

Neuroendocrinología de los ritmos circadianos

M. Ramírez / M.^a J. Ramírez / J. M. Martínez / I. Prieto / B. Sánchez / E. Alba

Ritmos circadianos

La vida animal, y no digamos la vegetal, está sujeta irremediablemente en la estricta dinámica astronómica. La tierra gira sobre su eje y alrededor del sol, dando lugar a períodos cíclicos de luz y oscuridad y también a ciclos estacionales. Tales ciclos existen mucho antes de la aparición de la vida sobre la tierra. Debido a ello, es de suponer que las características de la vida animal se desarrollaran y probablemente evolucionaran, inmersas y condicionadas a la existencia de tales ciclos. No es de extrañar que la morfología y funciones de los organismos reflejen de alguna manera la influencia, durante miles de millones de años, de unas inalterables condiciones cíclicas ambientales. Por lo tanto, una ca-

El carácter geofísico de la tierra aporta una condición cíclica natural, a la cual ineludiblemente deben de adaptarse y responder los seres vivos, incluyendo los seres humanos. Como resultado, virtualmente todos los organismos han desarrollado un sistema interno, no sólo capaz de reaccionar a esa naturaleza cíclica de estímulos ambientales, sino también capaz de anticiparse a ese ritmo externo con programas internos de carácter metabólico, fisiológico, endocrino, conductual, etc. En el presente trabajo se revisan brevemente el concepto de ritmo circadiano, la terminología implicada, las investigaciones que llevaron al descubrimiento de las estructuras cerebrales implicadas en su regulación y la influencia de factores exógenos y endógenos en el desarrollo de tales ritmos. Además, se describen algunos de los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio con el fin de analizar el posible comportamiento cíclico de la actividad enzimática que regula en parte la función de diversos neuropéptidos cerebrales.

característica básica de la vida es su condición cíclica y virtualmente, todos los organismos han desarrollado un sistema interno, no sólo capaz de reaccionar a esa naturaleza rítmica de estímulos, sino también capaz de anticiparse a ellos con programas internos de carácter metabólico, fisiológico, endocrino, conductual, etc. Estos procesos tienen un patrón cíclico, se denominan genéricamente como biorritmos y están

marcados y regulados, directa o indirectamente por el sistema nervioso.

En este contexto, se sabe que la mayor parte de las hormonas hipotalámicas y como consecuencia las hipofisarias, están sujetas a un ritmo de liberación, en principio *circadiano* (del Latín *circa*: cerca, y *diem*: día, es decir, de cerca de un día, porque su período, bajo condiciones constantes, es cercano a, pero es muy raro que sea de exactamente 24 horas). Este ritmo está regulado, como se

Palabras clave: Biorritmos. Núcleo supraquiasmático. Melatonina. Arginina aminopeptidasa.

Fecha de recepción: Diciembre 1997.

verá posteriormente, por la acción de un núcleo hipotalámico: el *núcleo supraquiasmático*, en contacto directo con la retina, lo que le informa de las condiciones de luz y oscuridad ambiental. Además, superpuesto a este ritmo circadiano, hay una liberación pulsátil o episódica de las hormonas, lo cual, en determinados casos, es esencial para que se ejerzan correctamente sus efectos. Tal es el caso, por ejemplo, de la necesidad de que las gonadotropinas se liberen de forma pulsátil; en caso contrario, se producen ciclos anovulatorios con la consiguiente infertilidad.

Para establecer la terminología referente a los ritmos circadianos, podemos usar una variable circadiana bien conocida: el ritmo diario en la temperatura corporal que manifiesta un ciclo muy marcado que se repite cada 24 h. (figura 1). La temperatura máxima corporal tiene lugar aproximadamente hacia las últimas horas de la tarde (17h-18h). Se trata de la *acrofase* o *cenit*. Sin embargo, los valores mínimos de temperatura tienen lugar en las últimas horas de la noche (5h-6h), lo cual se conoce con el término de *nadir*. El valor que se extiende entre ambos puntos se denomina *amplitud* y el valor medio de temperatura, comprendido entre ambos extremos de la curva, se conoce como *mesor*. Por acuerdo, el punto que se usa como referencia en investigación es el *nadir*. De esta forma, se dice que un ritmo está «adelantado», cuando su nadir tiene lugar anterior al nadir de referencia estándar (p.e. las 5h), y se dice que está «atrasado», cuando su nadir acontece posterior a ese punto (1).

Se podrían definir los ritmos biológicos como aquellos acontecimientos que dentro de un sistema animal, se repiten a intervalos más o menos regulares. Tales ritmos se suelen clasificar dependiendo de la frecuencia con que se repite el mismo acontecimiento, por lo tanto, no sorprende que el ritmo biológico predominante sea aquél que ocurre coincidiendo con el ciclo geofísico del día y de la noche, el ritmo circadiano. Todas las especies han desarrollado este tipo de

ritmos en su fisiología y son absolutamente fundamentales para el buen funcionamiento del organismo. Sometidos a un ritmo circadiano están, por citar algunos, el sistema endocrino, la temperatura corporal, el descanso y la actividad, el sueño y el despertar, funciones motoras etc.

Debido a la estrecha relación que tienen estos ritmos con el día solar, durante mucho tiempo se pensó que eran una respuesta pasiva a los estímulos del entorno, como es el cambio en la intensidad de luz a lo largo del día o el cambio en la temperatura ambiente. Sin embargo, con el tiempo y sobre todo en los últimos años por estudios llevados a cabo en el ser humano y en otros mamíferos, se ha llegado a demostrar que estos ritmos son esencialmente endógenos, generados por un sistema interno. Quizá la primera referencia que tenemos en este sentido fue la de un astrónomo francés que hacia 1979 observó que los movimientos circadianos del tallo y las hojas de una planta, la *minosa púdica*, continuaban produciéndose en ausencia de luz. Tal evidencia demostraba que los movimientos rítmicos de la planta, estaban controlados de forma endógena y no por ciclos ambientales. Esto se volvió a demostrar posteriormente en otros organismos pero en el ser humano y en otros mamíferos, la evidencia ha llegado más recientemente (1). Por lo tanto, si los ritmos circadianos eran generados de forma endógena, era de suponer que existiera un centro nervioso o varios, que los generaran, debía de existir un *reloj biológico* interno. Numerosos investigadores se ocuparon en la tarea de descubrir la estructura o estructuras responsables. Así, en los años 60, RICHTER (2) llevó a cabo una serie de experimentos dirigidos a este fin. Literalmente, lesionó cientos de áreas cerebrales así como órganos endocrinos, pero solamente las lesiones localizadas en el hipotálamo alteraban en mayor o menor grado el desarrollo de los ritmos circadianos, aunque no en su totalidad. Posteriormente, MOORE (3), en la década de los 70, basándose en el conocimiento de que la luz y la oscuridad am-



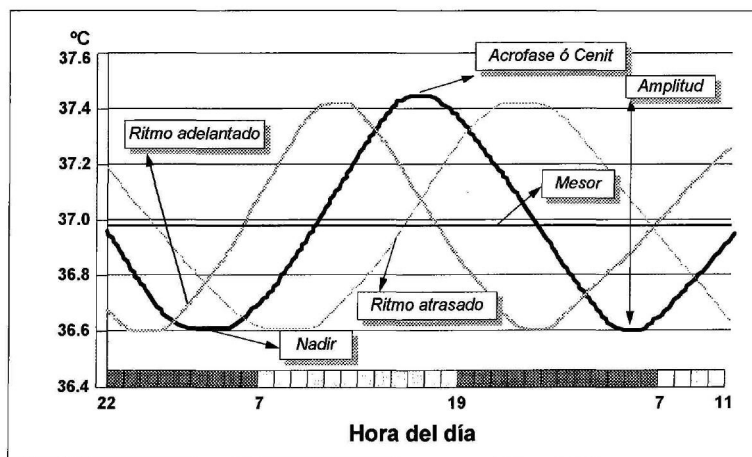


Fig. 1.—Esquema indicativo del ritmo circadiano en la temperatura corporal. Ver explicación en el texto. (Modificado de MURPHY y CAMPBELL, 1986).

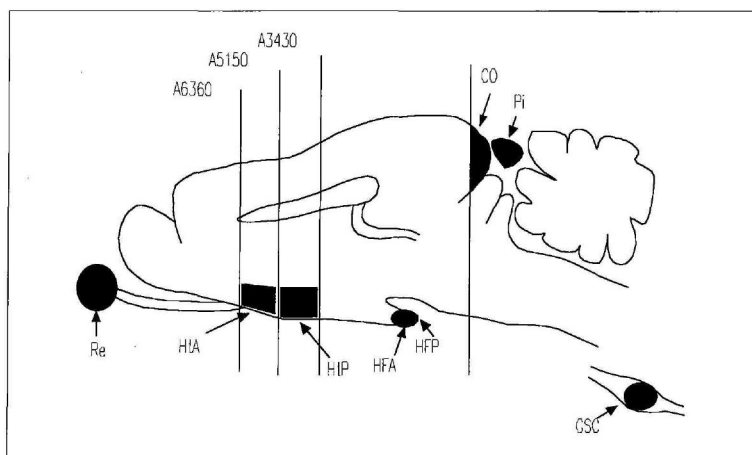


Fig. 2.—Dibujo esquemático en el que se representa, en el cerebro de rata, el circuito fotoneuroendocrino objeto de nuestro estudio, así como las zonas y el nivel anterior a la línea inteauricular, donde se realizaron los cortes coronales. Re, retina, HtA, hipotálamo anterior, HtP, hipotálamo posterior, HFA, hipófisis anterior, HFP, hipófisis posterior, GSC, ganglio superior cervical, CO, corteza occipital, Pi, glándula pineal.

bicntal, de alguna manera «sincronizaban» el sistema circadiano, razonó que ciertas proyecciones procedentes de la retina, deberían terminar o conectar con áreas cerebrales responsables de la regulación de los ritmos circadianos. Una de tales proyecciones terminaba en el núcleo supraquiasmático y cuando éste era destruido, se anulaba completamente la ritmicidad circadiana. Desde entonces, múltiples experimentos han demostrado que el núcleo supraquiasmático actúa como un *reloj biológico* responsable de la generación de los ritmos circadianos. Se trata de un *pacemaker*, un *marcapasos*, y para que una estructura pueda ser considerada como tal, debe poseer dos propiedades fundamentales: 1) el marcapasos debe de ser autosuficiente, es decir, aislado debe continuar demostrando su actividad rítmica durante al menos dos ciclos completos, y 2) el marcapasos debe ejercer su control sobre diversos ritmos circadianos. El núcleo supraquiasmático satisface ambos requerimientos. El primero de ellos se demuestra aislando el núcleo mediante secciones a todo alrededor; tras ello, el núcleo mantiene su actividad metabólica de forma cíclica. Además, si se mantiene el tejido hipotalámico aislado *in vitro*, también se manifiesta su actividad cíclica. El segundo de los requerimientos se demuestra claramente después de la destrucción del núcleo supraquiasmático, tras lo cual, se pierden gran cantidad de ritmos circadianos endocrinos, de conducta etc. (4). Por otro lado, a animales a los que se les había destruido el núcleo supraquiasmático, se les trasplantaron neuronas fetales procedentes de dicho núcleo, lo que les restauró nuevamente su ritmicidad circadiana (5). Otro asombroso experimento, que definitivamente demuestra la condición de marcapasos interno del núcleo supraquiasmático, se realizó en una cepa mutante de hamster, la cual exhibe un ritmo circadiano reducido a 22h. Cuando se trasplantó tejido fetal procedente del núcleo supraquiasmático de la cepa mutante, a animales normales que habían perdido su ritmicidad por

lesiones previas de dicho núcleo, estos recuperaron su actividad rítmica, pero con el ciclo de 22h. del animal donante (6).

La anatomía del núcleo supraquiasmático no está bien definida. Es un sistema complejo, constituido por miles de neuronas de diversos tipos, mediadas por una amplia variedad de neurotransmisores, neuropéptidos y sinapsis. Sus neuronas están más densamente empaquetadas que en otras áreas cerebrales y la mayoría son interneuronas que nunca salen del núcleo. Los límites no están claramente definidos y no hay una neta organización citoarquitectónica, habiéndose sugerido la existencia de dos o tres subdivisiones dentro de su estructura (7), aunque esto no está definitivamente demostrado.

Sin embargo, como apuntábamos al principio, estamos inmersos en un mundo cíclico, con estímulos externos periódicos, entre los cuales predomina el ciclo diario de luz y oscuridad, aunque naturalmente existen otros muchos, cuya importancia también es relevante, tal es el caso de la disponibilidad de comida, la temperatura ambiente, estímulos sociales etc. Tales estímulos externos periódicos se denominan y actúan como *sincronizadores*, conocidos universalmente como *zeitgebers*, literalmente del alemán: *los que dan la hora*; son marcadores del tiempo y ejercen un control decisivo sobre el desarrollo del sistema circadiano endógeno. En definitiva, el ritmo endógeno se ajusta al ritmo exógeno gracias a la influencia de los *zeitgebers*, y si nos atenemos a la influencia de la luz y la oscuridad como *zeitgeber* primario, existe un circuito fotoneuroendocrino, en el que está implicada la glándula pineal, y que regula en parte al núcleo supraquiasmático para la generación de los ritmos circadianos. Esto es debido a que las propiedades rítmicas de la melatonina, son paralelas a los *zeitgebers externos* de luz y oscuridad, por lo que se ha sugerido que la función primaria de la melatonina en los seres humanos, es la de actuar como un *zeitgeber* interno. La melatonina actuaría ajustando los ritmos internos

mediante su liberación periódica por parte de la glándula pineal. Esta liberación estaría bajo el control del marcapasos interno (el núcleo supraquiasmático), que a su vez se vería sincronizado por el entorno externo (1,8). Tomando como fundamento estos descubrimientos se ha querido generalizar el uso de la melatonina para aliviar los síntomas de confusión, insomnio durante la noche y somnolencia durante el día, que aparecen en el conocido *síndrome del cambio de zona horaria*, cuya persistencia y gravedad dependen no solo del número de zonas horarias que se cruzan en el viaje, sino de la dirección de éste (Oeste o Este). Sin embargo, los resultados sólo parecen ser ligeramente beneficiosos (9). Con el mismo fundamento también se ha utilizado experimentalmente la melatonina para tratar las alteraciones del sueño debidas a cambios frecuentes en el horario de trabajo; sin embargo, los resultados han sido quizá algo más desalentadores (10).

Ritmo circadiano en la actividad neuropeptidasa

La mayor parte de las hormonas proteicas de los sistemas endocrino y neuroendocrino, presentan un patrón cíclico de liberación, en respuesta a un sistema generador de ritmos en el cual, como ya hemos indicado, participa de forma esencial el núcleo supraquiasmático (3), pero también están implicadas una serie de estructuras que forman el siguiente *círculo fotoneuroendocrino*: Los impulsos nerviosos generados en la retina, alcanzan, mediante el tracto retino-hipotalámico, el núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior, y posteriormente el núcleo paraventricular. A través del fascículo prosencefálico medial y la formación reticular, éstos núcleos proyectan al núcleo intermedio-lateral de la médula espinal a partir del cual, las fibras preganglionares adrenérgicas, alcanzan el ganglio superior cervical. Finalmente, la glándula pineal es innervada por nervios simpáticos cuyo origen se encuentra en los ganglios superiores cer-

vicales izquierdo y derecho. Además, la glándula pineal parece influir sobre distintas regiones cerebrales, mediante diversas proyecciones de sus pinealocitos (figura 2) (11); también se ha demostrado la existencia de receptores de melatonina con un marcado ritmo circadiano en el núcleo supraquiasmático (12) e incluso se sabe que la melatonina se sintetiza a nivel de la retina de una forma rítmica dependiente de la luz ambiental (13).

Diversos neuropeptidos (14-16), así como algunos de sus receptores (16-19), han demostrado existir virtualmente en todas las estructuras de este circuito fotoneuroendocrino. Además, el nivel de diversos neuropeptidos (20-22) y el de algunos de sus receptores (12,23,24), también muestran un modelo cíclico en el cerebro. Sin embargo, el papel que desempeñan éstos péptidos en las funciones biológicas de las áreas de este circuito, es aún escasamente conocido.

La actividad de los neuropeptidos es esencialmente regulada a través de su inactivación (o activación), mediante la hidrólisis llevada a cabo por diversas neuropeptidasas (25). La función de diversas aminopeptidasas cerebrales ha sido implicada en su inactivación; entre ellas, la actividad de arginina aminopeptidasa (ArgAP) se ejerce sobre neurotensina, bradisinina, sustancia P, angiotensina I, angiotensina III y somatostatina (26). Por lo tanto, nos propusimos como objetivo, analizar un posible modelo cíclico de la actividad de arginina aminopeptidasa, con eventuales diferencias interhemisféricas, en las estructuras que constituyen el circuito anteriormente citado, y en otras estructuras posiblemente relacionadas como es el caso de la retina (Re) izquierda (I) y derecha (D), hipófisis anterior (HFA), hipófisis posterior (HFP), hipotálamo anterior (HtA) (I y D), hipotálamo posterior (HtP) (I y D), ganglio superior cervical (GSC) (I y D), corteza occipital (CO) (I y D), glándula pineal (Pi) y suero (S) de ratas macho.



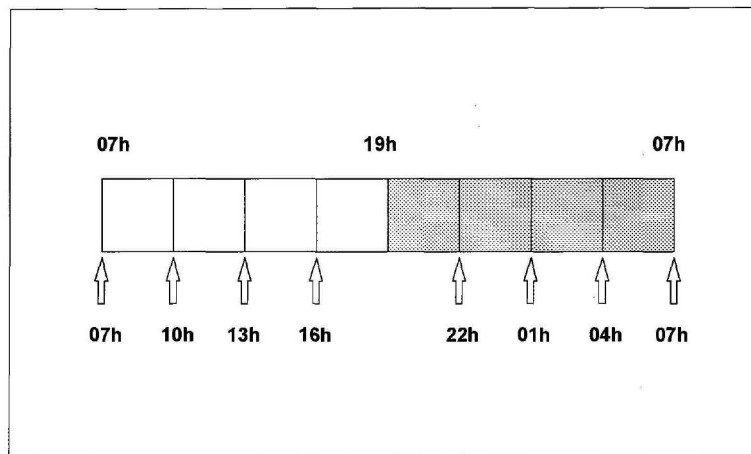


Fig. 3.—Esquema indicativo del régimen artificial de 12 h de luz y 12h de oscuridad (luz de 07h a 19h) a que fueron sometidos los animales, con objeto de analizar el ritmo circadiano de la actividad aminopeptidásica. Las flechas indican las horas en que se realizaron los experimentos.

Grupos experimentales

Con objeto de estudiar un posible ritmo circadiano en la actividad aminopeptidásica, los animales se sometieron a un régimen artificial de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. El período de luz comprendió de 07h a 19h y el de oscuridad, de 19h a 07h. Los animales se mantuvieron en dichas condiciones, al menos durante 2 semanas previas al experimento.

Los experimentos se realizaron, en condiciones de luz, a las 07h, 10h, 13h, y 16h del período de luz y, en condiciones de oscuridad, a las 22h, 01h y 04h del período de oscuridad (figura 3).

Procedimiento quirúrgico y preparación de muestras

El método seguido se esquematiza en la figura 4. Tras anestesiarse intraperitonealmente los animales con nembutal, se obtienen

muestras sanguíneas a partir del ventrículo izquierdo. Posteriormente, sus cerebros se perfunden con solución salina isotónica a través del ventrículo izquierdo.

Dependiendo del grupo experimental, el proceso quirúrgico inicial se realiza en condiciones de luz u oscuridad. En condiciones de oscuridad, los animales se perfunden bajo luz roja ambiental y sólo se usa luz blanca después de que se extraigan los globos oculares izquierdo y derecho y de que se disequen sus correspondientes retinas (ReI, ReD).

Una vez perfundidos, sus cerebros se extraen inmediatamente y se disecan las zonas seleccionadas: Hipotálamo anterior izquierdo y derecho (HtAI, HtAD), hipotálamo posterior izquierdo y derecho (HtPI, HtPD), corteza occipital izquierda y derecha (COI, COD), ganglio superior cervical izquierdo y derecho (GSCI, GSCD), glándula pineal

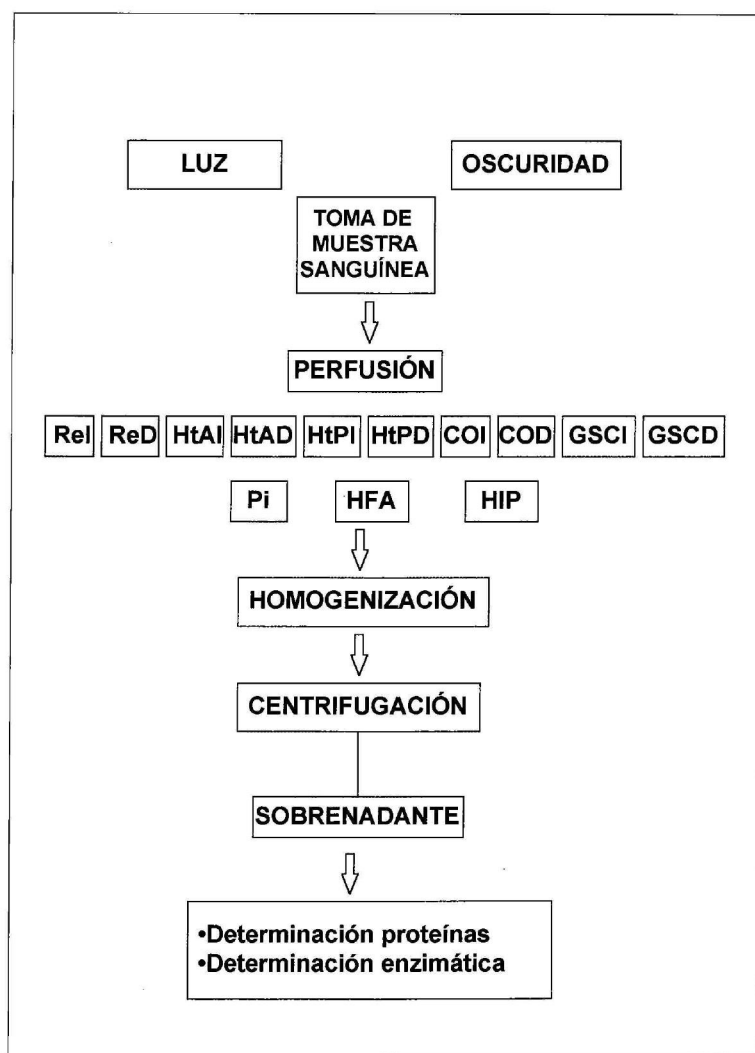


Fig. 4.—Esquema en el que se indica la secuencia experimental para la obtención de muestras y la determinación de actividades enzimáticas (ver texto).

lizaba la determinación. 3.º) El animal. La hora del día y el lado eran de efectos fijos y cruzados, mientras que el animal era de efectos aleatorios, anidado en la base del día (eran muestras independientes para cada hora del día) y cruzado con la lateralidad (puesto que en un mismo animal se determina el valor de una actividad enzimática en los dos lados). Expresado en otros términos, se tenía un diseño de medidas repetidas (dos lados) en siete grupos (las siete horas determinadas). El estudio se realizó atendiendo tanto a los efectos principales de los factores de efectos fijos, como a las interacciones entre ellos. Los tamaños muestrales eran ligeramente distintos.

A continuación se llevaron a cabo los siguientes pasos:

a) Si la interacción de mayor orden daba significativa, se realizaban las comparaciones por parejas entre todos los niveles de los diferentes factores, aplicando la penalización de Bonferroni.

b) Si la interacción de mayor orden no daba significativa, se pasaba a las de orden inferior, actuando como se dijo anteriormente en el caso de significación.

c) El paso c se repetía hasta llegar a los efectos principales.

d) Cuando se llegaba a un efecto principal que daba significativo y no estaba involucrado en ninguna interacción significativa, se pasaba a hacer la comparación entre sus niveles, empleando siempre la penalización de Bonferroni.

Los análisis de los diseños factoriales realizados, se hicieron con el programa BMDE

Resultados

Los resultados demostraron una variación diurna significativa en algunas de las estructuras analizadas, así como una distribución asimétrica de la actividad aminopeptidásica, en determinadas estructuras y a determinadas horas: La actividad de ArgAP mostró una variación diurna significativa en Re, HtA, HtP y CO (figura 6). En general, los máximos niveles se obser-

varon a las 7h del período de luz y también se observó un pico de actividad a las 13h del período de luz. Además, se demostró la existencia de asimetrías a determinadas horas de los períodos de luz y oscuridad, asimetrías cuyo predominio se invertía dependiendo de si el período era de luz u oscuridad. Estos resultados han sido descritos en parte por RAMÍREZ y cols. (31).

En la retina, había un predominio del lado izquierdo a las 10h del período de luz. Sin embargo, el predominio era del lado derecho, a las 01h del período de oscuridad. Algo similar sucedía en el HtA, en el que el lado izquierdo predominaba a las 13h del período de luz, pero era el derecho el que predominaba a las 01h del de oscuridad.

Si analizamos en detalle los resultados obtenidos en la retina (figura 7), podremos observar que en las horas de luz hay un mayor número de animales con predominio izquierdo, aunque sólo alcance significación estadística a las 10h. Sin embargo, en las horas de oscuridad, el número de animales con predominio derecho es evidentemente mayor que el de los de predominio izquierdo, aunque sólo se alcance significación estadística a las 01h.

En las glándulas (figura 8), también se demostró una variación diurna significativa para la hipófisis anterior y para la glándula pineal. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre horas en el suero.

Discusión

De acuerdo con los resultados anteriormente descritos, además de la variación circadiana que posteriormente comentaremos, quizá una de las observaciones más interesantes sea la aparición de una asimetría de predominio izquierdo en condiciones de luz y de predominio derecho en condiciones de oscuridad (figuras 6 y 7). Estos resultados podrían apoyar la existencia de un mecanismo regulador hipotetizado por BAKALKIN (32). Este autor, en base a resultados que demuestran que el contenido de la hormona



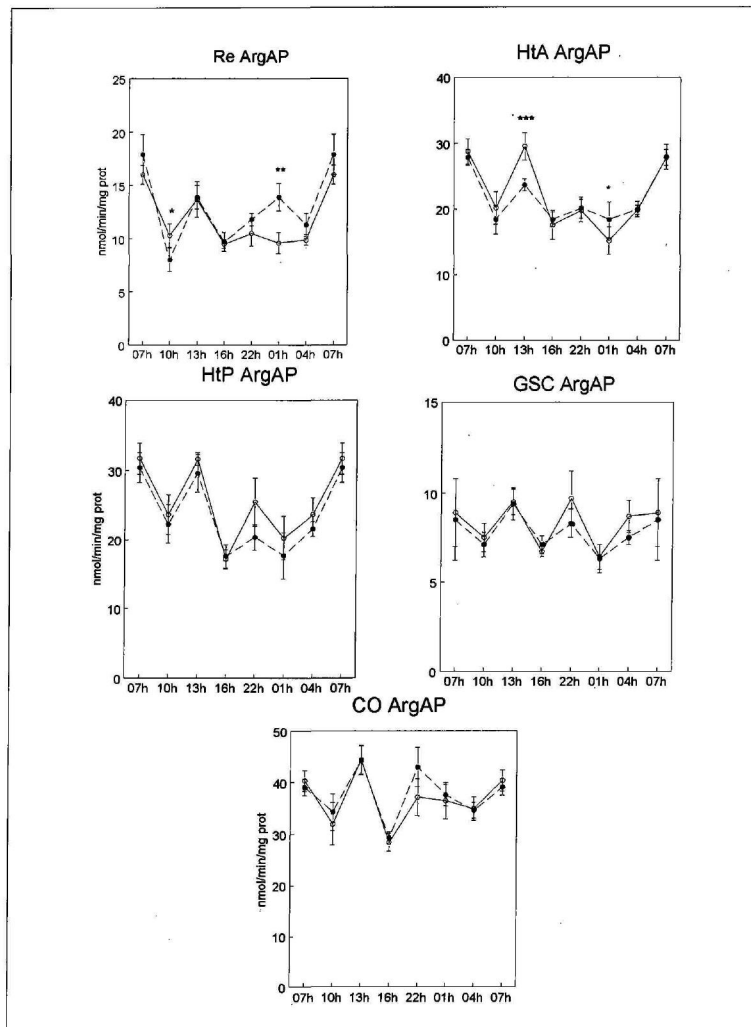


Fig. 6.—Variación diurna de los niveles medios (\pm EE) de actividad soluble de ArgAP en los lados izquierdo (línea continua) y derecho (línea discontinua) de las estructuras bilaterales estudiadas, en un régimen de 12h de luz y 12h de oscuridad (luz: 07h-19h).

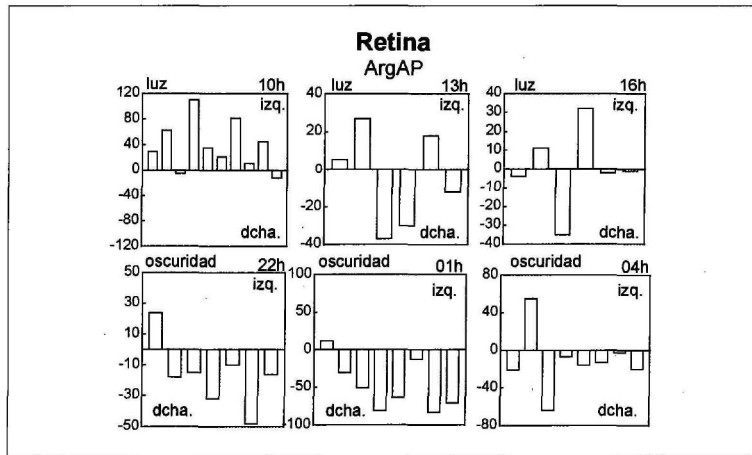


Fig. 7.—Porcentaje de predominio de la actividad soluble de ArgAP, de un lado sobre el otro de la retina, en cada uno de los animales estudiados y a cada una de las horas de luz y oscuridad seleccionadas en un régimen de 12h de luz y 12h de oscuridad (luz: 07h-19h).

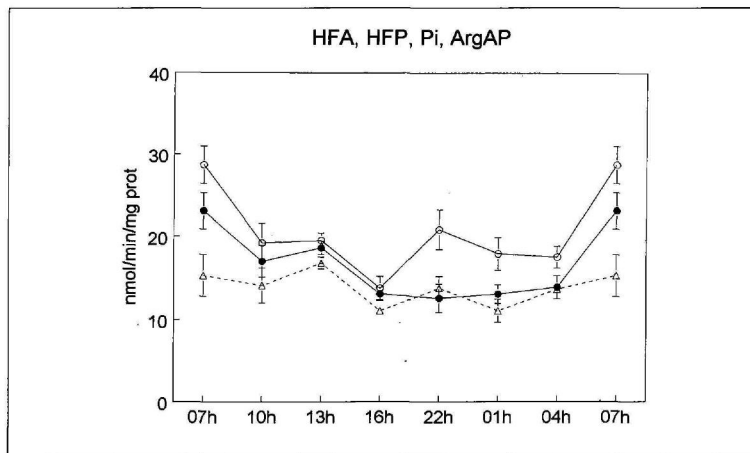


Fig. 8.—Variación diurna de los niveles medios (\pm EE) de actividad soluble de ArgAP en la hipófisis anterior (○), hipófisis posterior (●) y glándula pineal (●), en un régimen de 12h de luz y 12h de oscuridad (luz: 07h-19h).

liberadora de gonadotropinas está distribuido de forma asimétrica en el hipotálamo y que ésta asimetría cambia a lo largo del día, ha postulado la existencia de un mecanismo regulador entre ambos lados cerebrales que implicaría la lateralización de neuropéptidos, sus receptores y, como sugieren los datos del presente trabajo, también las neuropeptidasas que regulan sus actividades. Este mecanismo mantendría un cierto equilibrio entre la actividad de determinados procesos neurales, específicos del lado izquierdo o del derecho. Bajo determinadas circunstancias, como podrían ser, unas condiciones ambientales específicas de luz y oscuridad, podrían tener lugar desviaciones significativas de dicho equilibrio. Esto lo apoya el hecho de que la mayoría de los valores obtenidos en la retina son de predominio izquierdo en las horas de luz y de predominio derecho en las horas de oscuridad (figura 7). Determinadas funciones cerebrales que radican en ambos hemisferios, podrían estar sujetas a un modo de operar universal consistente en inhibiciones recíprocas de centros homólogos. Numerosos procesos neuro-endocrinos basan su regulación en un sistema de retroinhibición o de inhibición transitoria de un centro cuya actividad es tónica. Esto podría ser la base de una explicación para la existencia de algunas asimetrías neuroquímicas que se hacen evidentes bajo determinadas condiciones ambientales, lo que quizá sería el caso de las asimetrías observadas en la presente investigación.

En relación al ritmo circadiano, el hipotálamo exhibió un modelo cíclico altamente significativo, mostrando los mayores niveles hacia la mitad del período de luz. En esta misma localización, las encefalinas (33), sustancia P y la hormona liberadora de gonadotropinas (34) muestran un ritmo circadiano que presenta sus mayores niveles en horas de oscuridad. Este modelo, recíproco al de la actividad de arginina aminopeptidasa, podría estar de acuerdo con su posible papel regulador de sus sustratos endógenos, ya que sugiere la relación: alta capacidad hidrolítica/bajo nivel de sustrato. Sin embargo, esta actividad podría reflejar también el estado funcional de otros sustratos cuya variación diurna aún no haya sido estudiada. Finalmente, aunque aún no hemos determinado si el ritmo en la actividad aminopeptidásica es endógeno o condicionado por las condiciones ambientales de luz y oscuridad, el hecho de que las estructuras que demuestran una fluctuación significativa de la actividad (p.e. retina, hipotálamo o glándula pineal) estén integradas en el circuito fotoneuroendocrino relacionado con la generación del ritmo de la melatonina (35), podría ser indicativo de una influencia de la luz ambiental sobre esta actividad enzimática. ◀

M. Ramírez, M.^a J. Ramírez, J. M. Martínez, I. Prieto, B. Sánchez, *Área de Fisiología, Universidad de Jaén.*

Bibliografía

1. MURPHY, P.J., and CAMPBELL, S.S.: «Physiology of the circadian system in animals and humans». *J. Clin. Neurophysiol.* 1996. 13:2-16.
2. RICHTE, C.P.: *Biological clocks in medicine and psychiatry*. Springfield, IL. C.C. Thomas, 1965.
3. MOORE, RY., and LENN, N.J.: «A retinohypothalamic projection in the rat». *J. Com. Neurol.* 1972. 146:1-14.
4. TAKAHASHI, J.: «Circadian rhythms: from gene expression to behavior». *Curr. Opin. Neurobiol.* 1991. 1:556-561.
5. LEHMAN, M.N.; SILVER, R.; GLADSTONE, W.R.; KAHN, R.M.; GIBSON, M., and BITTMAN EL.: «Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain». *J. Neurosci.* 1987. 7:1626-1638.
6. RALPH, M.R., and LEHMAN, M.N. «Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian circadian pacemaker». *Trends Neurosci.* 1991. 14:362-366.
7. MOORE, RY.: «Functional organization of the circadian timing system». *Brain Research Reviews*, 1993. 18:19-30.
8. Armstrong, S.M.: «Melatonin and circadian control in mammals». *Experientia*. 1989. 45:932-938.
9. PETRIE, K.; DAWSON, A.G.; THOMPSON, L., and BROOK, R.: «A double-blind trial of melatonin as a treatment for jet lag in international cabin crew». *Biol Psychiatry*, 1993. 33:526-530.
10. DAWSON, D.; ENCEL, N.; LUSHINGTON, K.: «Improving adaptation to simulated night shift: timed exposure to bright light versus daytime melatonin administration». *Sleep*, 1995. 18:11-21.
11. KORF, W.; OKSHE, A.; EKSTRÖM, P.; GERY, I.; ZIGLER, J.S., and KLEIN, D.C.: «Pinealocyte projections into the mammalian brain revealed with s-antigen antiserum». *Science*, 231:735-737.
12. LAITINEN, J.T.; CASTREN, E.; VAKKURI, O., and SAAVEDRA, J.M.: «Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus». *Endocrinology*, 1989. 124:1585-1587.
13. ZAWILSKA, J.B., and NOWAK, J.Z.: «Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina». *Neurochem. Int.* 1992. 20:23-36.
14. EBELS, J., and BALEMANS, M.G.M.: «Physiological aspects of pineal functions in mammals». *Physiol Rev.* 1986. 66:581-605.
15. TOMINAGA, K.; SHINOHARA, K.; OTORI, Y.; FUKUHARA, C., and INOUE, S-I T.: «Circadian rhythms of vasopressin content in the supra-chiasmatic nucleus of the rats». *Neuro Report*, 1992. 3:809-812.
16. RAMÍREZ, M.; DAVIDSON, E.A.; LUTTENAUER, L.; ELENA, P.P.; CUMIN, F.; MATHIS, G., and DE Gasparo, M.: «The renin-angiotensin system in the rabbit eye». *J. Ocular Pharmacol Therap.* 1996. 12:299-312.
17. CASTREN, E.; KURIHARA, M.; GUTKING, J.S., and SAAVEDRA, J.M.: «Specific angiotensin II binding sites in the rat stellate and superior cervical ganglia». *Brain Res.* 1987. 422:347-351.
18. SAAVEDRA, J.M.; ISRAEL, A.; PLUNKETT, L.M.; KURIHARA, M.; SHIGEMATSU, K., and CORREA, F.M.A.: «Quantitative distribution of angiotensin II binding sites in rat brain by autoradiography». *Peptides*, 1986. 7:679-687.
19. TORDA, T.; NAZARALI, A.S., and SAAVEDRA, J.M.: «Brain natriuretic peptide receptors in the rat peripheral sympathetic ganglia». *Biochem Biophys Res Commun.* 1989. 159:1032-1038.
20. ASAI, M.; VINDROLA, O.; ZUBIETA, M.; TALAVERA, E., and MASSARINI, A.: «Diurnal variations of IR-Met-enkephalin in the brain of pentylene-tetrazol-kindled rats». *Brain Res.* 1988. 422: 81-85.
21. KALSBECK, A.; BUIJS, R.M.; ENGELMANN, M.; WOTJAK, C.T., and LANDGRAF, R.: «In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus». *Brain Res.* 1995. 682:75-82.
22. SCHADE, R.; VICK, K.; OTT, T.; SORK, R.; PFISTER, C.; BELLACH, J.; GOLOR, G., and LEMER, B.: «Circadian rhythms of dopamine and cholecystokinin in nucleus accumbens and striatum of rats. Influence of dopaminergic stimulation». *Chronobiol Int.* 1995. 12:87-99.
23. FUCHS, E.; WASMUTH, J.C.; FLUGGE, G.; HUETHER, G.; TROOST, R., and BEYER, J.: «Diurnal variation of corticotropin-releasing factor binding sites in the rat brain and pituitary». *Cell Mol Neurobiol.* 1996. 16:21-37.
24. GIARDINO, L.; CALZA, L.; ZANNI, M.; VELARDO, A.; PANTALEONI, M., and MARRAMA, P.: «Daily modifications of 3H-naloxone binding sites in the rat brain: a quantitative autoradiographic study». *Chronobiol Int.* 1989. 6:203-216.
25. BAUER, K.: «Role of proteolytic enzymes in neuropeptide metabolism». *INSERM*, 1982. 110: 475-494.
26. McDERMOTT, JR.; MANTLE, D.; LAUFFART, B.; GIBSON, A.M., and BIGGINS, J.A.: «Purification and characterization of two soluble Cl- acti-

- vated arginyl-aminopeptidases from human brain and their endopeptidase action on neuropeptides». *J. Neurochem.* 1988. 50:176-182.
27. König, JFR., and KLIPPELL, RA.: *The rat brain.* Krieger, Huntington, New York, 1967.
 28. GREENBERG, I.J.: «Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10^{11} mole. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962. 9:430-435.
 29. ALBA, F.; IRIBAR, C.; RAMÍREZ, M.; ARENAS, C.: «Un método fluorimétrico para la determinación de aminopeptidasas cerebrales». *Arch de Neurobiol.* 1989. 52:169-173.
 30. BRADFORD, MM.: «A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». *Anal Biochem.* 1976. 72:248-254.
 31. RAMÍREZ, M.; SÁNCHEZ, B.; ARECHAGA, G.; GARCÍA, S.; LARDELLI, P.; VENZON, D., and DE GANDARIAS, JM.: «Diurnal rhythm in brain lysyl/arginyl aminopeptidase activity, a bilateral study». *Neurosci Res Commun.* 1992, 10:141-147.
 32. BAKALKIN, Gya.: «Neuropeptides induce directional asymmetry in brain and spinal cord: facts and hypothesis». *Int. J. Neurosci.* 1989. 48:105-124.
 33. ASAL, M.; VINDROLA, O.; ZUBIETA, M.; TALAVERA, E., and MASSARINI, A.: «Diurnal variations of IR-Met-enkephalin in the brain of pentylene-tetrazol-kindled rats». *Brain Res.* 1988. 422: 81-85.
 34. KERDELHUE, B.; PALKOVITS, M.; KARTESZI, M., and REINBERG, A.: «Circadian variation in substance P, lulliberin (LH-RH) and thyroliberin (TRH) contents in hypothalamic and extrahypothalamic brain nuclei of adult male rats». *Brain Res.* 1981. 206:405-412.
 35. TAMARKIN, L.; BAAIRD, CJ., and ALMEIDA, OFX.: «Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction?». *Science.* 1985. 227: 714-720.