible localización de los receptores de 5HT en neuronas colinérgicas del intestino del carpín.

Este efecto indirecto de la 5HT sobre la motilidad intestinal de esta especie se confirma, además, con otros resultados obtenidos en la presente Tesis en los que utilizamos un medio de incubación sin calcio. En este supuesto experimental se modeliza la ausencia de calcio extracelular, situación en la que los procesos de exocitosis en las sinapsis están bloqueados. En las preparaciones de músculo liso intestinal del carpín incubadas en un medio sin calcio, la ACh genera una contracción significativa. Este efecto no se aprecia tras la adición de 5HT al baño, en las mismas condiciones, sugiriendo que la contracción serotoninérgica se produce en realidad como consecuencia del aumento de la liberación por exocitosis de otro neurotransmisor, presumiblemente la ACh. El hecho de que en ausencia de calcio extracelular la ACh siga produciendo una contracción significativa, aunque menor que en presencia de calcio extracelular, sugiere un papel complejo de este catión durante la contracción de músculo intestinal. En definitiva, tanto el calcio extracelular como el almacenado intracelularmente son necesarios para que se desarrolle la contracción colinérgica de forma completa.

Respecto al subtipo de receptor implicado en la acción intestinal de la 5HT, en mamíferos se han identificado los subtipos 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT₂, 5-HT₃ y 5-HT₄ como principales implicados en la contracción serotoninérgica en el tracto gastrointestinal, aunque también se han identificado otros, como el 5HT₇, mucho menos conocidos (Gershon y Tack, 2007). Esta gran variedad de subtipos de receptores así como su distribución diferencial a lo largo del tracto gastrointestinal justifica las complejas funciones que lleva a cabo la 5HT en el proceso digestivo.

El escaso conocimiento actual de la farmacología serotoninérgica en peces no nos permite asignar el subtipo de receptor relacionado en la regulación de la motilidad intestinal del carpín, ya que aparentemente los subtipos localizados en el intestino del carpín difieren farmacológicamente de los descritos en los mamíferos. No obstante, los resultados obtenidos con los agonistas y antagonistas empleados, especialmente los de amplio espectro, nos han llevado a la conclusión de que existen al menos dos subtipos de

receptores de membrana que, en función de la respuesta a los diferentes fármacos, podemos clasificar como 5HT₄-like, más sensible a la 5-metoxitriptamina, y 5HT₇-like, con mayor afinidad por la 5-carboxamidotriptamina. Recientemente se han obtenido las secuencias parciales de algunos subtipos de receptores de 5HT en el carpín, incluido el 5HT₇, aunque no se ha estudiado su patrón de expresión tisular (Popesku *et al.*, 2008). Así, la existencia de este receptor en el carpín junto con los resultados farmacológicos obtenidos en nuestros estudios reforzaría su papel como uno de los subtipos mediadores de la respuesta contráctil inducida por la 5HT en el músculo liso intestinal de este teleósteo.

La MEL ejerce un efecto relajante dependiente de la concentración en la contracción mediada tanto por ACh como 5HT en las preparaciones intestinales del carpín. Estos resultados apuntan a esta neurohormona como un agente regulador de la motilidad intestinal en este teleósteo. Trabajos previos habían descrito una acción anoréctica de la MEL en peces inyectados periféricamente (Pinillos *et al.*, 2001; López-Olmeda *et al.*, 2006a), así como una reducción del peso corporal con tratamientos crónicos (De Pedro *et al.*, 2008). La relajación mediada por la MEL a nivel local en el músculo liso intestinal del carpín podría producir un retraso en el vaciamiento del tubo digestivo, que generaría una señal periférica de saciedad, justificando la reducción en la ingesta de alimento observada tras la inyección intraperitoneal con MEL exógena.

Además, y como mencionamos anteriormente, el efecto relajante mediado por la MEL muestra un claro perfil dependiente de la concentración, al igual que el observado tras la adición del agonista 2-iodomelatonina. Dicha relajación se revierte en presencia de los antagonistas melatoninérgicos, luzindol y 4-P-PDOT. Estos resultados confirman una especificidad del efecto de la MEL a nivel intestinal, que estaría mediado por receptores de membrana situados localmente. Las evidencias obtenidas en la presente Tesis Doctoral sugieren la existencia de, al menos, dos subtipos de receptores melatoninérgicos, o (al menos) dos sitios de unión para MEL, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. Sitios de unión de MEL se han encontrado en el tracto gastrointestinal de diversas especies de aves y mamíferos (Lee y Pang, 1993; Pontoire *et al.*, 1993; Poon *et al.*, 1997; Sallinen *et al.*, 2005). En los peces, con técnicas moleculares se han identificado receptores de MEL en

el intestino de *D. labrax* (Sauzet *et al.*, 2008) y *T. niphobles* (Ikegami *et al.*, 2009b). La reciente clonación de las secuencias parciales de los receptores de MEL en el carpín (Ikegami *et al.*, 2009a) ha permitido la identificación del subtipo Mel1a 1.4 (o MT1 1.4) en el intestino de esta especie. No obstante, aunque esta primera aproximación molecular no ha producido un resultado positivo con el receptor Mel1b (o MT2), nuestros resultados farmacológicos en el baño de órganos apuntan a su existencia también en este tejido, ya que el 4-P-PDOT, antagonista preferente del MT2, revierte el 60% de la relajación de la MEL sobre la contracción colinérgica, y el 80% sobre la serotoninérgica.

Por último, en este capítulo hemos tratado de profundizar en el estudio del mecanismo de acción subyacente a la relajación intestinal inducida por la MEL. En los ya citados ensayos utilizando un medio sin calcio en las cámaras del baño de órganos, se observó un bloqueo total del efecto relajante de la MEL sobre la contracción colinérgica, poniendo de manifiesto una dependencia del calcio extracelular. El papel del calcio extracelular en la acción de la MEL sobre el músculo liso es desconocido, aunque se han encontrado evidencias de esta relación en otros modelos experimentales. Por ejemplo, en músculo liso de aorta de rata se observó una inhibición de la respuesta a la 5HT tras la administración de altas dosis de MEL por bloqueo del flujo de calcio (Satake *et al.*, 1986), así como una inhibición de la respuesta a KCl (Monroe y Watts, 1998). No obstante, estos resultados en la aorta son atribuidos a un efecto inespecífico de la MEL, dado que sólo se observan con concentraciones suprafisiológicas, y no se bloquean con antagonistas melatoninérgicos. Por otro lado, en músculo liso gástrico de rata, el efecto inhibitorio de la MEL sobre la contracción inducida por 5HT se bloquea parcialmente en presencia de apamina, antagonista específico de los canales de potasio dependientes de calcio (Storr *et al.*, 2000).

La implicación de canales de potasio dependientes de calcio en los efectos de la MEL apoyaría nuestros resultados en el músculo liso intestinal del carpín. En condiciones basales, la MEL no tiene efectos significativos sobre el ritmo miogénico, debido al estado relativamente polarizado de las membranas musculares en reposo, que coincide con un estado inactivo de los canales de potasio provocado por los niveles de calcio bajos en el citosol. Durante la contracción muscular, el calcio citosólico aumenta, y los canales de potasio

estarían receptivos a la modulación por la MEL, produciéndose su mayor activación. Un flujo mayor de potasio hacia el exterior provocaría la consiguiente repolarización de las células musculares acelerando su marcha hacia la situación de reposo, explicándose así la relajación muscular ejercida por la MEL (Figura 13). En este momento se desconoce el mecanismo de acción intracelular que conectaría la unión de la MEL a su receptor y la regulación del canal de potasio dependiente de calcio.

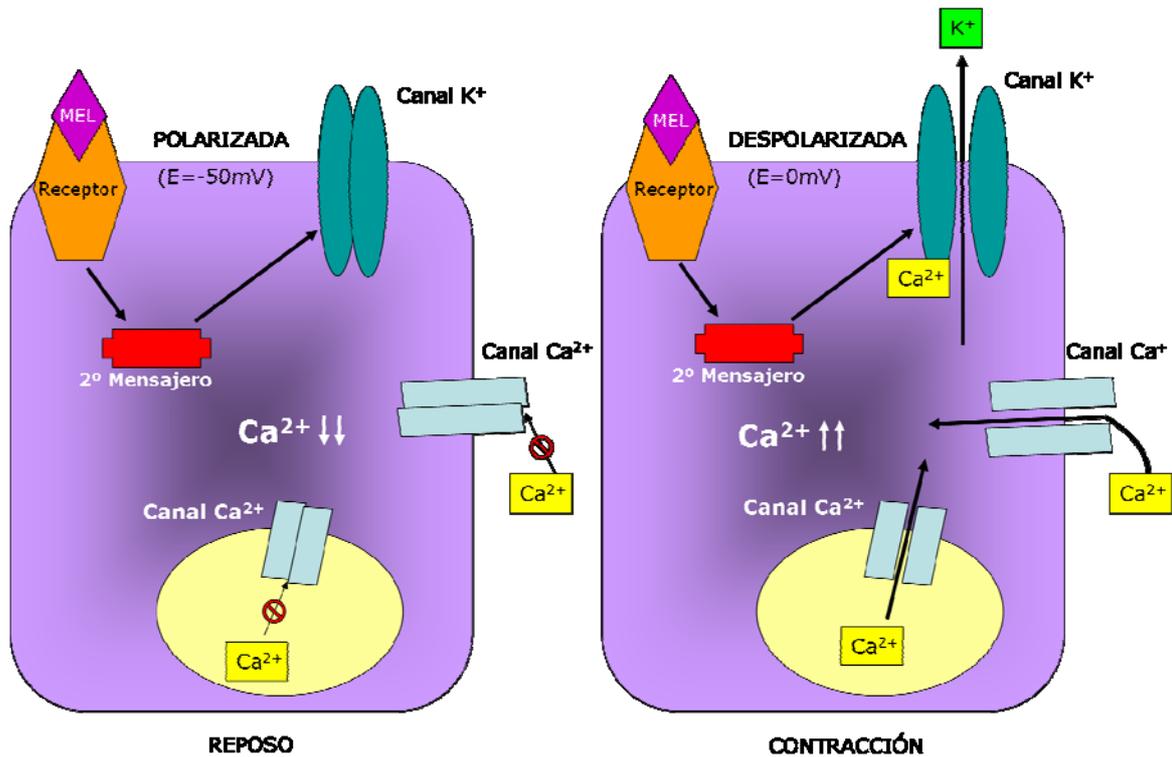


Figura 13. Esquema propuesto para la acción dependiente de calcio de la melatonina sobre músculo intestinal contraído de *Carassius auratus*. En un estado de reposo, el canal de potasio dependiente de calcio está inactivo. Durante la contracción, aumenta el calcio intracelular y se activa el canal de potasio. El mecanismo de acción de la melatonina implicaría el cierre de este canal de potasio, repolarizando la membrana.

No obstante, el papel del calcio en la relajación mediada por MEL podría estar revelando la participación de algún otro agente mediador de relajación que se libere por un proceso de exocitosis dependiente de calcio. El VIP, el PACAP y el óxido nítrico (NO) son los principales relajantes del músculo liso intestinal de vertebrados, incluyendo los peces (Olsson y Holmgren, 2001). En el presente capítulo y con el objetivo de abordar esta cuestión, nos centramos en la posible implicación del NO. Este neurotransmisor es el principal agente

inhibidor de la contracción del músculo circular y longitudinal del intestino de rata, donde su mecanismo de acción parece coincidir con el anteriormente propuesto para la MEL, es decir, activador de canales de potasio dependientes de calcio y sensibles a apamina (Tanovic *et al.*, 2001; Vanneste *et al.*, 2004). Por otro lado, algunos estudios en rata han sugerido la posibilidad de que el efecto de la MEL estuviera mediado por NO, especialmente en lo que respecta al efecto anticonvulsivo de esta indolamina en cuadros de epilepsia (Yahyavi-Firouz-Abadi *et al.*, 2006), y como refuerzo de las propiedades de la morfina (Yahyavi-Firouz-Abadi *et al.*, 2007). Sin embargo, la interacción de ambas moléculas en el músculo liso no ha sido investigada hasta el momento. En el único estudio disponible sobre relajación inducida por MEL y mediada por NO en el músculo liso intestinal de rata, la MEL inhibe la óxido nítrico sintetasa, enzima responsable de la síntesis de NO (Storr *et al.*, 2002). En nuestros resultados en el carpín, ninguno de los fármacos empleados, incluyendo donantes de NO e inhibidores de su síntesis, modificó el efecto producido por la MEL sobre la contracción colinérgica, descartando la implicación de la ruta nitrérgica en el mecanismo de acción de la hormona. Sin embargo, no podemos excluir la liberación de algún otro mediador de la relajación, como por ejemplo el VIP, cuya secreción en la rata se estimula en respuesta a MEL para disminuir las contracciones adrenérgicas en el aparato reproductor (Olmez y Kurcer, 2003), o incluso el PACAP, aunque sobre este último no se dispone de ninguna evidencia que lo relacione con el mecanismo de acción de la MEL.

Lo que sí hemos podido determinar en nuestro estudio es la existencia de un tono nitrérgico endógeno regulador de la actividad intestinal en el carpín, coincidiendo con los resultados previamente obtenidos en mamíferos (Toda y Herman, 2005) y en el pez cebra (Holmberg *et al.*, 2006), y que han llevado a la conclusión de que, en los peces, la actividad espontánea de la motilidad intestinal es consecuencia de un balance entre los sistemas nitrérgico y colinérgico (Holmberg *et al.*, 2006).

Como conclusión podemos afirmar que en el músculo liso intestinal del carpín existe un ritmo espontáneo de ondas lentas generado por ICCs y controlado por un tono nitrérgico y un tono colinérgico endógenos, sobre el que no parece actuar la MEL. La MEL, sin embargo, interviene actuando a

través de receptores específicos posiblemente localizados en neuronas colinérgicas y serotoninérgicas del sistema nervioso entérico, o más probablemente de forma directa en las células musculares, produciendo una relajación que se opone a la contracción mediada por estos dos sistemas en un proceso dependiente del calcio extracelular. Esta MEL sería, al menos en parte, de origen local, se sintetizaría en las células del epitelio intestinal, donde coexiste con su precursor, la 5HT, y con las enzimas responsables de su síntesis, y actuaría de manera paracrina o autocrina sobre receptores melatoninérgicos del intestino anterior del carpín. Además, la síntesis de esta MEL intestinal se produciría de manera más específica en el intestino posterior, siendo su actividad mayor durante el día en una especie diurna, como el carpín, pudiendo alcanzar sus dianas de acción en el intestino anterior a través de la circulación enterohepática. Este patrón de síntesis diaria sería generado por osciladores periféricos localizados en el tracto intestinal del carpín y que parecen estar dotados de capacidad para sincronizarse a estímulos no fóticos, como el horario de alimentación (Figura 14).

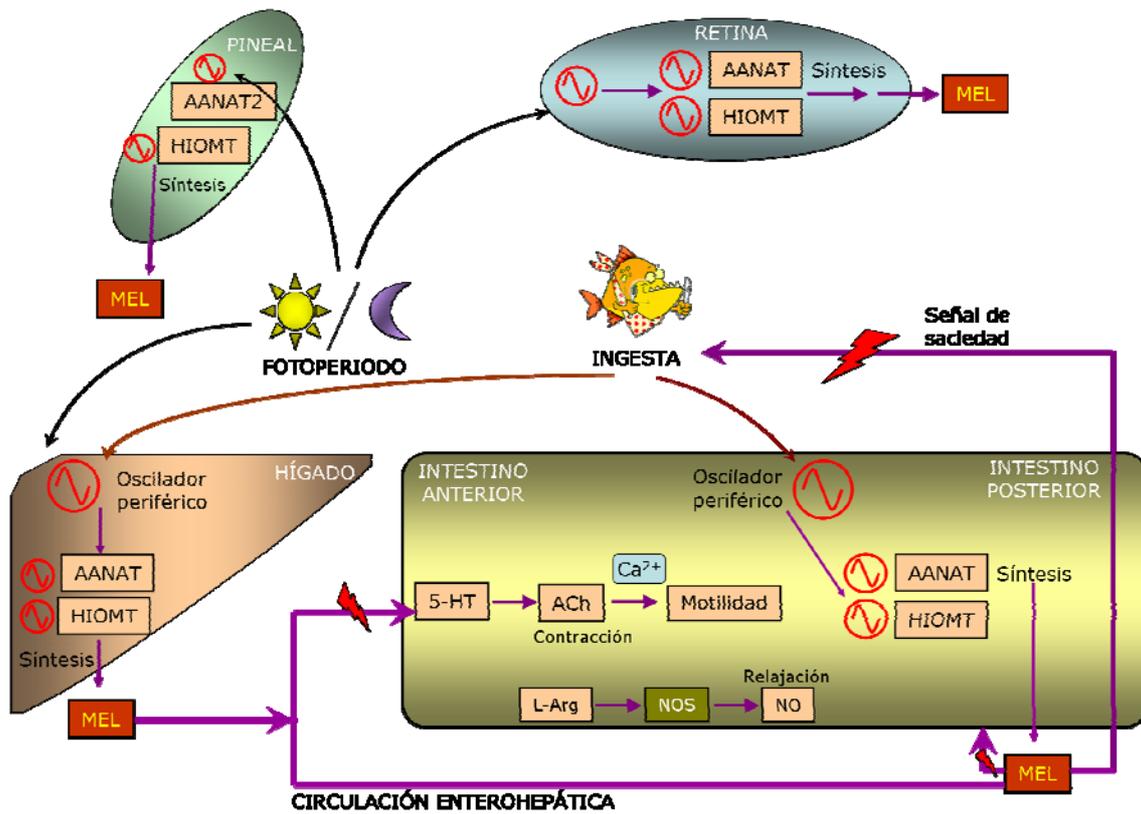


Figura 14. Esquema representativo de los principales resultados de la presente Tesis Doctoral. En el carpín puede ocurrir síntesis de melatonina en estructuras fotosensibles (pineal y retina) y en órganos periféricos (hígado e intestino). Las enzimas de síntesis de esta hormona están controladas por osciladores locales que pueden sincronizarse a la luz, en el caso de la pineal, la retina y el hígado, o a la alimentación, en el caso del intestino y el hígado. En el intestino del carpín, la síntesis de melatonina se concentra en la parte posterior, pudiendo actuar bien de manera local o bien entrando a la circulación enterohepática para ejercer su acción en la motilidad del intestino anterior.

V. CONCLUSIONES

Los trabajos realizados en la presente Tesis Doctoral nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. Los genes reloj correspondientes al bucle de retroalimentación negativo del reloj molecular de vertebrados (*Period* y *Cryptochrome*) se expresan en la retina, el hígado y el intestino del carpín (*Carassius auratus*). Las variaciones diarias en los niveles de expresión de estos genes indican, por primera vez en los peces, la existencia de osciladores circadianos endógenos en estas localizaciones periféricas.
2. Las diferencias encontradas en los parámetros cronobiológicos que definen los ritmos de expresión de los genes reloj, estudiados en un diseño experimental con un horario fijo de alimentación diaria, sugieren una sincronización de los osciladores periféricos del hígado e intestino del carpín a estímulos no fóticos, como por ejemplo, la hora diaria de alimentación.
3. La expresión génica de las enzimas de la ruta de síntesis de melatonina, *gAanat-2* y *gHiomt-2*, sigue un ritmo diario en la glándula pineal, la retina, el hígado y el intestino posterior del carpín. Los ritmos de expresión de la *gAanat-2* están generados por osciladores endógenos en todos los tejidos mencionados, ya que se siguen manifestando en condiciones constantes de luz u oscuridad pudiendo considerarse, por tanto, genes controlados por el reloj molecular del carpín.
4. Los ritmos circadianos de expresión de la enzima *gAanat-2* son dependientes de la luz en la glándula pineal, la retina y el hígado, y su amplitud se reduce en condiciones constantes de luz u oscuridad. En cambio, los ritmos diarios de expresión de la enzima *gAanat-2* en el intestino posterior son independientes de la luz, ya que sus parámetros circadianos se mantienen en distintas condiciones de iluminación, lo que sugiere una sincronización a estímulos no fóticos.
5. Nuestros resultados demuestran que la retina, el hígado y el intestino posterior del carpín presentan actividad AANAT *in vitro*. Esta actividad es atribuible en una proporción variable, en función del tejido, a las isoenzimas AANAT-1 y AANAT-2. Las variaciones día/noche halladas en el hígado y el intestino apoyan la síntesis rítmica de melatonina en el

sistema digestivo, y nos permiten proponer a dicha síntesis como vía de salida de los osciladores periféricos en el carpín.

6. En el intestino del carpín existe un patrón longitudinal, tanto en la expresión de la *gAanat-1* y la *gAanat-2* como en la actividad enzimática AANAT, siendo mayores en el intestino posterior que en el anterior, confirmando las diferencias funcionales regionales descritas en esta Memoria.
7. La melatonina ejerce una relajación parcial, independiente del sistema nitrérgico y dependiente de calcio, de las contracciones inducidas por acetilcolina del músculo liso intestinal del carpín. Este efecto relajante está mediado por, al menos, dos subtipos distintos de receptores de membrana específicos situados a nivel local. La melatonina no modifica la actividad miogénica espontánea del músculo liso intestinal, descartando a las células intersticiales de Cajal como dianas directas de su acción, al menos en situación de reposo.
8. La serotonina induce una contracción específica del músculo liso intestinal del carpín, dependiente de calcio, bloqueada por atropina y que afecta al tono miógeno basal, indicando un control indirecto de la 5HT en la contractilidad del músculo liso intestinal a través de una activación colinérgica.
9. En base a la caracterización farmacológica realizada, y a los resultados de relajación por melatonina de la contracción serotoninérgica en el carpín, proponemos la implicación de, al menos dos subtipos de receptores de serotonina en la regulación de la motilidad intestinal, clasificados provisionalmente como 5HT₄-like y 5HT₇-like.
10. Como conclusión global, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral nos permiten señalar al carpín como un modelo idóneo para el estudio de las características funcionales de los osciladores periféricos, proponiendo la existencia de dichos osciladores en el hígado y el intestino. Dichos osciladores podrían controlar la expresión de los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis de melatonina, pudiendo la ritmicidad de esta hormona funcionar como vía de salida de dichos relojes periféricos.

VI. ANEXOS METODOLÓGICOS

ANEXO METODOLÓGICO I.

BAÑO DE ÓRGANOS.

I.1. Principios generales del ensayo.

El baño de órganos es una técnica ampliamente utilizada en fisiología y farmacología que permite medir la fuerza contráctil de preparaciones aisladas de músculo liso, así como su respuesta tanto a la adición de fármacos como a la estimulación eléctrica (Velasco Martín, 2001).

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado esta técnica para evaluar la actividad contráctil del músculo liso intestinal del carpín (Figura I). Esta técnica es muy común en el estudio de la motilidad intestinal, ya que permite caracterizar la actividad muscular tanto del componente circular como del componente longitudinal, en función de la posición del intestino aislado en la preparación (Sarr *et al.*, 2001).

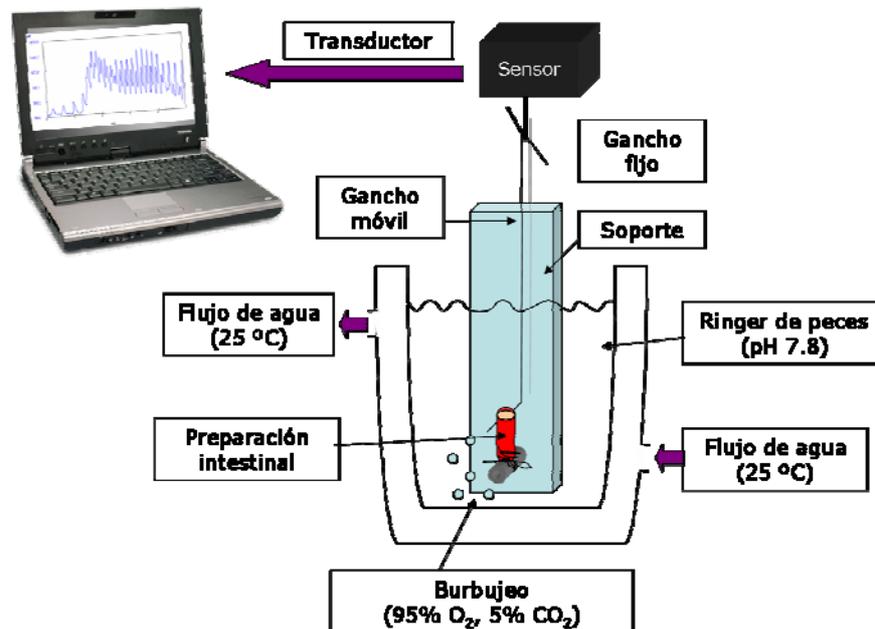


Figura I. Representación esquemática del sistema de baño de órganos empleado en la presente Tesis Doctoral.

Una ventaja esencial que presenta esta técnica es que permite mantener el tejido funcional durante mucho tiempo, gracias a la utilización de cámaras de vidrio de doble pared (Figura 1) en cuyo interior contienen un medio salino fisiológico (Ringer de peces) burbujeado continuamente con carbógeno (O₂

95%, CO₂ 5%) y en el interior de la doble pared circula un flujo continuo de agua que mantiene el medio interno de la cámara a una temperatura constante (Hollands, 1974).

I.2. Procedimiento.

❖ Preparación del tejido.

Ringer de peces, pH 7,8

- NaCl 140 mM	8,18 g/l
- KCl 2,5 mM	186,4 mg/l
- CaCl ₂ 1,5 mM	166,5 mg/l
- MgSO ₄ 0,8 mM	197,2 mg/l
- NaHCO ₃ 15 mM	1,26 g/l
- KH ₂ PO ₄ 1 mM	136,1 mg/l
- Hepes 5 mM	1,19 g/l
- Glucosa 10 mM	1,80 g/l

Disolver en H₂O destilada y ajustar el pH a 7,8 con NaOH 10% (p/v).

- o Llenar las cámaras del baño con 10 ml de medio cada una. Atemperar las cámaras y un matraz Erlenmeyer con 500 ml del Ringer a 25°C durante 15 min, burbujeando con carbógeno. Encender los sistemas de transducción (Pre205, Cibertec) y el ordenador con el software de registro (ADQ2C, CromaNec).
- o Preparar el material de disección y una placa Petri con medio atemperado y burbujeado.
- o Pesar al animal y anestesiarse en hielo.
- o Sacrificar por decapitación, abrir la cavidad abdominal y extraer el intestino anterior.
- o Colocar inmediatamente el fragmento intestinal en la placa Petri, y limpiar los restos de tejido adiposo y alimento que puedan quedar tanto en el exterior como en la luz del intestino. Burbujear el medio.
- o Cortar el intestino anterior en segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud.
- o Para montar la preparación en sentido circular, introducir en la luz del intestino la parte metálica del soporte y el gancho móvil. Para montar la preparación en sentido longitudinal, cerrar mediante ligadura con

hilo de sutura uno de los extremos del segmento intestinal, y aprovechar los cabos del hilo para fijarlo al alambre fijo del soporte. Fijar por punción el otro extremo del segmento intestinal al gancho móvil.

- Introducir la preparación en la cámara y ajustar la tensión.

❖ Ajuste de la tensión.

Aplicar la tensión óptima a la preparación es fundamental para un correcto registro de la actividad contráctil, lo que no sería posible con un músculo demasiado laxo o demasiado tenso. La tensión óptima estimada para el carpín es de 10 mN, que equivale aproximadamente a 1 g de peso.

Para aplicar esta tensión a las preparaciones, antes de la obtención de las muestras se colgará del sensor de cada cámara una pesa de 1 g. Esta pesa genera una respuesta en el sistema de adquisición de datos, según la correspondencia $1\text{ g} = 500\text{ mV}$. Utilizando la llave "balance" del transductor, llevamos la señal producida por la pesa a 0 mV. Al retirar la pesa, la señal mostrada en la pantalla del ordenador será -500 mV.

Al colgar el alambre móvil de la preparación al sensor, se generará una nueva señal de respuesta en el sistema de adquisición de datos. Para asegurar que el tejido está sometido a la tensión de 10 mN, esa señal tiene que estar en 0 mV. Para ello, aumentaremos o disminuirémos la tensión utilizando el tornillo micrométrico situado por encima del sensor (Figura II).

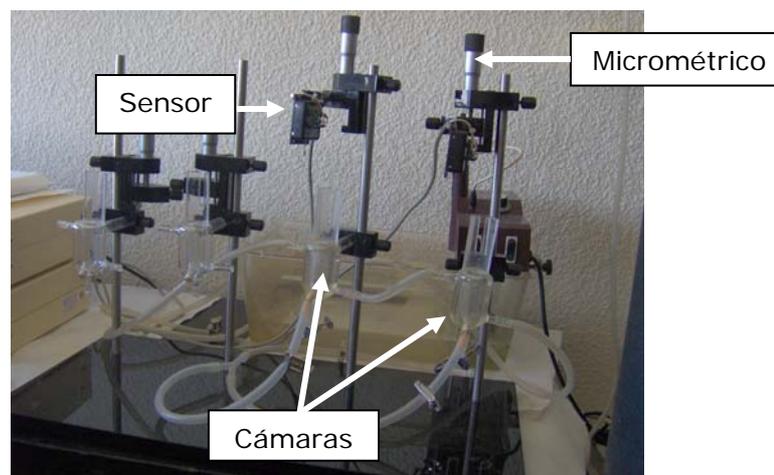


Figura II. Fotografía del sistema del baño de órganos utilizado mostrando los sensores, las cámaras y los tornillos micrométricos de ajuste de la tensión.

Al alcanzar la preparación la tensión deseada, se permite un tiempo de estabilización del tejido de 1 hora. Durante este tiempo, habrá que monitorizar el estado de la tensión periódicamente, y volver a ajustarla con el micrométrico si es necesario.

❖ Soluciones madre de los agonistas y fármacos empleados.

Los agonistas y fármacos se van a incorporar a las cámaras en alícuotas de 100 μ l, de manera que hay que tener en cuenta que estaremos diluyendo 100 veces la concentración que se añade, ya que el volumen de la cámara es de 10 ml. Todas las soluciones madre se preparan a 10 mM en H₂O, y a partir de ella se realizan diluciones seriadas con un factor de dilución 1:10.

Los fármacos no solubles en agua pero solubles en etanol absoluto (EtOH), como la melatonina, la 5-metoxitriptamina o el luzindol, se disuelven primero en una pequeña cantidad de EtOH, y se completa con agua hasta 10 mM (concentración final de etanol en el baño 0.05%). Los fármacos solubles en dimetil sulfóxido (DMSO), como el granisetron, se prepararon directamente a 10 mM en DMSO, realizando las siguientes diluciones en H₂O (concentración máxima de DMSO en el baño 0.1%). En el caso de la atropina, se acidificó ligeramente el H₂O con una gota de HCl 1N para conseguir su solubilización completa.

❖ Diseños experimentales.

1. Registro basal. Tiempo de registro: 5 min

No se añade ningún fármaco.

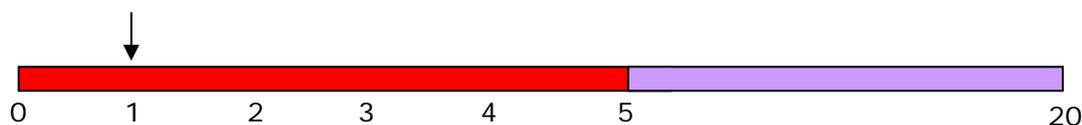
2. Estimulación. Tiempo de registro: 5 min

En el minuto 1 se incorpora a las cámaras la concentración deseada del agonista ó del fármaco (100 μ l).

Para realizar una curva concentración-respuesta no acumulativa, se comienza con el registro de la concentración más baja preparada en el banco de diluciones. Transcurridos 5 min de registro, se lava la preparación renovando el medio de las cámaras dos veces. Dejar un periodo de estabilización de 15 min antes de realizar el siguiente registro (Figura IIIa).

Para obtener una curva acumulativa, se van incorporando las diluciones seriadas del fármaco en sentido creciente de concentración durante el tiempo de registro, sin lavar la preparación entre cada dos concentraciones sucesivas (Figura IIIb).

a) Curva no acumulativa



b) Curva acumulativa

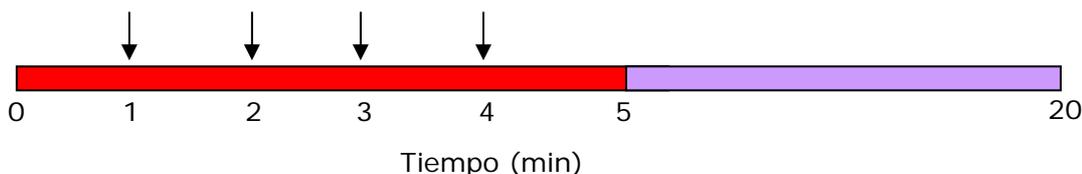


Figura III. Esquema del diseño empleado para la adición al baño de órganos de fármacos estimulantes, tanto para curvas no acumulativas (a) como acumulativas (b). Los cuadros rojos representan el tiempo de registro y los violetas el período de recuperación y renovación del medio de las cámaras. Las flechas indican el momento de adición del fármaco.

3. Bloqueo. Tiempo de registro: 15 min

Se incorpora a las cámaras la concentración deseada del antagonista o bloqueante al inicio del ensayo (100 μ l). Incubar durante 10 min.

En el minuto 10, añadir el fármaco estimulante (100 μ l).

Para realizar un ensayo concentración-respuesta, se establece una concentración fija de fármaco estimulante, y se añade el bloqueante en sentido creciente de concentración, una única concentración por cada registro. Entre cada dos registros consecutivos, al finalizar los 15 min, lavar la preparación renovando el medio salino 2-3 veces y permitir una estabilización del tejido durante 15 min antes de ensayar la siguiente concentración del bloqueante (Figura IV).

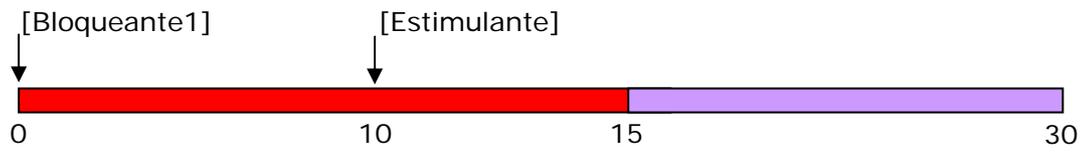
Bloqueo

Figura IV. Esquema del diseño empleado para la adición al baño de órganos de fármacos bloqueantes. El cuadro rojo representa el tiempo de registro y el violeta el período de recuperación y renovación del medio de las cámaras. Las flechas indican el momento de adición de los fármacos.

ANEXO METODOLÓGICO II.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA (HPLC-FD).

II.1. Principios generales del ensayo.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación de compuestos en la que los componentes de una mezcla disueltos en una fase móvil se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria, que ejerce de matriz de retención frente al empuje mecánico de la fase móvil (García-Segura *et al.*, 1996). En los ensayos realizados en esta Tesis Doctoral se ha utilizado un tipo de cromatografía denominada de fase reversa, en la cual se usa una fase móvil polar con un disolvente orgánico, el acetonitrilo, de forma que es la hidrofobicidad/hidrofilia propia de cada molécula la que determina su mayor/menor retención en la fase estacionaria.

El detector de fluorescencia utilizado en nuestro caso utiliza la capacidad del compuesto a medir, la *N*-acetiltriptamina, para emitir fluorescencia a una longitud de onda determinada debido a la presencia de anillos aromáticos de naturaleza indólica en su estructura (Douglas *et al.*, 2005).

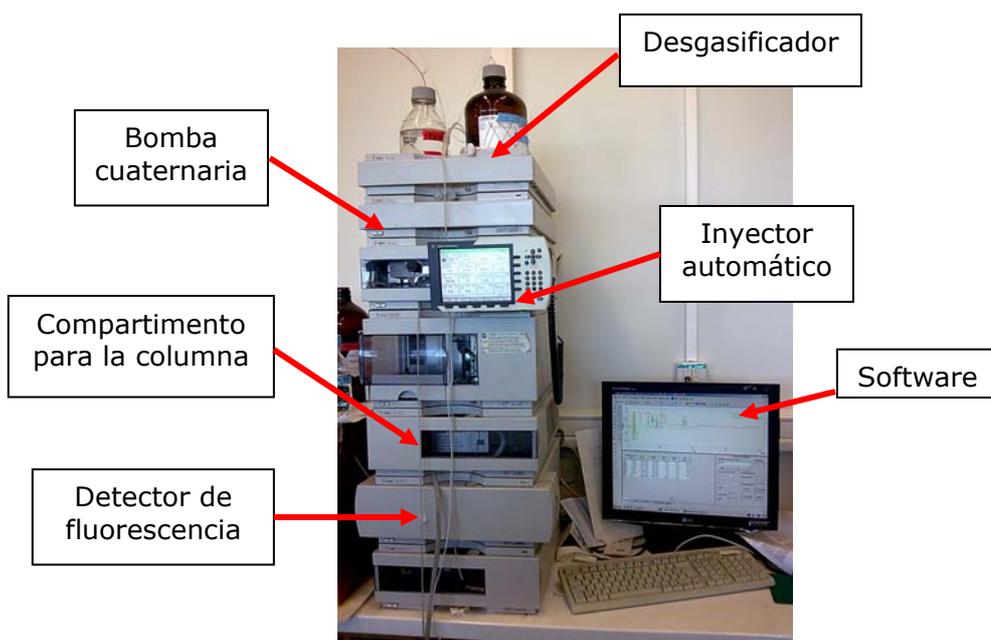


Figura V. Fotografía del equipo de HPLC utilizado en los ensayos correspondientes a la presente Tesis Doctoral (Agilent, serie 1100).

Este método fue puesto a punto por Thomas y colaboradores (1990), poniendo de manifiesto la idoneidad del sistema de detección por fluorescencia frente a la electroquímica debido a la mayor sencillez en la obtención y procesamiento de las muestras, al evitar la extracción orgánica del producto formado enzimáticamente. Además, es más sensible que los métodos utilizados clásicamente empleando isótopos radiactivos.

II.2. Reacción enzimática.

❖ Homogeneización.

Tampón fosfato sódico (TP) 250 mM, pH 6,5

- NaH_2PO_4 2,76 g
- Na_2HPO_4 0,89 g
- H_2O 100 ml

Ajustar el pH a 6,5 con NaOH al 10% (p/v)

Tampón EGTA 10 mM

- EGTA 76,1 mg
- TP 10 ml

Pesar los tejidos y sonicarlos en tres volúmenes de tampón EGTA. Centrifugar durante 10 min a 13.000 g y reservar una alícuota del homogeneizado para la posterior valoración de proteínas.

❖ Incubación.

Reactivos (soluciones madre preparadas en TP):

- Sustratos e inhibidores

- Triptamina 1,2 mM
- Acetil coenzima A (ACoA) 4 mM
- Serotonina (5HT) 8 mM
- 5-metoxitriptamina (5MT) 8 mM
- Fenetidina 40 mM
- Ácido fólico 20 mM
- Tiramina 400 mM

- PCA 2 N (disolver en el siguiente orden)

- H_2O 78,27 ml

Bisulfito sódico	24,96 mg
EDTA-Na	89,40 mg
Ácido perclórico 60%	21,73 ml

Diseño de los ensayos: Volumen final constante de 100 μ l.

Ensayo	Homogeneizado	ACoA	Sustrato	Resto
Estándar	25 μ l	25 μ l	Triptamina 25 μ l	TP 25 μ l
5HT	25 μ l	25 μ l	5HT 25 μ l	TP 25 μ l
5MT	25 μ l	25 μ l	5MT 25 μ l	TP 25 μ l
Ác. Fólico	25 μ l	25 μ l	Triptamina 25 μ l	Ác. Fólico 25 μ l
Fenetidina	25 μ l	25 μ l	Triptamina 25 μ l	Fenetidina 25 μ l
Tiramina	25 μ l	25 μ l	Triptamina 25 μ l	Tiramina 25 μ l

- Temperatura incubación 25 °C.
- Tiempo de incubación 20 min.
- Parar la reacción con 20 μ l de PCA 2N.
- Centrifugar 10 min a 13.000 g.
- Depositar los sobrenadantes (100 μ l) en los viales de HPLC.

II.3. Cuantificación cromatográfica.

❖ Fase móvil.

Para la detección de N-acetilriptamina (NACT) y melatonina (MEL):

- Ácido 1-octanosulfónico (3,3 mM) 712 mg/l
- Ácido fosfórico (50 mM) 3,4 ml/l
- Acetonitrilo (15%) 150 ml/l

Para la detección de N-acetilserotonina (NAS):

- Ácido 1-octanosulfónico (3,3 mM) 712 mg/l
- Ácido fosfórico (50 mM) 3,4 ml/l
- Acetonitrilo (7%) 70 ml/l

En ambos casos, ajustar el pH a 3,5 con NaOH 10N y filtrar a través de filtros de poliamida (Sartorius 0,45 μm , Sartolon).

❖ Preparación de estándares.

NACT: Solución madre (100 mM) en etanol absoluto (conservar a -80°C). Realizar una dilución 1:100 en PCA 2 N para obtener el primer estándar (1 mM).

NAS: Solución madre (1 mM) en PCA 2 N.

MEL: Solución madre (10 mM) en etanol absoluto (conservar a -80°C). Realizar una dilución 1:100 en PCA 2 N para obtener el primer estándar (100 μM).

En los tres casos, las diluciones sucesivas a partir del primer estándar se realizan en PCA 2 N.

❖ Condiciones cromatográficas.

- Bomba peristáltica cuaternaria (Agilent, serie 1100), flujo 1 ml/min.
- Columna de fase reversa C18 (Tracer). Tamaño de partícula: 5 μm . Dimensiones: 125 x 4,6 mm.
- Compartimento de columna termostaticado a 30°C (Agilent, serie 1100).
- Detector de fluorescencia (Agilent, 1100 series):

Para NACT y NAS: $\lambda_{\text{exc.}}$ 285 nm

$\lambda_{\text{em.}}$ 360 nm

Para MEL: $\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm

$\lambda_{\text{em.}}$ 345 nm

- Software cromatográfico *Clarity Chromatography Station for Windows software*, para la obtención de las áreas correspondientes a los picos obtenidos.

❖ Cálculo de los resultados.

Los estándares se utilizan para construir rectas patrón para cada producto de reacción, enfrentando la concentración conocida del estándar al área

obtenida en su análisis cromatográfico. Aplicando la ecuación de la recta obtenida en las muestras, obtenemos la concentración de producto formado.

No obstante, al ser actividad enzimática, dicha concentración tiene que estar expresada por unidad de tiempo (h) y ser corregida por el contenido de proteína en mg. Para expresar la cantidad de producto formado por hora, teniendo en cuenta que el tiempo de reacción son 20 min, se multiplicó la concentración por 3. Para corregir el resultado por el contenido de proteína del tejido, se calculó el contenido proteico mediante el método desarrollado por Lowry y colaboradores (1951) utilizando estándares de albúmina de suero bovino.

ANEXO METODOLÓGICO III.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Las técnicas que se describen a continuación han sido realizadas en el laboratorio del doctor Michael Iuvone en la Universidad de Emory (Atlanta, Estados Unidos) y en el del doctor José Miguel Cerdá-Reverter en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (Castellón).

III.1. Amplificación de secuencias de RNA por retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

❖ Principios generales del ensayo.

La PCR consiste en un conjunto de tratamientos enzimáticos sobre una región del ADN para su amplificación selectiva. El proceso requiere el conocimiento previo de dos regiones cortas que flanqueen la zona a amplificar. Estas regiones cortas se utilizan en la reacción como *primers* o cebadores en la elongación catalizada por una polimerasa (Perera *et al.*, 2002).

La amplificación por PCR del producto de la retrotranscripción de ARNm constituye el método de mayor sensibilidad y flexibilidad de todas las técnicas actuales de análisis del ARN, como la hibridación *in situ* y el Northern blot (Bustin, 2000). Permite comparar los niveles de ARNm entre diferentes muestras, caracterizar patrones de expresión de ARNm, discriminar entre ARNm muy relacionados o analizar la estructura del ARN.

Así, el primer paso a realizar para utilizar esta técnica es la extracción del ARN de la muestra. Como este ARN no puede utilizarse de molde en la PCR, antes de la amplificación se necesita un paso previo de transcripción inversa a ADN complementario (cDNA).

❖ Extracción del ARN.

El método de extracción del ARN total utilizado en los estudios incluidos en esta Memoria es una modificación de la técnica descrita en 1987 por Chomczynski y Sacchi, basado en la utilización de una sal de guanidina para romper las células, solubilizar sus componentes y desnaturalizar las RNAsas endógenas, y de una solución de fenol:cloroformo acidificada para la extracción propiamente dicha. En este caso se utilizó un reactivo comercial

(TRI Reagent, Sigma), que es una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol en la que se solubiliza el tejido, y tras la adición de cloroformo se separa en tres fases: una fase acuosa conteniendo el ARN, una interfase con el ADN y una fase orgánica donde quedan las proteínas.

Protocolo:

1. Homogeneización: homogeneizar los tejidos en TRI Reagent (1ml por cada 50-100 mg tejido, en tejidos centrales 0,5 ml).

2. Separación de fases:

- Incubar el homogeneizado 5 min a temperatura ambiente.
- Añadir 0,2 ml de cloroformo por ml de TRI Reagent.
- Agitar vigorosamente con la mano 15 s.
- Incubar a temperatura ambiente 2-15 min.
- Centrifugar a 12.000g 15 min a 4°C.

3. Precipitación del ARN:

- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
- Añadir a la fase acuosa 0,5 ml de isopropanol por cada ml de TRI Reagent usado en la homogeneización y mezclar.
- Incubar a 4 °C en baño de hielo 5-10 min.
- Centrifugar a 12.000g, 15 min a 4°C.

4. Lavado del ARN:

- Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml EtOH 75% frío (-20°C).
- Resuspender el precipitado con vórtex.
- Centrifugar a 7.500g, 10 minutos a 4°C.

5. Solubilización del ARN:

- Eliminar el EtOH de lavado y secar el precipitado brevemente al aire.
- Resuspender en H₂O DEPC (20 µl).

6. Tratamiento con ADNasa (para eliminar posibles restos de ADN).

Muestra	20 µl
Buffer 10x ADNasa	2,5 µl
RQ1 ADNasa (Promega M6101)	1 µl
RNAsin (Promega N2511)	0,125 µl

DTT 100 mM	0,5 µl
H ₂ O DEPC	0,875 µl

- Incubar 40 min a 37°C.
- Parar la reacción con 5 µl ClNa 5 M.
- Precipitar el ARN con 1 ml EtOH absoluto.
- Centrifugar a 12.000g, 10 min a 4°C.
- Lavar con 500 µl EtOH 75%.
- Centrifugar a 12.000g, 5 min a 4°C.
- Eliminar el EtOH.
- Resuspender en H₂O DEPC en el volumen inicial (20 µl).
- Congelar a -80°C.

❖ Transcripción inversa del ARNm a cDNA.

Sólo una pequeña parte del ARN total extraído, entre el 1-5%, se corresponde con ARNm. No obstante, estas moléculas de ARNm en las células eucariotas se caracterizan por presentar en su extremo 3' una cola de residuos de poliadenina, lo que permite aislarlo de forma más específica (Sambrook y Russell, 2001).

La primera etapa del proceso consiste en la síntesis de la primera cadena del cDNA mediante la acción enzimática de la transcriptasa inversa sobre el ARNm. Para ello se utilizaron como cebadores los denominados oligo(dT), que se unen a las colas poli(A) del mensajero, así como una mezcla de hexámeros construidos al azar (*random primers*) que dirigen la retrotranscripción indiscriminada de una mezcla de ARNs. Además, para la reacción serán necesarias la enzima, el tampón de actuación de la enzima con algún cofactor, como el ditioneitol (DTT), un protector del ARN y una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) que constituirán el cDNA.

Previamente a la RT, se cuantifica la concentración de la muestra, así como su integridad mediante la relación de absorbancias 260nm/280nm, aceptando como válidos los resultados entre 1,7-2,0.

Protocolo:

- Muestra: 1,5 µg ARN en 14,3 µl H₂O DEPC
- Añadir 1 µl *Random Primers* (Invitrogen) 0,3 mM

- Calentar a 65°C 5 min y poner en hielo.
- Añadir 9,2 µl de una mezcla con:
 - dNTP 10mM 1,2 µl/muestra
 - Tampón 5x 5 µl/muestra
 - DTT 100mM 2,5 µl/muestra
 - RNAsin 0,5 µl/muestra
- Incubar a 42°C, 2 min.
- Añadir 1,5 µl de una mezcla con:
 - H₂O DEPC 1 µl/muestra
 - SuperScript* (Invitrogen) 0,5 µl/muestra
- Incubar a 42°C, 50 min.
- Inactivar a 70°C, 15 min y enfriar.
- Conservar a -20°C.

❖ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la PCR intervienen siempre una enzima polimerasa *Taq* (Invitrogen), el tampón de la enzima y Cl₂Mg como cofactor, los dNTPs, el molde de cDNA y los cebadores para la región que se quiere amplificar, tanto en sentido 5'-3' como antisentido. Las PCRs llevadas a cabo durante la presente Tesis Doctoral presentan variaciones en el volumen final de la reacción, así como en las concentraciones de algunos de los componentes, con el objeto de ajustar el procedimiento al objetivo perseguido:

cDNA	1-2 µl
<i>Taq</i>	1 U
dNTP	200 nM
Tampón	1x
Cl ₂ Mg	2mM
Cebadores	10-40 pM
H ₂ O	completar volumen hasta 25 ó 50 µl

Cuando se utilizó un termociclador sin tapa atemperada (Universidad de Emory, Atlanta), se cubrieron las muestras con 50 µl de aceite mineral para evitar la evaporación.

Respecto a las condiciones de la PCR, al emplear una polimerasa *FastStart* se incluyó un paso a 95°C para activar la enzima antes de iniciar los ciclos de

amplificación. El número de ciclos de amplificación utilizado generalmente fue de 30, incluyendo 30 s de desnaturalización del cDNA, 30 s a la temperatura de hibridación propia de los cebadores para permitir su unión al cDNA, y 30 s de elongación a 72°C. Los ciclos de amplificación finalizan con un paso de 7 min a 72°C para completar la elongación de los fragmentos amplificados.

Respecto al diseño de los cebadores, se tuvieron en cuenta fundamentalmente tres consideraciones generales: la longitud del cebador (entre 18-21 nucleótidos), el contenido de guanina (G) y citosina (C) (aproximadamente el 50%) y la formación de dímeros y horquillas. Para ello se utilizó un software gratuito de diseño de cebadores disponible en Internet a través de la Northwestern University (Chicago, USA) en el link <http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> (Kibbe, 2007).

❖ Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico, de forma que sólo se aplica a aquellas moléculas que posean carga eléctrica, como los nucleótidos que, al estar cargados negativamente, en un campo eléctrico migran hacia el ánodo. En el ADN siempre hay la misma relación carga/tamaño, de forma que los fragmentos migrarán en función de su tamaño, aunque también puede influir su conformación (García-Segura *et al.*, 1996).

Para la separación de los fragmentos de ADN se utilizó un entramado de agarosa, polisacárido que se obtiene de algas marinas y que, en medio acuoso a temperatura ambiente, forma geles (Perera *et al.*, 2002). La agarosa se utilizó en distintas concentraciones, desde 0.5 a 2 % (p/v) en función del tamaño del fragmento a separar, mayor concentración cuanto menor número de pares de bases tiene el fragmento. También se utilizaron agarosas de diferentes calidades: agarosa de rutina (Sigma) y agarosa de bajo punto de fusión o LM (*low melting*) (Sigma, Cambrex), dependiendo de si tras la electroforesis se procedía a purificar la banda obtenida o no.

Como medio acuoso para disolver la agarosa, en todos los casos, se empleó tampón Tris-acetato (TAE) a una concentración 1x. Así, para 50x en H₂O se pusieron:

Trizma base	242 g/l
Ácido acético glacial	57,1 ml/l
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 ml/l

Para la preparación del gel, se fundió en microondas la cantidad deseada de agarosa en un volumen variable de TAE (50 ó 100 ml) dependiente del tamaño final del gel. Se dejó enfriar brevemente y, antes de solidificar se añadieron 1-2 μ l de bromuro de etidio, que se intercala con las moléculas de ADN y permite su posterior visualización en la luz ultravioleta (UV). De forma inmediata se depositó la agarosa aún fundida en el molde del gel, se colocó el peine para formar los pocillos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez gelificado, se retiró el peine y se introdujo el molde con el gel en la cubeta de electroforesis, conteniendo TAE 1x.

Para cargar las muestras en los pocillos del gel se utilizó, en todos los casos, un tampón de carga con azul de bromofenol como colorante para visualizar la posición del frente durante la electroforesis, y glicerol, para aumentar la densidad de la muestra y asegurar que el ADN queda dentro del pocillo.

Como voltaje para el campo eléctrico se tuvo en cuenta el tamaño del gel y la calidad de la agarosa. Así, para el gel de 50 ml se utilizó máximo 100 mV, para el de 100 ml 120 mV, y para los elaborados con agarosa LM no se superaron los 70 mV para evitar la fusión del gel.

III.2. Valoración de ADN mediante detección por PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) permite medir expresión génica gracias a la utilización de termocicladores especiales capaces de tomar datos durante el transcurso de la PCR, combinando la amplificación y la detección en un solo paso (Wong y Medrano, 2005). En la presente Tesis Doctoral, esta técnica se utilizó para determinar variaciones circadianas de expresión en distintos genes.

Los termocicladores que realizan qRT-PCR incorporan un detector de fluorescencia. En este caso, durante la reacción de amplificación se añadió un fluoróforo, el SYBR green, denominado así porque presenta su máximo de

emisión en la zona de los verdes ($\lambda=522$ nm). Esta molécula se intercala con el ADN amplificado y sólo emite fluorescencia al unirse al ADN, de forma que a medida que aumentan los ciclos de amplificación aumenta la fluorescencia emitida (Bustin, 2001). Los valores de fluorescencia se miden al final de cada ciclo, de manera que cuanto más molde haya en una muestra, emitirá fluorescencia en un ciclo más temprano. El ciclo en el cual la fluorescencia emitida por una muestra es estadísticamente mayor que la fluorescencia basal se denomina ciclo umbral o Ct (*threshold cycle*) y siempre ocurre durante la fase exponencial de la amplificación (Gibson *et al.*, 1996). En las qRT-PCR realizadas en la presente Tesis Doctoral se estimaron como aceptables aquellas muestras que presentaban Ct entre el 10 y el 30.

Debido a que el incremento en la fluorescencia se produce de forma lineal en cada ciclo, se realizaron curvas estándar para asegurar el correcto funcionamiento de la reacción y para facilitar la cuantificación en algún caso. Por un lado, para determinar la cantidad de muestra necesaria en la reacción y asegurar la linealidad de la misma se construyeron curvas con una mezcla o *pool* de cDNA procedente de diferentes muestras de un mismo tejido. Las curvas se diseñaron variando el volumen de cDNA empleado siguiendo una relación 1:3 ó 1:10. Por otro lado, para cuantificar de forma semi-absoluta la cantidad de genes reloj, se fabricaron estándares de concentración conocida de cada uno de los genes, lo que permite extrapolar en una recta patrón la concentración en una muestra.

Se empleó como gen normalizador el correspondiente a la subunidad *18S* del ribosoma, ya que no presenta variaciones en las condiciones experimentales utilizadas y podía ser amplificado al haber utilizado una mezcla de Oligo(dT) y *random primers* en la RT.

Se utilizaron dos métodos de cuantificación. En el caso del estudio de los genes reloj, como ya se ha mencionado, se empleó un método semi-absoluto utilizando estándares de concentración conocida, tanto para el gen diana como para el *18S*. Así, los niveles de expresión se calcularon dividiendo el valor obtenido para el gen diana entre el correspondiente del *18S*. En el segundo caso, para la cuantificación de la *gAanat-2* y el *gHiomt-2* se eligió un método de cuantificación relativo basado en la comparación del Ct, que no requiere del uso de estándares, y es un modelo matemático en el que la expresión del gen

diana se calcula como la diferencia respecto al Ct del gen de referencia ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

III.3. Clonación.

❖ Diseño de cebadores degenerados.

En la presente Tesis Doctoral, los genes estudiados no habían sido previamente secuenciados en el carpín, lo que impide el diseño de cebadores que amplifiquen una región concreta en una PCR. Para poder clonar y secuenciar estos genes, se utilizaron las secuencias disponibles en las bases de datos, fundamentalmente GenBank, y se alinearon siguiendo un algoritmo denominado ClustalW, disponible de manera gratuita en Internet a través de la página del *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) en el link <http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/>. Una vez alineadas las secuencias, se eligieron las zonas más conservadas entre especies para diseñar los cebadores. No obstante, es infrecuente encontrar regiones suficientemente conservadas como para que existan al menos 20 nucleótidos consecutivos iguales, y que sirvan como cebador. Normalmente, se utilizan cebadores degenerados, que son mezclas equimolares de dos o más bases en una posición determinada dentro de la secuencia. Así, se utiliza un código universal para expresar los nucleótidos que se pueden encontrar en una posición determinada, siguiendo la correspondencia:

R = A/G	B = C/G/T
Y = C/T	D = A/G/T
M = A/C	H = A/C/T
K = G/T	V = A/C/G
S = C/G	N = A/C/G/T
W = A/T	

Estos cebadores degenerados se utilizaron con el cDNA del carpín en una PCR convencional. El producto de esta PCR se visualizó mediante un gel de agarosa, y las bandas con el tamaño esperado se cortaron y se purificaron con un kit comercial (Qiagen) o con fenol:cloroformo para realizar la clonación.

❖ Purificación del ADN de un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

1. Reactivos.

- Tris-HCl 10 mM pH 8,0
- Fenol
- Cloroformo
- NaCl 5 mM
- EtOH 100% frío
- EtOH 70% frío

2. Protocolo.

- Cortar la(s) banda(s) del gel de agarosa LM.
- Ponerlas en eppendorf tarados y pesar (mg=μl).
- Llevar las muestras a 200-400 μl (según el peso) con Tris-HCl 10mM.
- Fundir 5 min a 65°C, agitando de vez en cuando.
- Añadir el mismo volumen de fenol y vórtex.
- Incubar 5 min en hielo.
- Centrifugar a 12.000 g, 10 min a 4°C.
- Recoger la fase acuosa en un eppendorf.
- Añadir el mismo volumen de fenol:cloroformo (1:1) y vórtex.
- Centrifugar a 12.000 g, 10 min a 4°C.
- Recoger la fase acuosa en eppendorf nuevo.
- Añadir el mismo volumen de cloroformo y vórtex.
- Centrifugar a 12.000 g, 3 min a temperatura ambiente.
- Recoger la fase acuosa en eppendorf nuevo.
- Precipitar el ADN con 1/10 volumen de NaCl 5mM y 1 ml EtOH 100% frío y vórtex.
- Centrifugar a 12.000 g, 15 min a 4°C.
- Eliminar el EtOH y añadir 0.5 ml EtOH 70% frío.
- Centrifugar a 12.000 g, 10 min a 4°C.
- Retirar completamente el EtOH y resuspender en 5μl de H₂O estéril.

❖ Clonación del fragmento de ADN en bacterias competentes.

Una vez purificado el ADN de la banda, se realizó la ligación del fragmento en un plásmido suministrado por una casa comercial (pGEM-T easy, Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se introdujo el plásmido en bacterias *Escherichia coli* JM101. Estas bacterias se denominan competentes, ya que han sido previamente tratadas para permitir el paso del plásmido a través de su pared al someterlas a un choque térmico. Para identificar las bacterias que hayan identificado el plásmido de las que no, se les hace crecer en placas con ampicilina. El plásmido lleva incorporada una región que proporciona resistencia a dicho antibiótico, de manera que aquellas colonias que crezcan en la placa poseerán el plásmido.

Protocolo:

- Añadir 100 µl de células competentes a la ligación.
- Incubar 15 minutos en baño de hielo.
- Dar un choque térmico 2 minutos a 42°C.
- Añadir 500 µl de medio LB líquido.
- Incubar 30 min a 37°C.
- Centrifugar a 12.000 g, 1 min a temperatura ambiente.
- Quitar 500 µl de volumen.
- Resuspender el precipitado con pipeta en el volumen que queda.
- Sembrar en placas LB + ampicilina (50 µg/ml).
- Incubar a 37°C máximo 12 horas.

Medio *Luria broth* (LB) en H₂O_d:

Peptona/triptona	10 g/l
Levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
NaOH 1 M	5 ml/l

Autoclavar sin disolver.

Si se quiere hacer LB sólido para placas añadir, antes de autoclavar, 15 g/l de agar. La ampicilina se prepara en alícuotas a 100 mg/ml y se añade después de autoclavar.

Para aumentar la cantidad del ADN plasmídico, se sembraron colonias en 3 ml LB + ampicilina (50 µg/ml), y se incubaron durante 12 horas con agitación. Posteriormente se extrajo el ADN plasmídico, según se describe a continuación.

❖ Extracción del ADN plasmídico.

Solución I (TE + RNasa)

Tris-HCl 1 M (pH 8.0)	2,5 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	2,0 ml
H ₂ O estéril	90,5 ml

Añadir RNasa A a una concentración final de 100 µg/ml (10 µl/ml) y 1 µl/ml de RNasa T1. Conservación a 4°C hasta un mes.

Solución II (lisis alcalina)

H ₂ O estéril	1,33 ml
NaOH 10 N	23 µl
SDS 10%	150 µl

Pipetear en ese orden para que el SDS no precipite. Preparar en el momento.

Solución III

Acetato potásico 5 M	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
H ₂ O estéril	28,5 ml

Protocolo:

- Poner 1,5 ml del cultivo en un eppendorf.
- Centrifugar 2 min a 12.000 g para bajar las células.
- Retirar el medio.
- Añadir 100 µl de Solución I.
- Resuspender las células con vórtex.
- Incubar 5-10 min a temperatura ambiente.
- Añadir 200 µl Solución II.
- Agitar por inversión.
- Incubar 10 min en baño de hielo.
- Añadir 100 µl Solución III y vórtex.
- Centrifugar a 12.000 g, 5 min a 4°C.

- Recuperar el sobrenadante en eppendorf nuevo.
- Precipitar con EtOH, como se ha descrito anteriormente.
- Resuspender el ADN en 20 µl de H₂O estéril.

Una vez extraído el ADN plasmídico se hace una digestión con la enzima *EcoRI*, que tiene lugares de corte a ambos lados del inserto. Seguidamente, se comprueba mediante un gel de agarosa si el fragmento está presente y ha sido liberado, y se selecciona la muestra que se enviará a secuenciar.

❖ Amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE).

Se utilizó esta técnica para obtener la secuencia completa de las enzimas de síntesis de melatonina en el carpín (AANAT-2 y HIOMT-2). Se basa en que, a partir del conocimiento de la secuencia de una región interna del ARNm, se pueden generar las dos mitades del cDNA mediante la amplificación, por separado, de los extremos 5' y 3' (Perera *et al.*, 2002).

Para la clonación de la región 3', se utiliza la propiedad del ARNm descrita anteriormente, la existencia de una cola poli(A). Primero, se realiza la RT con un cebador universal ADAPTER poli(T), que reconoce los extremos 3' del ARNm y se pega a ellos, incluyendo una secuencia conocida (Figura VI). Después se realizan dos PCR consecutivas anidadas o *nested*, utilizando como cebadores 5'-3' dos diseñados en zonas distintas de la región conocida del cDNA, y como 3'-5' un cebador universal que reconoce la zona ADAPTER añadida al extremo poli(A).

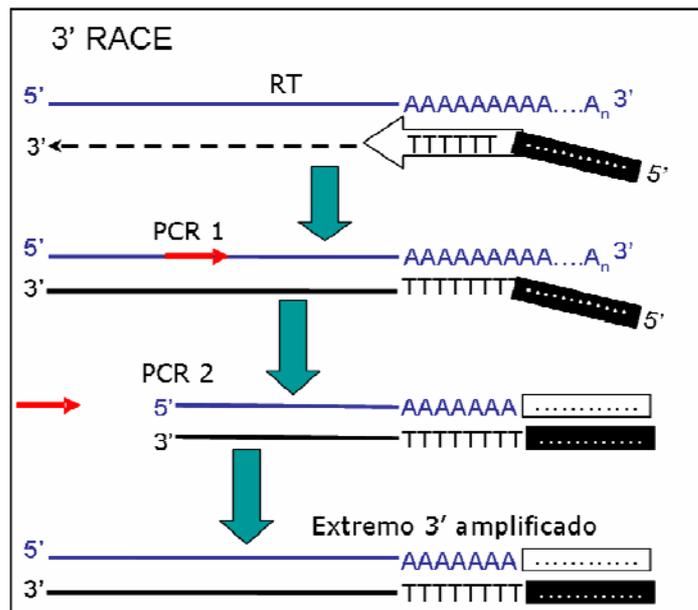


Figura VI. Representación esquemática del protocolo utilizado para la amplificación del extremo 3' mediante el método RACE. Las flechas en rojo indican los cebadores 5'-3' diseñados a partir de la secuencia conocida del cDNA para la PCR 1 y la PCR 2.

Para la clonación del fragmento 5', al no tener cola poli(A), hay que incluir un paso previo a la síntesis del cDNA, mediante el cual se une esta región poli(A) al extremo 5' del ARNm a través de una reacción enzimática catalizada por una transferasa terminal (Figura VII). A continuación, se sintetiza el cDNA con un cebador universal ADAPTER y con otro específico del gen que se quiere amplificar. Después se hacen las dos PCRs consecutivas igual que se ha descrito para el extremo 3', con la diferencia de que esta vez el cebador 5'-3' será el universal y los 3'-5' estarán diseñados a partir de la secuencia conocida.

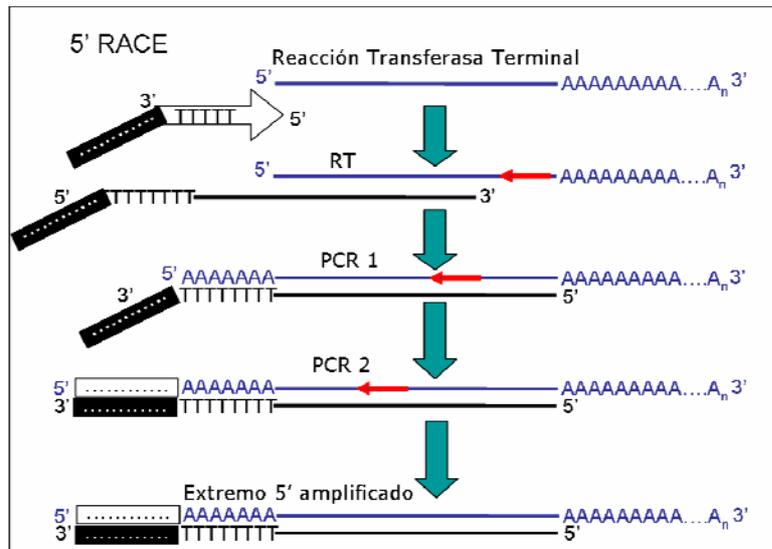


Figura VII. Representación esquemática del protocolo utilizado para la amplificación del extremo 5' mediante el método RACE. Las flechas en rojo indican los cebadores 3'-5' diseñados a partir de la secuencia conocida del cDNA para la RT, la PCR 1 y la PCR 2.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AITKEN, A., BAXTER, H., DUBOIS, T., CLOKIE, S., MACKIE, S., MITCHELL, K., PEDEN, A., ZEMLICKOVA, E. (2002) Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* 30:351-360.
- AKIYAMA, M., YUASA, T., HAYASAKA, N., HORIKAWA, K., SAKURAI, T., SHIBATA, S. (2004) Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. *Eur. J. Neurosci.* 20:3054-3062.
- AL-HUSSAINI, A.H. (1949) On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits; cytology and physiology. *Q. J. Microsc. Sci.* 90:323-354.
- ALBRECHT, U., SUN, Z.S., EICHELE, G., LEE, C.C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91:1055-1064.
- ALONSO-GÓMEZ, A.L., VALENCIANO, A.I., ALONSO-BEDATE, M., DELGADO, M.J. (1995) Differential characteristics and regulation of arylamine and arylalkylamine *N*-acetyltransferases in the frog retina (*Rana perezi*). *Neurochem. Int.* 26:223-231.
- ANDERSON, C., CAMPBELL, G. (1988) Immunohistochemical study of 5-HT-containing neurons in the teleost intestine: relation to the presence of enterochromaffin cells. *Cell Tissue Res.* 254:553-559.
- ANDERSSON, H., JOHNSTON, J.P., MESSENGER, S., HAZLERIGG, D., LINCOLN, G. (2005) Photoperiod regulates clock gene rhythms in the ovine liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142:357-363.
- APPELBAUM, L., ANZULOVICH, A., BALER, R., GOTHILF, Y. (2005) Homeobox-clock protein interaction in zebrafish. A shared mechanism for pineal-specific and circadian gene expression. *J. Biol. Chem.* 280:11544-11551.
- APPELBAUM, L., VALLONE, D., ANZULOVICH, A., ZIV, L., TOM, M., FOULKES, N.S., GOTHILF, Y. (2006) Zebrafish arylalkylamine-*N*-acetyltransferase genes—targets for regulation of the circadian clock. *J. Mol. Endocrinol.* 36:337-347.
- ARANDA, A., MADRID, J.A., SANCHEZ-VAZQUEZ, F.J. (2001) Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J. Biol. Rhythms* 16:50-57.
- ARENDRT, J., SKENE, D.J. (2005) Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* 9:25-39.
- ASCHOFF, J. (1981) A survey of biological rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology* (Ed.: J. Aschoff). Biological Rhythms. Plenum Press, New York pp 3-10.
- ATON, S.J., HERZOG, E.D. (2005) Come together, right... now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron* 48:531-534.
- ATON, S.J., COLWELL, C.S., HARMAR, A.J., WASCHEK, J., HERZOG, E.D. (2005) Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* 8:476-483.
- AZPELETA, C., DE PEDRO, N., VELARDE, E., DELGADO, M.J. (2008) La melatonina y su posible efecto como hormona antiestrés en el carpín (*Carassius auratus*). En: *Avances en Endocrinología Comparada Vol. IV* (Eds.: J.A. Muñoz-Cueto, J.M. Mancera, G. Martínez-Rodríguez). Servicio de publicaciones de la Universidad de Cádiz. Cádiz, España. pp. 79-83.
- AZPELETA, C., MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., DELGADO, M.J., ISORNA, E., DE PEDRO, N. (2010) Melatonin reduces locomotor activity and circulating control in goldfish. *Horm. Behav.* 57:323-329.
- BALER, R., COVINGTON, S., KLEIN, D.C. (1997) The rat arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene promoter-cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J. Biol. Chem.* 272:6979-6985.

- BALSALOBRE, A. (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 309:193-199.
- BALSALOBRE, A., DAMIOLA, F., SCHIBLER, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929-937.
- BALSALOBRE, A., BROWN, S.A., MARCACCI, L., TRONCHE, F., KELLEDOCK, C., REICHARDT, H.M., SCHÜTZ, G., SCHIBLER, U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signalling. *Science* 289:2344-2347.
- BAYARRI, M.J., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2002) Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin. *J. Pineal Res.* 32:34-40.
- BAYARRI, M.J., ROL DE LAMA, M.A., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2003) Both pineal and lateral eyes are hended to sustain daily circulating melatonin rhythms in the sea bass. *Brain Res.* 969:175-182.
- BAYARRI, M.J., IIGO, M., MUÑOZ-CUETO, J.A., ISORNA, E., DELGADO, M.J., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., ALONSO-GÓMEZ, A.L. (2004) Binding characteristics and daily rhythms of melatonin receptors are distinct in the retina and brain areas of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Brain Res.* 1029:241-250.
- BEATTIE, D.T., SMITH, J.A.M. (2008) Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377:181-203.
- BECHTOLD, D.A. (2008) Energy-responsive timekeeping. *J. Genet.* 87:447-458.
- BÉGAY, V., BOIS, P., COLLIN, J.P., LENFANT, J., FALCÓN, J. (1994) Calcium and melatonin production in dissociated trout pineal photoreceptor cells in culture. *Cell Calcium* 16:37-46.
- BÉGAY, V., FALCÓN, J., CAHILL, G.M., KLEIN, D.C., COON, S.L. (1998) Transcripts encoding two melatonin synthesis enzymes in the teleost pineal organ: circadian regulation in pike and zebrafish, but not in trout. *Endocrinology* 139:905-912.
- BENYASSI, A., SCHWARTZ, C., COON, S.L., KLEIN, D.C., FALCÓN, J. (2000) Melatonin synthesis: arylalkylamine *N*-acetyltransferases in trout retina and pineal organ are different. *Neuroreport* 11:255-258.
- BERNARD, M., KLEIN, D.C., ZATZ, M. (1997) Chick pineal clock regulates serotonin *N*-acetyltransferase mRNA rhythm in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:304-309.
- BESHARSE, J.C., IUVONE, P.M. (1983) Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin *N*-acetyltransferase. *Nature* 305:133-135.
- BESSEAU, L., BENYASSI, A., MØLLER, M., COON, S.L., WELLER, J.L., BOEUF, G., KLEIN, D.C., FALCÓN, J. (2006) Melatonin pathway: breaking the "high-at-night" rule in trout retina. *Exp. Eye Res.* 82:620-627.
- BOEUF, G., LE BAIL, P.Y. (1999) Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture.* 177:129-152.
- BOUJARD, T., LEATHERLAND, J.F. (1992) Circadian rhythm and feeding time in fishes. *Environ. Biol. Fishes.* 35:109-131.
- BROWN, S.A., ZUMBRUNN, G., FLEURY-OLELA, F., PREITNER, N., SCHIBLER, U. (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr. Biol.* 12:1574-1583.
- BUBENIK, G.A. (1986) The effect of serotonin, N-acetylserotonin and melatonin on spontaneous contractions of isolated rat intestine. *J. Pineal Res.* 3:41-54.
- BUBENIK, G.A. (2008) Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J. Physiol. Pharmacol.* 59:33-51.

- BUBENIK, G.A., BROWN, G.M. (1997) Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of the rat. *Biol. Signals* 6:40-44.
- BUBENIK, G.A., PANG, S.F. (1997) Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106:415-419.
- BUBENIK, G.A., HACKER, R.R., BROWN, G.M., BAROS, L. (1999) Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J. Pineal Res.* 26:56-63.
- BURNSTOCK, G. (1958) The effect of drugs on spontaneous motility and on response to stimulation of the extrinsic nerves of the gut of a teleostean fish. *Brit. J. Pharmacol.* 13:216-226.
- BUSTIN, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169-193.
- CAAMAÑO-TUBÍO, R.I., PÉREZ, J., FERREIRO, S., ALDEGUNDE, M. (2007) Peripheral serotonin dynamics in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 145:245-255.
- CAHILL, G.M. (2002) Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309:27-34.
- CAHILL, G.M., BESHARSE, J.C. (1989) Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1098-1102.
- CAHILL, G.M., BESHARSE, J.C. (1991) Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J. Neurosci.* 10:2959-2971.
- CAHILL, G.M., BESHARSE, J.C. (1993) Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog. Retinal Eye Res.* 14:267-291.
- CAMBRAS RIU, T. (2006) Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos. En: *Cronobiología básica y clínica* (Eds.: J.A. Madrid y M.A. Rol de Lama). Editec@Red, Madrid, España. Cap. 4 pp 151-189.
- CARRILLO-VICO, A., CALVO, J.R., ABREU, P., LARDONE, P.J., GARCÍA-MAURINO, S., REITER, R.J., GUERRERO, J.M. (2004) Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18:537-539.
- CARRILLO-VICO, A., REITER, R.J., LARDONE, P.J., HERRERA, J.L., FERNÁNDEZ-MONTESINO, R., GUERRERO, J.M., POZO, D. (2006) The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 7:423-431.
- CASSONE, V.M. (1990) Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* 13:457-464.
- CHAN, H.C., LUI, K.M., WONG, W.S., POON, A.M. (1998) Effect of melatonin on chloride secretion by human colonic T84 cells. *Life Sci.* 62:2151-2158.
- CHAU, R.M.W., PATEL, B.A. (2009) Determination of serotonin, melatonin and metabolites in gastrointestinal tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.* 23:175-181.
- CHAURASIA, S.S., POZDEYEV, N., HAQUE, R., VISSER, A., IVANOVA, T.N., IUVONE, P.M. (2006) Circadian clockwork machinery in neural retina: evidence for the presence of functional clock components in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures. *Mol. Vis.* 12:215-223.
- CHONG, N.W., BERNARD, M., KLEIN, D.C. (2000) Characterization of the chicken serotonin *N*-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E box interaction. *J. Biol. Chem.* 275:32991-32998.

- CHONG, N.W., CHAURASIA, S.S., HAQUE, R., KLEIN, D.C., IUVONE, P.M. (2003) Temporal-spatial characterization of chicken clock genes: circadian expression in retina, pineal gland, and peripheral tissues. *J. Neurochem.* 85:851-860.
- CHOW, B.K.C., YUEN, T.T.H., CHAN, K.W. (1997) Molecular evolution of vertebrate VIP receptors and functional characterization of a VIP receptor from goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105:176-185.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- CLENCH, M.H., PINEIRO-CARRERO, V.M., MATHIAS, J.R. (1989) Migrating myoelectric complex demonstrated in four avian species. *Am. J. Physiol.* 256:G598-G603.
- CONFENTE, F., RENDÓN, M.C., BESSEAU, L., FALCÓN, J., MUÑOZ-CUETO, J.A. (2009) Melatonin receptors in a pleuronectiform species, *Solea senegalensis*: cloning, tissue expression, daily and seasonal variations. En: *Study of the pineal organ and melatonin receptors in the brain-pituitary-gonad axis of sole, Solea senegalensis*. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz pp 97-132.
- CONTI, A., CONCONI, S., HERTENS, E., SKWARLO-SONTA, K., MARKOWSKA, M., MAESTRONI, J.M. (2000) Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* 28:193-202.
- COON, S.L., KLEIN, D.C. (2006) Evolution of arylalkylamine *N*-acetyltransferase: emergence and divergence. *Mol. Cell Endocrinol.* 252:2-10.
- COON, S.L., ROSEBOOM, P.H., BOLER, R., WELLER, J.L., NAMBOODIRI, M.A., KOONIN, E.V., KLEIN, D.C. (1995) Pineal serotonin *N*-acetyltransferase: expression, cloning and molecular analysis. *Science* 270:1681-1683.
- COON, S.L., BÉGAY, V., FALCÓN, J., KLEIN, D.C. (1998) Expression of melatonin synthesis genes is controlled by a circadian clock in the pike pineal organ but not in trout. *Biol. Cell.* 90:399-405.
- COON, S.L., BÉGAY, V., DEURLOO, D., FALCÓN, J., KLEIN, D.C. (1999) Two arylalkylamine *N*-acetyltransferase genes mediate melatonin synthesis in fish. *J. Biol. Chem.* 274:9076-9082.
- COON, S.L., DEL OLMO, E., YOUNG III, W.S., KLEIN, D.C. (2002) Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine *N*-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:4699-4706.
- COSTA, E.J., LOPES, R.H., LAMY-FREUND, M.T. (1995) Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.* 19:123-126.
- DAMIOLA, F., LE MINH, N., PREITNER, N., KORNMANN, B., FLEURY-OLELA, F., SCHIBLER, U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14:2950-2961.
- DARDENTE, H., MENET, J.S., CHALLET, E., TOURNIER, B.B., PÉVET, P., MASSON-PÉVET, M. (2004) Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 124:143-151.
- DAVIDSON, A.J., CAPPENDIJK, S.L., STEPHAN, F.K. (2000) Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am. J. Physiol.* 278:R1296-R1304.
- DAVIDSON, A.J., POOLE, A.S., YAMAZAKI, S., MENAKER, M. (2003) Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav.* 2:32-39.
- DAVIS, R.E. (1963) Daily "predawn" peak of locomotion in fish. *Anim. Behav.* 12:272-283.

- DE PEDRO, N., MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R., DELGADO, M.J. (2008) Melatonin reduces body weight in goldfish (*Carassius auratus*): effects on metabolic resources and some feeding regulators. *J. Pineal Res.* 45:32-39.
- DEBRUYNE, J.P., WEAVER, D.R., REPERT, S.M. (2007) Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Curr. Biol.* 17: R538-R539.
- DEGUCHI, T. (1992) Physiology and molecular biology of arylamine *N*-acetyltransferases. *Biomedical Res.* 13:231-242.
- DELAUNAY, F., THISSE, C., MARCHAND, O., LAUDET, V., THISSE, B. (2000) An inherited functional circadian clock in zebrafish embryos. *Science* 289:297-300.
- DELGADO, M.J., VIVIEN-ROELS, B. (1989) Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezii*: importance of ocular melatonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:46-53.
- DELLA RAGIONE, F., COMITATO, R., ANGELINI, F., D'ESPOSITO, M., CARDONE, A. (2005) Molecular cloning and characterization of the clock gene *period2* in the testis of lizard *Podarcis sicula* and its expression during seasonal reproductive cycle. *Gene* 363:105-112.
- DRAGO, F., MACAUDA, S., SALEHI, S. (2002) Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Dig. Dis. Sci.* 47:1969-1974.
- DOUGLAS, A., SKOOG, F., HOLLER, J., WEST, D.M. (2005) Espectroscopía de fluorescencia molecular. En: *Fundamentos de química analítica*. Ed. Reverté. Barcelona. Cap 23 pp 604-611.
- DUBOCOVICH, M.L., MARKOWSKA, M. (2005) Functional MT1 and MT2 receptors in mammals. *Endocrine* 27:101-110.
- EKSTRÖM, P., MEISSL, H. (1997) The pineal organ of teleost fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7:199-284.
- EKSTRÖM, P., MEISSL, H. (2003) Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 358:1679-1700.
- ESCOBAR, C., CAILOTTO, C., ANGELES-CASTELLANOS, M., SALGADO DELGADO, R., BUIJS, R.M. (2009) Peripheral oscillators: the driving force for food-anticipatory activity. *Eur. J. Neurosci.* 30:1665-1675.
- FALCÓN, J. (1999) Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* 58:121-162.
- FALCÓN, J., BOILLIET, V., COLLIN, J.P. (1996) Partial characterization of serotonin *N*-acetyltransferases from northern pike (*Esox lucius*, L.) pineal organ and retina. *Pflugers Arch.* 432:386-393.
- FALCÓN, J., GALARNEAU, K.M., WELLER, J.L., RON, B., CHEN, G., COON, S.L., KLEIN, D.C. (2001) Regulation of arylalkylamine *N*-acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the fish pineal organ: evidence for a role of proteasomal proteolysis. *Endocrinology* 142:1804-1813.
- FALCÓN, J., GOTHILF, Y., COON, S.L., BOEUF, G., KLEIN, D.C. (2003) Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm generating systems in the teleost fish pineal organ and retina. *J. Neuroendocrinol.* 15:378-382.
- FALCÓN, J., BESSEAU, L., SAUZET, S., BOEUF, G. (2007) Melatonin effects on the hypothalmo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metab.* 18:81-88.
- FALCÓN, J., BESSEAU, L., FUENTÈS, M., SAUZET, S., MAGNANOU, E., BOEUF, G. (2009) Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1163:101-111.

- FALCÓN, J., MIGAUD, H., MUÑOZ-CUETO, J.A., CARRILLO, M. (2010) Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165:469-482.
- FEILLET, C.A., RIPPERGER, J.A., MAGNONE, M.C., DULLOO, A., ALBRECHT, U., CHALLET, E. (2006) Lack of food anticipation in *Per2* mutant mice. *Curr. Biol.* 16:2016-2022.
- FEILLET, C.A., MENDOZA, J., PÉVET, P., CHALLET, E. (2008) Restricted feeding restores rhythmicity in the pineal gland of arrhythmic suprachiasmatic-lesioned rats. *Eur. J. Neurosci.* 28:2451-2458.
- FELICIANO, A., VIVAS, Y., VELARDE, E., DELGADO, M.J., DE PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L., ISORNA, E. (2010) Clock genes synchronization by feeding time in goldfish (*Carassius auratus*): is the liver reset by the last meal? *J. Biol. Rhythms* (submitted).
- FERNÁNDEZ-DURÁN, B., RUIBAL, C., POLAKOF, S., CEINOS, R.M., SOENGAS, J.L., MÍGUEZ, J.M. (2007) Evidence for arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT2) expression in rainbow trout peripheral tissues with emphasis in the gastrointestinal tract. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152:289-294.
- FIELD, H.A., KELLEY, K.A., MARTELL, L., GOLDSTEIN, A.M., SERLUCA, F.C. (2009) Analysis of gastrointestinal physiology using a novel intestinal transit assay in zebrafish. *Neurogastroenterol. Motil.* 21:304-312.
- FORGAN, L.G., FORSTER, M.E. (2007) Effects of potential mediators of an intestinal brake mechanism on gut motility in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 146:343-347.
- FU, Z., KATO, H., KOTERA, N., NOGUCHI, T., SUGAHARA, K., KUBO, T. (2001) Regulation of hydroxyindole-*O*-methyltransferase gene expression in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2504-2511.
- FU, Z., INABA, M., NOGUCHI, T., KATO, H. (2002) Molecular cloning and circadian regulation of *Cryptochrome* genes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Biol. Rhythms* 17:14-27.
- FULLER, P.M., LU, J., SAPER, C.B. (2008) Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science* 320:1074-1077.
- FULLER, P.M., LU, J., SAPER, C.B. (2009) Standards of evidence in chronobiology: a response. *J. Circadian Rhythms* 7:9.
- GABELLA, G. (1974) Special muscle cells and their innervation in the mammalian small intestine. *Cell. Tissue Res.* 153:63-77.
- GABELLA, G., BLUNDELL, D. (1981) Gap junctions of the muscles of the small and large intestine. *Cell. Tissue Res.* 219:469-488.
- GAILDRAT, P., BECQ, F., FALCÓN, J. (2002) First cloning and functional characterization of a melatonin receptor in fish brain: a novel one? *J. Pineal Res.* 32:74-84.
- GANGULY, S., GASTEL, J.A., WELLER, J.L., SCHWARTZ, C., JAFFE, H., NAMBOODIRI, M.A., COON, S.L., HICKMAN, A.B., ROLLAG, M., OBSIL, T., BEAUVERGER, P., FERRY, G., BOUTIN, J.A., KLEIN, D.C. (2001) Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine *N*-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8083-8088.
- GANGULY, S., COON, S.L., KLEIN, D.C. (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* 309:127-137.
- GARCÍA-SEGURA, J.M., GAVILANES, J.G., MARTÍNEZ DEL POZO, A., MONTERO, F., OÑADERRA, M., VIVANCO, F. (1996) Cromatografía. En: *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Ed. Síntesis. Madrid. Cap. 6 pp 291-377.

- GASTEL, J.A., ROSEBOOM, P.H., RINALDI, P.A., WELLER, J.L., KLEIN, D.C. (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin *N*-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358-1360.
- GAUER, F., POIREL, V.J., GARIDOU, M.L., SIMONNEAUX, V., PÉVET, P. (1999) Molecular cloning of the arylalkylamine-*N*-acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. *Mol. Brain Res.* 71:87-95.
- GERSHON, M.D., TACK, J. (2007) The serotonin signalling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132:397-414.
- GIBBS, F.P., VRIEND, J. (1981) The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology.* 109:1796-1798.
- GIBSON, U.E., HEID, C.A., WILLIAMS, P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6:995-1001.
- GINTY, D.D., KORNHAUSER, J.M., THOMPSON, M.A., BADING, H., MAYO, K.E., TAKAHASHI, J.S., GREENBERG, M.E. (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260:238-241.
- GIROTTI, M., WEINBERG, M.S., SPENCER, R.L. (2009) Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296:E888-E897.
- GOTHILF, Y., COON, S.L., TOYAMA, R., CHITNIS, A., NAMBOODIRI, M.A.A., KLEIN, D.C. (1999). Zebrafish serotonin *N*-acetyltransferase-2: marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. *Endocrinology* 140:4895-4903.
- GOOLEY, J.J., SCHOMER, A., SAPER, C.B. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat. Neurosci.* 9:398-407.
- HALASY, K., BENEDECZKY, I., FEKETE, E., TÓTH, L., GÁBRIEL, R. (1988) Enteric neuromuscular junctions: comparison of ultrastructural features in different phylogenetic groups. *Neuroscience* 25:147-162.
- HANSEN, M.B. (2003) Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol. Res.* 52: 1-30.
- HANSEN, H.B., WITTE, A.B. (2008) The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol.* 193:311-323.
- HARDELAND, R. (2008) Melatonin, hormone of darkness and more—occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:2001-2018.
- HARDELAND, R., PANDI-PERUMAL, S.R. (2005) Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr. Metab. (Lond.)* 2:22-36.
- HARDELAND, R., POEGGELER, B. (2003) Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal. Res.* 34:233-241.
- HARDELAND, R., POEGGELER, B. (2007) Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 7:289-303.
- HARDELAND, R., PANDI-PERUMAL, S.R., POEGGELER, B. (2007) Melatonin in plants – focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 1:32-45.
- HARLOW, H.J., WEEKLY, B.L. (1986) Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine. *J. Pineal Res.* 3:277-284.

- HASTINGS, M.H., MAYWOOD, E.S., O'NEILL, J.S. (2008a) Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Curr. Biol.* 18:R805-R815.
- HASTINGS, M.H., MAYWOOD, E.S., REDDY, A.B. (2008b) Two decades of circadian time. *J. Neuroendocrinol.* 20:812-819.
- HERRERO, M.J., MARTÍNEZ, F.J., MÍGUEZ, J.M., MADRID, J.A. (2007) Response of plasma and gastrointestinal melatonin, plasma cortisol and activity rhythms of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to dietary supplementation with tryptophan and melatonin. *J. Comp. Physiol. B* 177: 319-326.
- HIRATA, F., HAYAISHI, O., TOKUYAMA, O., SENOH, S. (1974) *In vitro* and *in vivo* formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 249:1311-1313.
- HOEGG, S., BRINKMANN, H., TAYLOR, J.S., MEYER, A. (2004) Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J. Mol. Evol.* 59:190-203.
- HOLLANDS, T.R. (1974) Constant temperature tissue bath for the *in vitro* measurement of muscle tension. *Lab. Pract.* 23:253-254.
- HOLMBERG, A., OLSSON, C., HOLMGREN, S. (2006) The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gut motility in zebrafish, *Danio rerio*, embryos and larvae. *J. Exp. Biol.* 207:923-935.
- HOLMBERG, A., OLSSON, C., HENNIG, G.W. (2007) TTX-sensitive and TTX-insensitive control of spontaneous gut motility in the developing zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J. Exp. Biol.* 210:1084-1091.
- HOLMGREN, S., OLSSON, C. (2009) The neuronal and endocrine regulation of gut function. En: *Fish neuroendocrinology*. (Eds. N.J. Bernier, G. Van Der Kraak, A.P. Farrell, C.J. Brauner). Academic Press, Oxford. pp 467-512.
- HOOPERWERF, W.A., HELLMICH, H.L., CORNELISSEN, G., HALBERG, F., SHAHINIAN, V.B., BOSTWICK, J., SAVIDGE, T.C., CASSONE, V. (2007) Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology* 133:1250-1260.
- HORN, M.H. (1998) Feeding and digestion. En: *The physiology of fishes*. (Ed.: D.H. Evans). CRC Press, New York. pp 43-63.
- HUBEL, K.A. (1985) Intestinal nerves and ion transport: stimuli, reflexes, and responses. *Am. J. Physiol.* 248:G261-G271.
- HUETHER, G., POEGELLER, B., REIMER, R., GEORGE, A. (1992) Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 51:945-53.
- IIGO, M., TABATA, M. (1996) Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.* 60:775-781.
- IIGO, M., FURUKAWA, K., HATTORI, A., OHTANI-KANEKO, R., HARA, M., SUZUKI, T., TABATA, M., AIDA, K. (1997) Ocular melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Biol. Rhythms* 12:182-192.
- IIGO, M., FURUKAWA, K., TABATA, M., AIDA, K. (2003) Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.* 347:49-52.
- IJJIMA, M., YAMAGUCHI, S., VAN DER HORST, G.T.J., BONNEFONT, X., OKAMURA, H., SHIBATA, S. (2005) Altered food-anticipatory activity rhythm in *Cryptochrome*-deficient mice. *Neurosci. Res.* 52:166-173.
- IKEGAMI, T., AZUMA, K., NAKAMURA, M., SUZUKI, N., HATTORI, A., ANDO, H. (2009a) Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152:219-224.

- IKEGAMI, T., MOTOHASHI, E., DOI, H., HATTORI, A., ANDO, H. (2009b) Synchronized diurnal and circadian expression of four subtypes of melatonin receptor genes in the diencephalon of a puffer fish with lunar-related spawning cycles. *Neurosci. Lett.* 469:58-63.
- ISORNA, E., BESSEAU, L., BOEUF, G., DESDEVISES, Y., VUILLEUMIER, R., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J., FALCÓN, J. (2006) Retinal, pineal and diencephalic expression of frog arylalkylamine *N*-acetyltransferase-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252:11-18.
- ISORNA, E., EL M' RABET, A., CONFENTE, F., FALCÓN, J., MUÑOZ-CUETO, J.A. (2009) Cloning and expression of arylalkylamine *N*-acetyltransferase-2 during early development and metamorphosis in the sole *Solea senegalensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161:97-102.
- ITO, Y., KURIYAMA, H. (1971) Nervous control of the motility of the alimentary canal of the silver carp. *J. Exp. Biol.* 55:469-487.
- ITOH, M.T., ISHIZUKA, B., KUDO, Y., FUSAMA, S., AMEMIYA, A., SUMI, Y. (1997) Detection of melatonin and serotonin *N*-acetyltransferase and hydroxindole-*O*-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 136:7-13.
- IUVONE, P.M., BESHARSE, J.C. (1986) Involvement of calcium in the regulation of serotonin *N*-acetyltransferase in retina. *J. Neurochem.* 46:82-88.
- IUVONE, P.M., TOSINI, G., POZDEYEV, N., HAQUE, R., KLEIN, D.C., CHAURASIA, S.S. (2005) Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine *N*-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog. Retinal Eye Res.* 24:433-456.
- IVANOVA, T.N., IUVONE, P.M., (2003a) Melatonin synthesis in retina: circadian regulation of arylalkylamine *N*-acetyltransferase activity in cultured photoreceptor cells of embryonic chicken retina. *Brain Res.* 973:56-63.
- IVANOVA, T.N., IUVONE, P.M. (2003b) Circadian rhythm and photic control of cAMP level in chick retinal cell cultures: a mechanism for coupling the circadian oscillator to the melatonin-synthesizing enzyme, arylalkylamine *N*-acetyltransferase, in photoreceptor cells of embryonic chicken retina. *Brain Res.* 973:56-63.
- JENSEN, J. (1997) Co-release of substance P and neurokinin A from the Atlantic cod stomach. *Peptides* 18:717-722.
- JENSEN, J., HOLMGREN, S. (1991) Tachykinins and intestinal motility in different fish groups. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83:388-396.
- JOHANSSON, A., HOLMGREN, S. (2003) Ca²⁺-recruitment in tachykinin induced-contractions of gut smooth muscle from African clawed frog, *Xenopus laevis*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113:185-191.
- KAMPHUIS, W., CAILOTTO, C., DIJK, F., BERGEN, A., BUIJS, R.M. (2005) Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:18-26.
- KANEKO, M., HERNANDEZ-BORSETTI, N., CAHILL, G.M. (2006) Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:14614-14619.
- KAPOOR, B.G., SMIT, H., VERIGHINA, I.A. (1975) The alimentary canal and digestion in teleost. *Adv. Mar. Biol.* 13:109-230.
- KARILA, P., HOLMGREN, S. (1995) Enteric reflexes and nitric oxide in the fish intestine. *J. Exp. Biol.* 198:2405-2411.
- KARILA, P., SHAHBAZI, F., JENSEN, J., HOLMGREN, S. (1998) Projections and actions of tachykinergic, cholinergic, and serotonergic neurons in the intestine of the Atlantic cod. *Cell. Tissue Res.* 291:403-413.

- KASIMAY, Ö., ÇAKIR, B., DEVSEREN, E., YEGEN, B.Ç. (2005) Exogenous melatonin delays gastric emptying rate in rats: role of CCK₂ and 5-HT₃ receptors. *J. Physiol. Pharmacol.* 56:543-553.
- KATO, H., FU, Z., GOTERA, N., SUGAHARA, K., KUBO, T. (1999) Regulation of the expression of serotonin *N*-acetyltransferase gene in Japanese quail (*Coturnix japonica*). I. Rhythmic pattern and effect of light. *J. Pineal Res.* 27:24-33.
- KEZUKA, H., IIGO, M., FURUKAWA, K., AIDA, K., HANYU, I. (1992) Effects of photoperiod, pinealectomy and ophthalmectomy on circulating melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *Zool. Sci.* 9:1047-1053.
- KIBBE, W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids. Res.* 35:W43-W46.
- KILIAAN, A.J., JOOSTEN, H.W., BAKKER, R., DEKKER, K., GROOT, J.A. (1989) Serotonergic neurons in the intestine of two teleosts, *Carassius auratus* and *Oreochromis mossambicus*, and the effect of serotonin on transepithelial ion-selectivity and muscle tension. *Neuroscience* 31:817-824.
- KILIAAN, A.J., HOLMGREN, S., JÖNSSON, A.C., DEKKER, K., GROOT, J.A. (1993) Neuropeptides in the intestine of two teleost species (*Oreochromis mossambicus*, *Carassius auratus*): localization and electrophysiological effects on the epithelium. *Cell Tissue Res.* 271:123-134.
- KIM, T.D., KIM, J.S., KIM, J.H., MYUNG, J., CHAE, H.D., WOO, K.C., JANG, S.K., KOH, D.S., KIM, K.T. (2005) Rhythmic serotonin *N*-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation. *Mol. Cell. Biol.* 25:3232-3246.
- KIRTISINGHE, P. (1940) The myenteric nerve plexus in some lower chordates. *Q. J. Microsc. Sci.* 81:521-539.
- KITAZAWA, T., HOSHI, T., CHUGUN, A. (1990) Effects of some autonomic drugs and neuropeptides on the mechanical activity of longitudinal and circular muscle strips isolated from the carp intestinal bulb (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 97:13-24.
- KLEIN, D.C. (2006) Evolution of the vertebrate pineal gland: the AANAT hypothesis. *Chronobiol. Int.* 23:5-20.
- KLEIN, D.C. (2007) Arylalkylamine *N*-acetyltransferase: the "timezyme". *J. Biol. Chem.* 282:4233-4237.
- KOBAYASHI, Y., ISHIKAWA, T., HIRAYAMA, J., DAIYASU, H., KANAI, S., TOH, H., FUKUDA, I., TSUJIMURA, T., TERADA, N., KAMEI, Y., YUBA, S., IWAI, S., TODO, T. (2000) Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* 5:725-738.
- KOBAYASHI, H., KROMMINGA, A., DUNLOP, T.W., TYCHSEN, B., CONRAD, F., SUZUKI, N., MEMEZAWA, A., BETTERMANN, A., AIBA, S., CALBERG, C., PAUS, R. (2005) A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *FASEB J.* 19:1710-1712.
- KOTTELAT, M., FREYHOF, J. (2007) Handbook of European freshwater fishes. Ed. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof. Berlin, Germany. pp 78-148.
- KOUKKARI, W.L., SOTHERN, R.B. (2006) Introducing biological rhythms. Ed. Springer Science + Business Media. Nueva York, Estados Unidos.
- KU, S.K., LEE, J.H., LEE, H.S. (2004) Immunohistochemical study on the endocrine cells in gut of the stomachless teleost, *Zacco platypus* (Cyprinidae). *Anat. Histol. Embryol.* 33:212-219.

- KULCZYKOWSKA, E., KALAMARZ, H., WARME, J.M., BALMENT, R.J. (2006) Day-night specific binding of 2-[¹²⁵I]Iodomelatonin and melatonin content in gill, small intestine and kidney of three fish species. *J. Comp. Physiol. B* 176: 277-285.
- KUNZE, W.A.A., FURNESS, J.B. (1999) The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu. Rev. Physiol.* 61:117-142.
- LAMONT, E.W., DIAZ, L.R., BARRY-SHAW, J., STEWART, J., AMIR, S. (2005) Daily restricted feeding rescues a rhythm of *period2* expression in the arrhythmic suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 132:245-248.
- LARHAMMAR, D., RISINGER, C. (1994) Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol. Phylogen. Evol.* 3:59-68.
- LAVERY, D.J., LÓPEZ-MOLINA, L., MARGUERON, R., FLEURY-OLELA, F., CONQUET, F., SCHIBLER, U., BONFILS, C. (1999) Circadian expresión of the steroid 15 alpha-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol. Cell Biol.* 19:6488-6499.
- LECCI, A., SANTICIOLI, P., MAGGI, C.A. (2002) Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2:630-641
- LEE, P.P.N., PANG, S.F. (1993) Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol. Signals* 12:181-193.
- LEJA-SZPAK, A., JAWOREK, J., NAWROT-PORABKAK, K., PALONEK, M., MITIS-MUSIOL, M., DEMBINSKI, A., KONTUREK, S.J., PAWLIK, W.W. (2004a) Modulation of pancreatic enzyme secretion by melatonin and its precursors L-tryptophan. Role of CCK and afferent nerves. *J. Physiol. Pharmacol.* 55:33-46.
- LEJA-SZPAK, A., JAWOREK, J., TOMASZEWSKA, R., NAWROT, K., BONIOR, J., KOT, M., PALONEK, M., STACHURA, J., CZUPRYNA, A., KONTUREK, S.J., PAWLIK, W.W. (2004b) Melatonin precursor, L-tryptophan protects the pancreas from the development of acute pancreatitis through the central site action. *J. Physiol. Pharmacol.* 55:339-354.
- LEPAGE, O., LARSON, E.T., MAYER, I., WINBERG, S. (2005) Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout. *J. Pineal Res.* 38: 264-271.
- LERNER, A.B., CASE, J.D., TAKAHASHI, Y. (1958) Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80:2057-2058.
- LESAUTER, J., HOQUE, N., WEINTRAUB, M., PFAFF, D.W., SILVER, R. (2009) Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:13582-13587.
- LEWINSKI, A., RYBICKA, I., WAJS, E., SZKUDLINSKI, M., PAWLIKOWSKI, M. (1991) Influence of pineal indoleamines on the mitotic activity of gastric and colonic epithelial cells in the rat: interaction with omeprazole. *J. Pineal Res.* 10:104-108.
- LIU, A.C., WELSH, D.K., KO, C.H., TRAN, H.G., ZHANG, E.E., PRIEST, A.A., BUHR, E.D., SINGER, O., MEEKER, K., VERMA, I.M., DOYLE, F.J., TAKAHASHI, J.S., KAY, S.A. (2007) Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* 129:605-616.
- LÓPEZ-PATIÑO, M.A., GUIJARRO, A.I., ISORNA, E., DELGADO, M.J., ALONSO-GÓMEZ, A.L. (2007) Regulación por la temperatura de la ritmicidad de los receptores de melatonina en la tenca (*Tinca tinca*, L.). En: *Avanços em Endocrinologia Comparativa Vol III*. (Eds.: A.V.M. Canário y D.M. Power) CCMAR, Universidade do Algarve. pp. 149-153.
- LÓPEZ-PATIÑO, M.A., ALONSO-GÓMEZ, A.L., GUIJARRO, A.I., ISORNA, E., DELGADO, M.J. (2008) Melatonin receptors in brain areas and ocular tissues of the teleost *Tinca tinca*. Characterization and effect of temperature. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155: 847-856.

- LÓPEZ-OLMEDA, J.F., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2006a) Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comp. Biochem. Physiol. A* 144:180-187.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F., BAYARRI, M.J., ROL DE LAMA, M.A., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2006b) Effects of melatonin administration on oxidative stress and daily locomotor activity patterns in goldfish. *J. Physiol. Biochem.* 62:17-25.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F., EGEA-ÁLVAREZ, M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2009) Glucose tolerance in fish: is the daily feeding time important? *Physiol. Behav.* 96:631-636.
- 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.
- MAEDA, H., YAMAHATA, A., NISHIKAWA, S., YOSHINAGA, K., KOBAYASHI, S. (1992) Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116:369-375.
- MADRID, J.A. (2006) Los relojes de la vida. Una introducción a la cronobiología. En: *Cronobiología básica y clínica* (Eds.: J.A. Madrid y M.A. Rol de Lama). Editec@Red, Madrid, España. Cap. 1 pp 39-82.
- MADRID, J.A., BOUJARD, T., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2001) Feeding rhythms. En: *Food intake in fish*. (Eds: D.F. Houlihan, T. Boujard, M. Jobling). Blackwell Science, Oxford. pp 189-215.
- MAILLIET, F., FERRY, G., VELLA, F., BERGER, S., COGE, F., CHOMARAT, P., MALLET, C., GUENIN, S.P., GUILLAUMET, G., VIAUD-MASSUARD, M.C., YOUS, S., DELAGRANGE, P., BOUTIN, J.A. (2005) Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH: quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem. Pharmacol.* 71:74-88.
- MANDL, P., KISS, J.P. (2007) Role of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of gastrointestinal motility. *Brain Res. Bull.* 72:194-200.
- MATSUDA, K., KASHIMOTO, K., HIGUCHI, T., YOSHIDA, T., UCHIYAMA, T., UCHIYAMA, M., SHIODA, S., ARIMURA, A., OKAMURA, T. (2000) Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its relaxant activity in the rectum of a teleost, the stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides* 21:821-827.
- MAYER, L., BORNSTAF, C., BORG, B. (1997) Melatonin in non-mammalian vertebrates: physiological role in reproduction? *Comp. Biochem. Physiol. A* 118:515-531.
- MAYWOOD, E.S., REDDY, A.B., WONG, G.K.Y., O'NEILL, J.S., O'BRIEN, J.A., MCMAHON, D.G., HARMAR, A.J., OKAMURA, H., HASTINGS, M.H. (2006) Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signalling. *Curr. Biol.* 16:599-605.
- MAZURAS, D., BRIERLEY, I., ANGLADE, I., DREW, J., RANDALL, C., BROMAGE, N., MICHEL, D., KAH, O., WILLIAMS, L.M. (1999) Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J. Comp. Neurol.* 409:313-324.
- MCCORD, C.P., ALLEN, F.P. (1917) Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 23:207-224.
- MCVAY, J.A., KANAN, H.W. (1940) The digestive tract of *Carassius auratus*. *Biol. Bull.* 78: 53-67.
- MELMGREN, E.M., JOHNSON, S.L. (2005) kitb, a second zebrafish ortholog of mouse Kit. *Dev. Genes Evol.* 215:470-477.
- MENAKER, M., MOREIRA, L.F., TOSINI, G. (1997) Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian J. Med. Biological Res.* 30:305-313.
- MENDOZA, J. (2007) Circadian clocks: setting time by food. *J. Neuroendocrinol.* 19:127-137.

- MENDOZA, J., ANGELES-CASTELLANOS, M., ESCOBAR, C.A. (2005a) A daily palatable meal without food deprivation entrains the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur. J. Neurosci.* 22:2855-2862.
- MENDOZA, J., GRAFF, C., DARDENTE, H., PÉVET, P., CHALLET, E. (2005b) Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J. Neurosci.* 25:1514-1522.
- MENDOZA, J., DREVET, K., PÉVET, P., CHALLET, E. (2008a) Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *J. Neuroendocrinol.* 20:251-260.
- MENDOZA, J., PÉVET, P., CHALLET, E. (2008b) High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J. Physiol.* 586:5901-5910.
- MESSNER, M., HUETHER, G., LORF, T., RAMADORI, G., SCHWÖRER, C. (2001) Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life Sci.* 69:543-551.
- MIEDA, M., WILLIAMS, S.C., RICHARDSON, J.A., TENAKA, K., YANAGISAWA, M. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:12150-12155.
- MIGAUD, H., DAVIE, A., MARTÍNEZ-CHAVEZ, C.C., AL-KHAMEES, S. (2007) Evidence for differential photic regulation of pineal melatonin synthesis in teleost. *J. Pineal Res.* 43:327-335.
- MIÑANA-SOLIS, M.C., ANGELES-CASTELLANOS, M., FEILLET, C., PÉVET, P., CHALLET, E., ESCOBAR, C. (2009) Differential effects of a restricted feeding schedule on clock-gene expression in the hypothalamus of the rat. *Chronobiol. Int.* 26:808-820.
- MISTLBERGER, R.E. (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18:171-195.
- MISTLBERGER, R.E., YAMAZAKI, S., PENDERGAST, J.S., LANDRY, G.J., TAKUMI, T., NAKAMURA, W. (2008) Comment on "Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms". *Science* 322:675-677.
- MISTLBERGER, R.E., BUIJS, R.M., CHALLET, E., ESCOBAR, C., LANDRY, G.J., KALSBECK, A., PÉVET, P., SHIBATA, S. (2009) Food anticipation in *Bmal1* $-/-$ and AAV-*Bmal1* rescued mice: a reply to Fuller et al. *J. Circadian Rhythms* 7:11.
- MONROE, K.K., WATTS, S.W. (1998) The vascular reactivity of melatonin. *Gen. Pharmacol.* 30:31-35.
- MORIYA, T., AIDA, R., KUDO, T., AKIYAMA, M., DOI, M., HAYASAKA, N., NAKAHATA, N., MISTLBERGER, R., OKAMURA, H., SHIBATA, S. (2009) The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for food-anticipatory circadian rhythms of behaviour, temperature or clock gene expression in mice. *Eur. J. Neurosci.* 29:1447-1460.
- MUELLER, L.R., DUKE, G.E., EVANSON, O.A. (1990) Investigation of the migrating motor complex in domestic turkeys. *Am. J. Physiol.* 259:G329-G333.
- MUHLBAUER, E., WOLGAST, S., FINCKH, U., PESCHKE, D., PESCHKE, E. (2004) Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett.* 564:91-96.
- MUÑOZ, J.L.P., CEINOS, R.M., SOENGAS, J.L., MÍGUEZ, J.M. (2009) A simple and sensitive method for determination of melatonin in plasma, bile and intestinal tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatography B* 877:2173-2177.
- MUSCELLA, A., GRECO, S., ELIA, M.G., JIMÉNEZ, E., STORELLI, C., MARSIGLIANTE, S. (2002) Muscarinic acetylcholine receptor activation induces Ca^{2+} mobilization and Na^+/K^+ -ATPase activity inhibition in eel enterocytes. *J. Endocrinol.* 173:325-334.
- MUUS, B.J., DAHLSTRÖM, P. (1981) Los peces de agua dulce de España y Europa. Ed. Omega. Madrid, España. pp 132-135.

- NAKAMURA, K., KURAOKA, A., KAWABUCHI, M., SHIBATA, Y. (1998) Specific localization of gap junction protein, connexin45, in the deep muscular plexus of dog and rat small intestine. *Cell. Tissue Res.* 292:487-494.
- NARANJO, M.C., GUERRERO, J.M., RUBIO, A., LARDONE, P.J., CARRILLO-VICO, A., CARRASCOSA-SALMORAL, M.P., JIMÉNEZ-JORGE, S., ARELLANO, M.V., LEAL-NOVAL, S.R., LEAL, M., LISSEN, E., MOLINERO, P. (2007) Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell.Mol.Life Sci.* 64:781-790.
- NELSON, L.E., SHERIDAN, M.A. (2006) Gastroenteropancreatic hormones and metabolism in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148:116-124.
- NELSON, W., TONG, U., LEE, J., HALBERG, F. (1979) Methods for cosinor rhythmometry. *Chronobiologia* 6:305-323.
- NIEUWENHUIJS, V.B., VERHEEM, A., VAN DUIJVENBODE-BEUMER, H., VISSER, M.R., VERHOEF, J., GOOSZEN, H.G., AKKERMANS, L.M.A. (1998) The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann. Surgery* 228:188-193.
- NISHIDA, S., SEGAWA, T., MURAI, I., NAGAKAWA, S. (2002) Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid composition in type 2 diabetic rats via restoration of delta-5 desaturase activity. *J. Pineal Res.* 32:26-33.
- NISHIDA, S., SATO, R., MURAI, I., NAGAKAWA, S. (2003) Effect of pinealectomy on plasma levels of insulin and leptin in type 2 diabetic rats. *J. Pineal Res.* 35:251-256.
- NOSJEAN, O., FERRO, M., COGE, F., BEAUVERGER, P., HENLIN, J.M., LEFOULON, F., FAUCHERE, J.L., DELAGRANGE, P., CANET, E., BOUTIN, J.A. (2000) Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275:31311-31317.
- NOWAK, J.Z., ZAWILSKA, J.B., WOLDAN-TAMBOR, A. (1995) Arylamine and arylalkylamine N-acetyltransferases in retina, pineal gland, brain and liver of chicks: a comparative study. *Neurochem. Int.* 27:285-297.
- OLIVEIRA, C., ORTEGA, A., LÓPEZ-OLMEDA, J.F., VERA, L.M., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2007) Influence of constant light and darkness, light intensity and light spectrum on plasma melatonin rhythms in *Senegal sole*. *Chronobiol. Int.* 24:615-627.
- OLMEZ, E., KURCER, Z. (2003) Melatonin attenuates alpha-adrenergic-induced contractions by increasing the release of vasoactive intestinal peptide in isolated rat penile bulb. *Urol. Res.* 31:276-279.
- OLSSON, C. (2009) Autonomic innervation of the fish gut. *Acta Histochem.* 111:185-195.
- OLSSON, C., KARILA, P. (1995) Coexistence of NADPH-diaphorase and vasoactive intestinal polypeptide in the enteric nervous system of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) and the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Cell. Tissue Res.* 280:297-305.
- OLSSON, C., HOLMGREN, S. (1997) Nitric oxide in the fish gut. *Comp. Biochem. Physiol. A* 118:959-964.
- OLSSON, C., HOLMGREN, S. (2001) The control of gut motility. *Comp. Biochem. Physiol. A* 128:481-503.
- OLSSON, C., HOLMBERG, A., HOLMGREN, S. (2008) Development of enteric and vagal innervation of the zebrafish (*Danio rerio*) gut. *J. Comp. Neurol.* 508:756-770.
- OHNO, S., MURAMOTO, J., CHRISTIAN, L. (1967). Diploid-tetraploid relationship among Old-World members of the fish family Cyprinidae. *Chromosoma* (Berl.) 23:1-9.
- PANDA, S., HOGENESH, J.B., KAY, S.A. (2002a) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329-335.

- PANDA, S., SATO, T.K., CASTRUCCI, A.M., ROLLAG, M.D., DEGRIP, W.J., HOGENESCH J.B., PREVENCIO, I. (2002b) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298:2213-2216.
- PANDI-PERUMAL, S.R., SRINIVASAN, V., MAESTRONI, G.J.M., CARDINALI, D.P., POEGGLER, B., HARDELAND, R. (2006) Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal* 273:2813-2838.
- PANDI-PERUMAL, S.R., TRAKHT, I., SRINIVASAN, V., SPENCE, D.W., MAESTRONI, G.J.M., ZISAPEL, N., CARDINALI, D.P. (2008) Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85:335-353.
- PANDO, M.P., PINCHAK, A.B., CERMAKIAN, N., SASSONE-CORSI, P. (2001) A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10178-10183.
- PARDINI, L., KAEFFER, B., TRUBUIL, A., BOURREILLE, A., GALMICHE, J.P. (2005) Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt. *Chronobiol. Int.* 22:951-961.
- PARDINI, L., KAEFFER, B. (2006) Feeding and circadian clocks. *Reprod. Nutr. Dev.* 5:463-480.
- PARK, Y.J., PARK, J.G., KIM, S.J., LEE, Y.D., SAYDUR RAHMAN, M., TAKEMURA, A. (2006) Melatonin receptor of a reef fish with lunar-related rhythmicity: cloning and daily variations. *J. Pineal Res.* 41:166-174.
- PEIRSON, S.N., BUTLER, J.N., DUFFIELD, G.E., TAKHER, S., SHARMA, P., FOSTER, R.G. (2006) Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 351:800-807.
- PERERA, J., TORMO, A., GARCÍA, J.L. (2002) Ingeniería genética Vol. I: Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA, Ed. Síntesis, Madrid. Cap. 8 pp 223-256.
- PÉVET, P. (1998) Melatonin and biological rhythms. *Thérapie* 53:411-420.
- PÉVET, P. (2003) Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J. Neuroendocrinol.* 15:422-426.
- PINILLOS, M.L., DE PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L., ALONSO-BEDATE, M., DELGADO, M.J. (2001) Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol. Behav.* 72:629-634.
- PITTENDRIGH, C.S. (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25:150-184.
- PITTENDRIGH, C.S. (1993) Temporal organisation: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Ann. Rev. Physiol.* 355:16-54.
- PLAUTZ, J.D., KANEKO, M., HALL, J.C., KAY, S.A. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278:1632-1635.
- POIREL, V.J., CAILOTTO, C., STREICHER, D., PEVET, P., MASSON-PEVET, M., GAUER, F. (2003) MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 24:33-38.
- PONTOIRE, C., BERNARD, M., SILVAIN, C., COLLIN, J.P., VOISIN, P. (1993) Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. *Eur. J. Pharmacol.* 247:11-18.
- POON, A.M.S., CHOW, P.H., MAK, A.S.Y., PANG, S.F. (1997) Autoradiographic localization of $2[^{125}\text{I}]$ iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J. Pineal Res.* 23:5-14.

- POPESKU, J.T., MARTYNIUK, C.J., MENNIGEN, J., XIONG, H., ZHANG, D., XIA, X., COSSINS, A.R., TRUDEAU, V.L. (2008) The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 293:43-56.
- QUASTEL, M.R., RAHAMIMOFF, R. (1965) Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hidroxytryptamine of rat isolated duodenum. *Br. J. Pharmacol.* 24:455-461.
- QUAY, W.B., MA, Y.H. (1976) Demonstration of gastrointestinal hydroxyindole-O-methyltransferase. *Int. Rep. Clin. Sci. Med. Sci. Lib.* 4:563-569.
- RAIKHLIN, N.T., KVETNOY, I.M., TOLKACHEV, V.N. (1975) Melatonin may be synthesized in enterochromaffin cells. *Nature* 255:344-345.
- RANDALL, D., BURGGREN, W., FRENCH, K. (2002) Eckert: Animal Physiology (mechanisms and adaptations). 5ª Ed. W. H. Freeman, New York. Cap. 15 pp 683-724.
- RAVINDRA, T., LAKSHMI, N.K., AHUJA, Y.R. (2006) Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. *Indian J. Med. Sci.* 60:523-535.
- REEBS, S.G. (2002) Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 12:349-371.
- REFINETTI, R. (2006) Circadian physiology. Ed. CRC Press. Florida, Estados Unidos.
- REITER, R.J. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12:151-180.
- REITER, R.J. (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654-664.
- REITER, R.J., TAN, D.X., MANCHESTER, L.C., EL SAWI, M.R. (2002) Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959:238-250.
- REPERT, S.M., WEAVER, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.
- REPERT, S.M., WEAVER, D.R., CASSONE, V.M., GODSON, C., KOLAKOWSKI JR., L.F. (1995) Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15:1003-1015.
- REPERT, 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.
- REYES-VÁZQUEZ, C., NARANJO-RODRÍGUEZ, E.B., GARCÍA-SEGOVIANO, J.A., TRUJILLO-SANTANA, J.T., PRIETO-GÓMEZ, B. (1997) Apamin blocks the direct relaxant effect of melatonin on rat ileal smooth muscle. *J. Pineal Res.* 22:1-8.
- RIBELAYGA, C., WANG, Y., MANGEL, S.C. (2002) Dopamine mediates circadian clock regulation of rod and cone input to fish retinal horizontal cells. *J. Physiol.* 544: 801-816.
- RIBELAYGA, C., WANG, Y., MANGEL, S.C. (2004) A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors. *J. Physiol.* 554: 467-482.
- RICH, A. (2009) A new high-content model system for studies of gastrointestinal transit: the zebrafish. *Neurogastroenterol. Motil.* 21:225-228.
- RICH, A., LEDDON, S.A., HESS, S.L., GIBBONS, S.J., MILLER, S., XU, X., FARRUGAI, G. (2007) Kit-like immunoreactivity in the zebrafish gastrointestinal tract reveals putative ICC. *Devel. Dyn.* 236:903-911.
- RICHTER, C.P.A. (1922) A behaviouristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monogr.* 1:1-55.

- RUAN, G.X., ALLEN, G.C., YAMAZAKI, S., MCMAHON, D.G. (2008) An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol.* 6:e249.
- RUBIO, V.C., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, J., MADRID, J.A. (2004) Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Pineal Res.* 37:42-47.
- RUMESSEN, J.J., THUNEBERG, L. (1996) Pacemaker cells in the gastrointestinal tract: interstitial cells of Cajal. *Scand. J. Gastroenterol.* 31:82-94.
- SALLINEN, P., SAARELA, S., ILVES, M., VAKKURI, O., LEPPALUOTO, J. (2005) The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci.* 76: 1123-1134.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual Vol. 1. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Cap. 7.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A. (2001) Feeding anticipatory activity. En: *Food intake in fish*. (Eds: D.F. Houlihan, T. Boujard, M. Jobling). Blackwell Science, Oxford. pp 216-232.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A., ZAMORA, S., IIGO, M., TABATA, M. (1996) Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol. Behav.* 60:665-674.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID, J.A., ZAMORA, S., TABATA, M. (1997) Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A* 181:121-132.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., YAMAMOTO, T., AKIYAMA, T., MADRID, J.A., TABATA, M. (1998) Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol. Behav.* 64:211-218.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., ARANDA, A., MADRID, J.A. (2001) Differential effects of meal size and food energy density on feeding entrainment in goldfish. *J. Biol. Rhythms* 16:58-65.
- SANDERS, K.M., KOH, S.D., WARD, S.M. (2006) Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Physiol.* 68:307-343.
- SARR, M.G., CULLEN, J.J., OTTERSON, M.F. (2001) Gastrointestinal motility. En: *Surgical research*. (Ed.: W.W. Souba, D.W. Wilmore). Academic Press, London. Cap. 40 pp 507-569.
- SATAKE, N., SHIBATA, S., TAKAGI, T. (1986) The inhibitory action of melatonin on the contractile response to 5-hydroxytryptamine in various isolated vascular smooth muscles. *Gen. Pharmacol.* 17:553-558.
- SAUZET, S., BESSEAU, L., HERRERA PÉREZ, P., COVÈS, D., CHATAIN, B., PEYRIC, E., BOEUF, G., MUÑOZ-CUETO, J.A., FALCÓN, J. (2008) Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157:186-195.
- SAVASKAN, E., JOCKERS, R., AYOUB, M., ANGELONI, D., FRASCHINI, F., FLAMMER, J., ECKERT, A., MULLER-SPAHN, F., MEYER, P. (2007) The MT₂ melatonin receptor subtype is present in human retina and decreases in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 4:47-51.
- SÉBERT, M.E., LEGROS, C., WELTZIEN, F.A., MALPAUX, B., CHEMINEAU, P., DUFOUR, S. (2008) Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. *J. Neuroendocrinol.* 20:917-929.

- SEO, J.S., KIM, M.S., PARK, E.M., AHN, S.J., KIM, N.Y., JUNG, S.H., KIM, J.W., LEE, H.H., CHUNG, J.K. (2009) Cloning and characterization of muscarinic receptor genes from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Cells* 27:383-390.
- SHIDA, C.S., CASTRUCCI, A.M., LAMY-FREUND, M.T. (1994) High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* 16:198-201.
- SHIMIZU, Y., MATSUYAMA, H., SHIINA, T., TAKEWAKI, T., FURNESS, J.B. (2008) Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:295-311.
- SILVER, R., LESAUTER, J., TRESKO, P.A., LEHMAN, M.N. (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810-813.
- SIM, E., LACK, N., WANG, C.J., LONG, H., WESTWOOD, I., FULLAM, E., KAWAMURA, A. (2008) Arylamine *N*-acetyltransferases: structural and functional implications of polymorphisms. *Toxicology* 254:170-183.
- SJOBLOM, M., FLEMSTROM, G. (2003) Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion. *J. Pineal Res.* 34:288-293.
- SLOMINSKI, A., TOBIN, D.J., ZMIJEWSKI, M.A., WORTSMAN, J., PAUS, R. (2008) Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *TRENDS Endocrinol. Metab.* 19:17-24.
- SMITH, L.S. (1980) Digestion in teleost fishes. En: *Fish feed technologies* Ed. FAO/UNDP www.fao.org Cap. 1 pp 2-20.
- STANLEY, L.A., COPP, A.J., POPE, J., ROLLS, S., SMELT, V., PERRY, V.H., SIM, E. (1998) Immunochemical detection of arylamine *N*-acetyltransferase during mouse embryonic development and in adult mouse brain. *Teratology* 58:174-188.
- STEBELOVÁ, K., ANTTILA, K., MÄNTTÄRI, S., SAARELA, S., ZEMAN, M. (2010) Immunohistochemical definition of MT2 receptors and melatonin in the gastrointestinal tissues of rat. *Acta Histochem.* 112:26-33.
- STEFULJ, J., HÖRTNER, M., GHOSH, M., SCHAUNSTEIN, K., RINNER, I., WÖFLER, A., SEMMLER, J., LIEBMANN, P.M. (2001) Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.* 30:243-247.
- STEPHAN, F.K. (2002) The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* 17:284-292.
- STEPHAN, F.K., SWANN, J.M., SISK, C.L. (1979) Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Neural Biol.* 25:346-363.
- STOCK, D.W. (2007) Zebrafish dentition in comparative context. *J. Exp. Zool. B* 308:523-549.
- STOKKAN, K.A., YAMAZAKI, S., TEI, H., SAKAKI, Y., MENAKER, M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291:490-493.
- STORCH, K.F., WEITZ, C.J. (2009) Daily rhythms of food-anticipatory behavioural activity do not require the known circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:6808-6813.
- STORR, M., SCHUSDZIARRA, V., ALLESCHER, H.D. (2000) Inhibition of small conductance K⁺-channels attenuated melatonin-induced relaxation of serotonin-contracted rat gastric fundus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78:799-806.
- STORR, M., KOPPITZ, P., SIBAEV, A., SAUR, D., KURJAK, M., FRANCK, H., SCHUSDZIARRA, V., ALLESCHER, H.-D. (2002) Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents *in vitro*. *J. Pineal Res.* 33:101-108.

- STRUBBE, J.H., VAN DIJK, G. (2002) The temporal organization of ingestive behaviour and its interaction with regulation of energy balance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26:485-498.
- SUMOVÁ, A., BENDOVIÁ, M., SLÁDEK, M., EL-HENNAMY, R., MATĚJŮ, K., POLIDAROVÁ, L., SOSNIYENKO, S., ILLNEROVÁ, H. (2008) Circadian molecular clocks tick along ontogenesis. *Physiol. Res.* 57:S139-S148.
- SUTTON, G.M., PÉREZ-TILVE, D., NOGUEIRAS, R., FANG, J., KIM, J.K., CONE, R.D., GIMBLE, J.M., TSCHÖP, M.H., BUTLER, A.A. (2008) The melanocortin-3 receptor is required for entrainment to meal intake. *J. Neurosci.* 28:12946-12955.
- SZURSZEWSKI, J. (1969) A migrating electric complex of the canine small intestine. *Am. J. Physiol.* 217:1757-1763.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L.C., REITER, R.J., QI, W., HANES, M., FARLEY, N.J. (1999) High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 65:2523-2529.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L.C., TERRON, M.P., FLORES, L.J., REITER, R.J. (2007) One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 42:28-42.
- TANOVIC, A., JIMÉNEZ, M., FERNÁNDEZ, E. (2001) Actions of NO donors and endogenous nitrenergic transmitter on the longitudinal muscle of rat ileum *in vitro*: mechanisms involved. *Life Sci.* 69:1143-1154.
- THOMAS, K.B., ZAWILSKA, J., IUVONE, P.M. (1990) Arylalkylamine (serotonin) *N*-acetyltransferase assay using high-performance liquid chromatography with fluorescence or electrochemical detection of *N*-acetyltryptamine. *Anal. Biochem.* 184:228-234.
- TIJMES, M., PEDRAZA, R., VALLADARES, L. (1996) Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids* 61:65-68.
- TODA, N., HERMAN, A.G. (2005) Gastrointestinal function regulation by nitrenergic efferent nerves. *Pharmacol. Rev.* 57:315-338.
- TOSINI, G., MENAKER, M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272:419-421.
- TOSINI, G., POZDEYEV, N., SAKAMOTO, K., IUVONE, P.M. (2008) The circadian clock system in the mammalian retina. *BioEssays* 30: 624-633.
- TRISCHITTA, F., DENARO, M.G., FAGGIO, C. (1999) Effects of acetylcholine, serotonin and noradrenalin on ion transport in the middle and posterior part of *Anguilla anguilla* intestine. *J. Comp. Physiol. B* 169:370-376.
- UCHIYAMA, T., CHESS-WILLIAMS, R. (2004) Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J. Smooth Muscle Res.* 40:237-247.
- VAKKURI, O., RINTAMAKI, H., LEPPALUOTO, J. (1985) Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *J. Endocrinol.* 105:263-268.
- VALLONE, D., FRIGATO, E., VERNESI, C., FOA, A., FOULKES, N.S., BERTOLUCCI, C. (2007) Hypothermia modulates circadian clock gene expression in lizard peripheral tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:160-166.
- VAN DER WINDEN, J.M. (1999) Role of interstitial cells of Cajal and their relationship with the enteric nervous system. *Eur. J. Morphol.* 37:250-256.
- VANNESTE, G., ROBBERECHT, P., LEFEBVRE, R.A. (2004) Inhibitory pathways in the circular muscle of rat jejunum. *Br. J. Pharmacol.* 143:107-118.

- VANTRAPPEN, G., JANSSENS, J., HELLEMANS, J., GHOOS, Y. (1997) The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J. Clin. Invest.* 59:1158-1166.
- VATINE, G., VALLONE, D., APPELBAUM, L., MRACEK, P., BEN-MOSHE, Z., LAHIRI, K., GOTHILF, Y., FOULKES, N.S. (2009) Light directs zebrafish period2 expression via conserved D and E boxes. *PLoS Biol.* 7:e10000223.
- VELASCO MARTÍN, A. (2001) Técnicas instrumentales *in vitro*. En: *Compendio de farmacología general*. Díaz de Santos, Madrid. Cap. 13 pp 287-297.
- VERA, L.M., DE PEDRO, N., GÓMEZ-MILÁN, E., DELGADO, M.J., SÁNCHEZ-MUROS, M.J., MADRID, J.A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. (2007) Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol. Behav.* 90:518-524.
- VOLFF, J.N. (2005) Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94:280-294.
- VOLKOFF, H. (2006) The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 144:325-331.
- VUILLEUMIER, R., BOEUF, G., FUENTES, M., GEHRING, W.J., FALCÓN, J. (2007) Cloning and early expression pattern of two melatonin biosynthesis enzymes in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Eur. J. Neurosci.* 25:3047-3057.
- WALLACE, K.N., AKHTER, S., SMITH, E.M., LORENT, K., PACK, M. (2005) Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech. Dev.* 122:157-173.
- WANG, Y., MANGEL, S.C. (1996) A circadian clock regulates rod and cone input to fish retinal cone horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 4655-4660.
- WAUTIER, K., VAN DER HEYDEN, C., HUYSSSEUNE, A. (2001) A quantitative analysis of pharyngeal tooth shape in the zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei, Cyprinidae). *Arch. Oral Biol.* 46:67-75.
- WEBB, I.C., BALTAZAR, R.M., LEHMAN, M.N., COOLEN, L.M. (2009) Bidirectional interactions between the circadian and reward systems: is restricted food access a unique zeitgeber? *Eur. J. Neurosci.* 30:1739-1748.
- WEI, Y., MARTIN, S.C., HEINRICH, G., MOJSOV, S. (1998) Cloning and functional characterization of PACAP-specific receptors in zebrafish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865:45-48.
- WINDMILL, K.F., GAEDIGK, A., HALL, P.M., SAMARATUNGA, H., GRANT, D.M., MCMANUS, M.E. (2000) Localization of *N*-acetyltransferases NAT1 and NAT2 in human tissues. *Toxicol. Sci.* 54:19-29.
- WINGATE, D.L. (1981) Backwards and forwards with the migrating complex. *Dig. Dis. Sci.* 26:641-666.
- WITHERS, P.C. (1992) Comparative animal physiology. Saunders College Publishing. Orlando, Florida pp. 902-907.
- WHITMORE, D., FOULKES, N.S., STRAHLE, U., SASSONE-CORSI, P. (1998) Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat. Neurosci.* 1:701-707.
- WONG, M.L., MEDRANO, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39:1-11.
- WOOD, J.D., ALPERS, D.H., ANDREWS, P.L. (1999) Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 45:6-16.

- WRIGHT, M.L., FRANCISCO, L.L., SCOTT, J.L., RICHARDSON, S.E., CARR, J.A., KING, A.B., NOYES, A.G., VISCONTI, R.F. (2006) Effects of bilateral and unilateral ophtalmectomy on plasma melatonin in *Rana* tadpoles and froglets under various experimental conditions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147:158-166.
- WU, T., JIN, Y., NI, Y., ZHANG, D., KATO, H., FU, Z. (2008a) Effects of light cues on re-entrainment of the food-dominated peripheral clocks in mammals. *Gene* 419:27-34.
- WU, T., JIN, Y., KATO, H., FU, Z. (2008b) Light and food signals cooperate to entrain the rat pineal circadian system. *J. Neurosci. Res.* 86:3246-3255.
- YAHYAVI-FIROUZ-ABADI, N., TAHSILI-FAHADAN, P., RIAZI, K., GHAHREMANI, M.H., DEHPOUR A.R. (2006) Involvement of nitric oxide pathway in the acute anticonvulsant effect of melatonin in mice. *Epilepsy Res.* 68:103-113.
- YAHYAVI-FIROUZ-ABADI, N., TAHSILI-FAHADAN, P., GHAHREMANI, M.H., DEHPOUR A.R. (2007) Melatonin enhances the rewarding properties of morphine: involvement of the nitric oxidergic pathway. *J. Pineal Res.* 42:323-329.
- YOSHIMURA, T., SUZUKI, Y., MAKINO, E., SUZUKI, T., KUROIWA, A., MATSUDA, Y., NAMIKAWA, T., EBIHARA, S. (2000) Molecular analysis of avian circadian clock genes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 78:207-215.
- ZATZ, M. (1992) Agents that affect calcium influx can change cyclic nucleotide levels in cultured chick pineal cells. *Brain Res.* 583:304-307.
- ZHDANOVA, I.V. (2001) Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* 903:263-268.
- ZHUANG, M., WANG, Y., STEENHARD, B.M., BESHARSE, J.C. (2000) Differential regulation of two period genes in the *Xenopus* eye. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 82:52-64.
- ZILBERMAN-PELED, B., BENHAR, I., COON, S.L., RON, B., GOTHILF, Y. (2004) Duality of serotonin-*N*-acetyltransferase in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): molecular cloning and characterization of recombinant enzymes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 138:139-147.
- ZILBERMAN-PELED, B., RON, B., GROSS, A., FINBERG, J.P.M., GOTHILF, Y. (2006) A possible new role for fish retinal serotonin-*N*-acetyltransferase-1 (AANAT1): dopamine metabolism. *Brain Res.* 1073:220-228.
- ZVONIC, S., PTITSYN, A.A., CONRAD, S.A., SCOTT, L.K., FLOYD, Z.E., KILROY, G., WU, X., GOH, B.C., MYNATT, R.L., GIMBLE, J.M. (2006) Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* 55:962-970.