

**TRIPTÓFANO, MELATONINA Y RITMOS DE ACTIVIDAD/
INACTIVIDAD EN ANIMALES DIURNOS Y NIÑOS LACTANTES.
FAGOCITOSIS Y METABOLISMO OXIDATIVO**

1. INTRODUCCIÓN.....	pag. 11
<u>1.1 INTRODUCCIÓN A LA CRONOBIOLOGÍA.....</u>	pag. 12
1.1.1 ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	pag. 14
1.1.2 DESARROLLO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	pag. 19
<u>1.2 LA GLÁNDULA PINEAL</u>	pag. 20
1.2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	pag. 20
1.2.2 ANATOMÍA GLÁNDULA PINEAL.....	pag. 21
<u>1.2.2.1 Anatomía microscópica de la pineal en mamíferos</u>	
<u>1.2.2.2 Anatomía microscópica de la pineal en aves</u>	
1.2.3 BIOQUÍMICA GLÁNDULA PINEAL.....	pag. 27
<u>1.2.3.1 Fototransducción en la retina de vertebrados</u>	
<u>1.2.3.2 Fototransducción y fotorreceptor modificado en aves</u>	
<u>1.2.3.3 El metabolismo de los indoles en células fotorreceptores y derivadas</u>	
<u>1.2.3.4 Biosíntesis rítmica de melatonina</u>	
<u>1.2.3.5 Variaciones diarias en la expresión y actividades de la enzima del metabolismo de los indoles</u>	
<u>1.2.3.6 Fluctuaciones de melatonina en sangre</u>	
<u>1.2.3.7 Control fotoperiódico y circadiano de la producción de melatonina in vivo</u>	
<u>1.2.3.8 Regulación intracelular de la producción de la melatonina en el fotorreceptor pineal de no mamíferos</u>	
1.2.4 RECEPTORES DE MELATONINA.....	pag. 41

1.2.5 GLANDULA PINEAL Y RITMOS CIRCADIANOS.....pag. 42

1.2.5.1 Un reloj fuera de la pineal controla el ritmo en mamíferos

1.2.5.2 Un reloj dentro de la pineal controla el ritmo en mamíferos

1.2.5.3 Relojes intra y extra-pineales controlan el ritmo en aves

1.2.5.4 Las células sintetizadoras de melatonina son relojes circadianos

1.2.5.5 Libre curso y amortiguación

1.2.5.6 Efectos de la temperatura

1.3 MELATONINA Y RITMOS DE ACTIVIDAD / INACTIVIDAD..... pag. 47

1.3.1 MELATONINA RITMOS DE ACTIVIDAD / REPOSO EN AVES.....pag. 48

1.3.2 MELATONINA RITMOS DE ACTIVIDAD / REPOSO EN LACTANTES..pag.50

1.4 MELATONINA Y SISTEMA INMUNE.....pag. 51

1.4.1 ASPECTOS GENERALES DE LA INMUNIDAD.....pag. 51

1.4.1.1 La inmunidad innata o inespecífica

1.4.1.1.1 La inmunidad inespecífica en aves

A. Granulocitos

B. Heterófilos

C. Eosinófilos

D. Basófilos

1.4.1.1.2 Fagocitosis y desgranulación

A. Ingestión de partículas

B. Desgranulación

C. Destrucción del material ingerido: mecanismos microbicidas

C.1. Procesos microbicidad oxígeno-indipendiente

C.2. Procesos microbicidad oxígeno-dependiente

1.4.2 CONEXIÓN FUNCIONAL ENTRE LA MELATONINA Y EL SISTEMA INMUNE: ASPECTOS GENERALES Y PARTICULARES EN AVES.....pag. 69

1.4.2.1 Pinealectomía y sistema inmune

1.4.2.2 Acción inmunomoduladora de la melatonina en aves

1.4.2.3 Melatonina como antioxidante en células fagocíticas

1.4.2.4 Acción directa de la melatonina sobre el sistema inmune: receptores de melatonina en células inmunes

1.4.2.5 Influencia del sistema inmune sobre la función de la glándula pineal en aves

1.4.3 MELATONINA Y EL SISTEMA INMUNE EN LACTANTES.....pag. 80

1.4.3.1 Melatonina y estrés oxidativo en lactantes

1.4.3.1.1 Estrés oxidativo en lactantes

1.4.3.1.2 Oxidación de proteínas en el pulmón neonatal

1.4.3.1.3 Fibrosis quística del páncreas

1.4.3.1.4 Enfermedad inflamatoria intestinal

1.5 LA IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL TRIPTÓFANO.....pag. 88

1.5.1 TRIPTÓFANO COMO AMINOÁCIDO ESENCIAL.....pag. 88

1.5.2 ALIMENTOS RICOS EN TRIPTÓFANO.....pag. 91

1.5.3 METABOLISMO DEL TRIPTÓFANO.....pag. 92

1.5.4 ACCIÓN DEL TRIPTÓFANO SOBRE EL SISTEMA INMUNE..... pag. 96

1.5.5 ACCIÓN TERAPÉUTICA DEL TRIPTÓFANO.....pag. 98

2. OBJETIVOS.....pag. 102

1. Evaluación de la función fagocítica, metabolismo oxidativo de heterófilos sanguíneos y niveles de melatonina circulante.

2. Efectos, en animales experimentales, de la ingesta de triptófano sobre los ritmos de actividad-inactividad.

3. Análisis del contenido en triptófano de la leche materna y sus oscilaciones circadianas frente a 6-sulfatoximelatonina en orina materna y del lactante.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....pag. 105

3.1 MATERIALES..... pag. 106

3.1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....pag. 106

3.1.2 MADRES Y NIÑOS LACTANTES.....pag. 106

3.1.3 SOLUCIONES Y MEDIOS.....pag. 106

3.1.4 REACTIVOS.....pag. 108

3.1.5 MATERIAL DE LABORATORIO.....pag. 109

3.1.6 APARATOS.....pag. 110

3.2 MÉTODOS.....pag. 110

3.2.1 MÉTODOS DE LOS ENSAYOS EN ANIMALES.....pag. 110

3.2.1.1 Diseño experimental

3.2.1.2 Administración de triptófano

3.2.1.3 Métodos para la determinación de actividad en animales

3.2.1.4 Esterilizaciones

3.2.1.5 Obtención de muestras biológicas

3.2.1.6 Funcionalidad de las células fagocíticas

3.2.1.7	<u>Obtención de parámetros fisiológicos</u>	
3.2.1.8	<u>Determinación de los niveles de melatonina en plasma sanguíneo</u>	
3.2.2	MÉTODOS DE LOS ENSAYOS CON HUMANOS.....	pag. 127
3.2.2.1	<u>Dispositivos empleados para la detección de actividad en niños lactantes</u>	
3.2.2.2	<u>Análisis del sueño de niños lactantes</u>	
3.2.2.3	<u>Determinación de 6-sulfatoximelatonina en orina</u>	
3.2.2.4	<u>Determinación de triptófano en leche materna</u>	
3.2.3	MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN SENOIDAL	pag.140
3.2.4	MÉTODOS DE CÁLCULO ESTADÍSTICO.....	pag. 140
4.	RESULTADOS.....	pag. 142

BLOQUE 1: RESULTADOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1	PARAMETRO FISIOLÓGICOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE L- TRIPTÓFANO A <i>Streptopelia roseogrisea</i>	pag. 144
1.2	VARIACIONES CIRCADIANAS DE MELATONINA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN BAJO CONDICIONES BASALES.....	pag. 145
1.3	FUNCIÓN FAGOCÍTICA DE HETERÓFILOS.....	pag. 147
1.3.1	<u>Función fagocítica de heterófilos tras la administración oral de L-triptófano a las 19:00 h.</u>	
1.3.1.1	Índice de fagocitosis	
1.3.1.2	Porcentaje de fagocitosis	
1.3.1.3	Eficiencia de fagocitosis	

1.3.2 Función fagocítica de heterófilos tras la administración oral de L-triptófano a las 09:00 h.

1.3.2.1 Índice de fagocitosis

1.3.2.2 Porcentaje de fagocitosis

1.3.2.3 Eficiencia de fagocitosis

1.4 TEST DE REDUCCIÓN DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO.....pag. 155

1.4.1 Test de reducción de Nitroazul de tetrazolio tras la administración oral de L-triptófano a las 19:00 h.

1.4.2 Test de reducción de Nitroazul de tetrazolio tras la administración oral de L-triptófano a las 09:00 h.

1.5 VARIACIONES NOCTURNAS DE MELATONINA.....pag. 157

1.6 DETERMINACIÓN DEL RITMO DE ACTIVIDAD-INATIVIDAD EN *Streptopelia roseogrisea*.....pag. 159

BLOQUE 2: RESULTADOS EN HUMANOS

2.1 RITMOS EN ORINA DE LOS NIVELES DE 6-SULFATOXIMELATONINA EN NIÑOS LACTANTES Y SUS PROGENITORAS JUNTO CON TRIPTÓFANO EN LECHE MATERNA.....pag. 172

2.2 ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE SUEÑO EN NIÑOS CON LACTANCIA MATERNA.....pag. 175

5. DISCUSIÓN.....pag. 177

6. CONCLUSIONES.....pag. 192

7. BIBLIOGRAFÍA.....pag. 195

Actina binding protein: ABP

Acetil Coenzima-A: Ac-CoA

Ácido dehidroascórbico: DHA

Ácido 5-metoxindol acético: 5 MIAA

Ácido ribonucleico mensajero: ARNm

Ácido γ aminobutírico: GABA

Adenosin monofosfato: AMPc

Adenosin trifosfato: ATP

Aminoacil-N-acetiltransferasa: AA-NAT

Antagonista del receptor: RA

Atrapamiento de radicales libres: TRAP

Calcio extracelular: Ca^{++e}

Calcio intracelular: Ca^{++i}

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo: CCDA

Deacetilasa: DeAc

Descarboxilasa de aminoácido aromático: AAAD

Electroencefalograma: EEG

Especies reactivas de oxígeno: ROS

Factor estimulante de colonias: FSC

Factor de Necrosis Tumoral: TNF

Flavin adenín dinucleótidos: FAD

Fibrosis quística: FQ

Ganglio cervical superior: GCS

Guanosín monofosfato cíclico: GMPc

Guanosín difosfato : GDP

Glutation deshidrogenasa: GSH

Guanosín trifosfato: GTP

Hormona adrenocorticotropa: ACTH

Hidroindol-O-metiltransferasa: HIOMT

4-Hidroximaloldialdehido: 4 - HDA

5-Hidroxitriptófol: 5-HTL

Indolamina 2-3 dioxigenasa: IDO

Interleuquina: IL

Lipopolisacárido: LPS

Lipoproteína de baja densidad: LDL

Luz: LL

Maloldialdehido: MDA

Mieloperoxidasa: MPO

Monoaminoxidasa: MAO

Natural killer: NK

Nicotin adenin difosfato Hidroxilasa: NADPH

Noradrenalina: NA

Núcleo paraventricular: NPV

Núcleo supraquiasmático: NSQ

Oscuridad (Dark): DD

Péptido intestinal vasoactivo: VIP

Proteína de unión de actina: ABP

Polimorfonucleares: PMNs

Sistema nervioso central: SNC

Sep red blood cell: SRBC

Superoxidodismutasa: SOD

Triptófano 2-3 dioxigenasa : TDO

Triptófano hidroxilasa : TOPH

Recomendaciones diarias de administración: RDA

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 INTRODUCCIÓN A LA CRONOBIOLOGÍA.

Es probable que el concepto de tiempo y periodicidad de los fenómenos naturales y ambientales date ya de la época primitiva. El calendario egipcio se inventó hacia el 4200 a. C. y el tiempo y la variación periódica de los fenómenos biológicos en la salud y la enfermedad ocupaban un lugar muy importante en las doctrinas de los naturalistas griegos y romanos.



Figura I. Grabado mitológico de “Cronos”, (Saturno en la cultura romana).
Símbolo del Tiempo.

Así, por ejemplo, Aristóteles y más tarde Galeno escriben sobre la periodicidad del sueño y la vigilia, centrándola en el corazón el primero y en el cerebro la segunda. Diversas situaciones nos recuerdan periódicamente la importancia de nuestros relojes biológicos internos, siendo los cambios de horario que tienen lugar en otoño y primavera una muestra de ello.

No obstante, a lo largo de la historia la aproximación científica a la naturaleza de los ritmos biológicos ha dependido de la disponibilidad de instrumentos de medición como el reloj, el termómetro, el electroencefalograma, etc... Desde que ya hace 40 años el Profesor Halberg estableciera las bases de la Cronobiología en su laboratorio de Minnesota, los imprevisibles cambios de muchas variables biológicas, a lo largo del día u otros periodos de tiempo, han pasado de ser un obstáculo para su estudio a ser el mejor aliado para la comprensión de los mecanismos que la controlan. En efecto, una vez puesto al descubierto los “ritmos de la vida”, la aplicación de técnicas relativamente sencillas permiten la cuantificación de los patrones subyacentes y los cambios se hacen predecibles y se incorporan a la normalidad. Se desarrollan entonces campos como la cronofarmacología, la cronoterapia, etc...

Los **Ritmos Biológicos** estudiados bajo la disciplina de la Cronobiología, no constituyen un fenómeno casual ni un seguimiento pasivo de las condiciones ambientales, sino que forman parte de una adaptación al entorno que es fundamental para la supervivencia de las especies. Debe diferenciarse el concepto de ritmo del de ciclo. Este último consiste en la sucesión de acontecimientos que tienen lugar de forma repetitiva siempre en el mismo orden sin tener en cuenta el tiempo en que tienen lugar. Cuando un ciclo ocurre en un intervalo de tiempo constante y previsible se habla de ritmo. La frecuencia nos indica el número de ciclos que tiene lugar por unidad de tiempo, y el período es el tiempo que tarda en repetirse un ciclo. El ritmo puede ser endógeno o exógeno según es generado por el propio organismo o no, aunque hay autores que sólo lo consideran ritmo si es endógeno.

Ritmos circadianos: son aquellos que tienen una frecuencia próxima a la diaria, es decir entre 20 y 28 horas. En este grupo se encuentra la mayoría de los ritmos que se estudian en Cronobiología. Los ritmos ultradianos son aquellos que tienen una frecuencia superior a la diaria, es decir, un período inferior a las 20 horas. Como ejemplos de ritmo ultradiano cabe citar el latido cardíaco y la ventilación pulmonar. Los ritmos infradianos son aquellos cuya frecuencia es inferior a la diaria, es decir con un período superior a las 28 horas, como es el caso del ciclo menstrual de la mujer. No es infrecuente que una misma variable biológica presente de forma simultánea ritmos de frecuencia diferente. Éste es el caso de la secreción pulsátil ultradiana de algunas hormonas, como el cortisol, o la melatonina, que además siguen un ritmo circadiano de 24 horas.

La persistencia de ritmos biológicos en condiciones ambientales constantes, esto es de ritmos endógenos, indica la presencia de un reloj endógeno interno o marcapasos que controla la periodicidad de ciertas variables.

1.1.1 ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.

El sistema circadiano es el conjunto de estructuras cuya misión consiste en organizar los ritmos de determinados procesos fisiológicos. Este sistema consta de las siguientes estructuras: 1) el núcleo supraquiasmático (NSQ), 2) las vías aferentes, que conducen la información de señales externas al organismo u otras zonas del sistema nervioso al NSQ y 3) las vías eferentes, que acoplan el marcapasos con los sistemas efectores que producen los ritmos.

En la rata y otros muchos mamíferos, el principal marcapasos endógeno se halla en el NSQ. En el hombre, el NSQ se encuentra en las paredes del tercer ventrículo, por debajo del hipotálamo y detrás del quiasma óptico (Figura II). Las vías aferentes consisten en el tracto retinohipotalámico, el tracto genículohipotalámico, vías procedentes de los núcleos del rafe y de las neuronas tuberomamilares de la hipófisis posterior. Las vías eferentes se pueden clasificar según la zona del sistema nervioso central (SNC) a la que se proyectan.

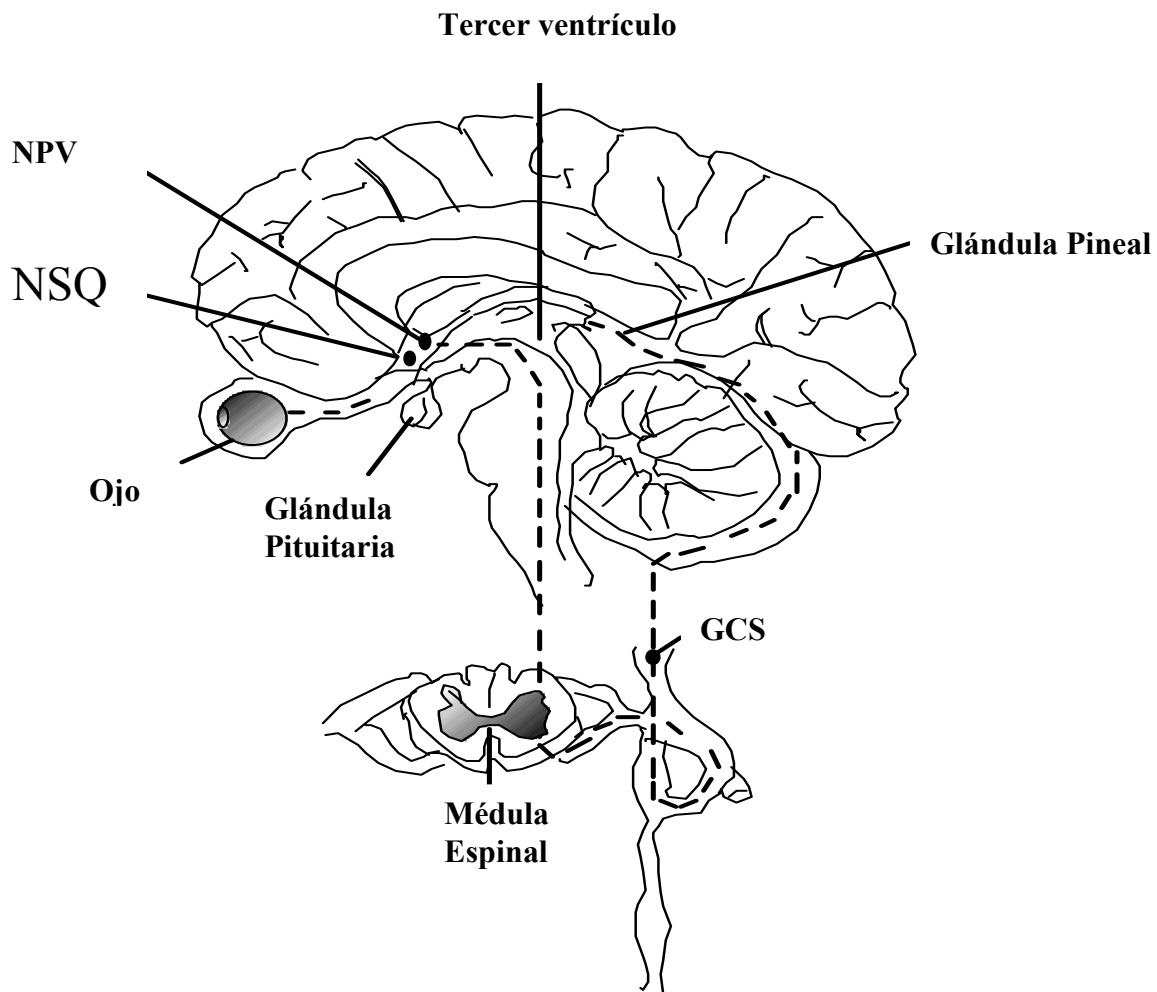


Figura II. Representación esquemática de Núcleo supraquiasmático (NSQ) y sus vías aferentes y eferentes en humano, NPV (Núcleo paraventricular) y GCS (Ganglio cervical superior).

Entre las vías eferente que se dirigen al hipotálamo destacan las eferentes al NPV, presumiblemente involucrado en el control de los ritmos de funciones hormonales y autonómicas, eferentes al área preóptica, involucrada en la regulación de la temperatura, balance de fluidos y la conducta sexual y finalmente las eferentes al área retroquiasmática, desde la cual se envían señales a los hemisferios cerebrales (regulación de la conducta), tronco encefálico (regulación autonómica) y a la médula espinal (control sensorial y motor). Por otro lado, las vías eferentes que se dirigen a partes fuera del hipotálamo incluyen las que se proyectan al tálamo (locomoción),

sistema límbico (memoria y tono afectivo) y al núcleo geniculado lateral. Este sistema utiliza una serie de neurotransmisores, siendo el Ácido gamma aminobutírico (GABA) el más abundante en el NSQ y en las vías eferentes. El NSQ también sintetiza neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la vasopresina y la somatostatina.

Que el NSQ es el principal marcapasos endógeno viene apoyado por experimentos que demuestran que la manipulación o destrucción del NSQ comporta la alteración de prácticamente todos los ritmos circadianos, sobre todo los correspondientes a la actividad motora, ingestión de alimentos, temperatura central, conducta sexual, ciclo sueño-vigilia y a diversas hormonas, como la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Esto se produce por la disrupción tanto de comunicaciones nerviosas como de vías paracrinas o endocrinas. Cuando se inyecta tejido fetal de la zona del NSQ en la parte inferior del tercer ventrículo en animales a los que previamente se había lesionado el NSQ, éstos recuperan el ritmo circadiano de la mayor parte de sus variables, sobre todo de las que no dependen de la creación de nuevas sinapsis (mecanismo humoral). Además, células del NSQ en cultivo mantienen ritmos circadianos metabólicos y de actividad eléctrica. No obstante, es probable que el NSQ no sea el único marcapasos endógeno existente, ya que es frecuente observar la presencia simultánea de varios ritmos con períodos diferentes. Así, se ha demostrado, al menos funcionalmente (que no anatómicamente), la existencia de otros osciladores que determinan ritmos que no desaparecen con la destrucción del NSQ. Además, mediante experimentos con lesiones selectivas, se han podido identificar diferentes áreas del NSQ que controlan ritmos diferentes. Así, la estructura funcional del NSQ es la de un sistema oscilador múltiple, donde cada célula puede actuar como un oscilador independiente, mostrando su propio ritmo circadiano en su actividad eléctrica.

El NSQ presenta un máximo de actividad de descargas durante el día subjetivo, tanto en animales diurnos como en los nocturnos. Este ritmo se observa tanto *in vivo* como *in vitro*, y tanto en células en cultivo como en cortes de tejido. Aunque la existencia del NSQ se ha constatado anatómicamente, no existe consenso sobre los límites precisos de este núcleo. El NSQ tiene unas características propias que están presentes en la mayoría de especies estudiadas, se compone de neuronas de tamaño

relativamente pequeño, de axones cortos y campos dendríticos pequeños que presentan una frecuencia espontánea de descarga muy baja. Su actividad no se modifica con los cambios de temperatura. La mayoría de las neuronas del NSQ varían su actividad espontánea en respuesta a la entrada de luz por la retina, generalmente aumentan su frecuencia de descarga de forma proporcional a la intensidad de la luz que llega a la retina.

Por último añadir el último estudio publicado el presente año, en *Current Biology* por Antonio Diez-Noguera y sus colaboradores (2004), explicando que el reloj biológico o NSQ no funciona siempre como una unidad, como hasta ahora se pensaba, sino que actúa de forma disociada en dos partes diferentes.

Es muy importante diferenciar los conceptos de marcapasos y oscilador. Un oscilador es cualquier sistema capaz de generar cambios cíclicos. Un marcapasos puede estar constituido por uno o más osciladores. Un oscilador puede no constituir un marcapasos, como ocurre en muchas regiones del sistema nervioso central, mientras que un marcapasos debe ser oscilador.

Cuando un organismo se encuentra aislado de cualquier referencia temporal externa, es decir, bajo condiciones ambientales constantes, decimos que se encuentra en curso libre. El período del ritmo que se manifiesta en curso libre se conoce como período endógeno y se designa con la letra griega tau (τ). Si las condiciones ambientales se mantienen constantes, el valor de tau es muy estable, de forma que es una de las características más estables del ritmo de un organismo. El ritmo tau es una característica propia de cada especie que se transmite de forma mendeliana y que por tanto es probable que se encuentre determinada genéticamente. Como la duración de los ciclos circadianos en curso libre no siempre es de 24 horas, debemos referirnos a ellos como días subjetivos que, esto sí, se dividen en 24 horas subjetivas u horas circadianas ($1 \text{ hora circadiana} = \tau/24$). En este caso nos referiremos a tiempo circadiano.

En cuanto al perfil de los ritmos circadianos, se denominan en base al número de picos que presentan. El patrón más frecuente es el bimodal, como es el caso del ritmo de cortisol plasmático.

Es importante destacar que aunque el valor de tau es relativamente constante y determinado genéticamente, existen factores exógenos que pueden afectar este valor. Entre ellos el más importante, al menos el más estudiado, es la luz ambiental. Cuando un animal se encuentra bajo condiciones ambientales periódicas manifiesta un ritmo circadiano con el mismo período que el entorno. En este caso se dice que el ritmo está encarrilado o sincronizado por el entorno ambiental. Este encarrilamiento significa que el ritmo exógeno no genera ningún ritmo en el organismo, sino que encarrila ritmos endógenos ya existentes. El encarrilamiento surge como necesidad de adaptarse al entorno para un mayor aprovechamiento energético y de recursos y al hecho de que la mayoría de los organismos presentan una tau diferente de 24 horas. La existencia de un mecanismo específico de encarrilamiento es necesario ya que los ciclos de luz varían en su duración a lo largo del año. Los elementos externos que utiliza el organismo como referencias temporales para poder encarrilar sus ritmos se conocen con el término alemán *zeitgebers* (marcadores de tiempo). El *zeitgeber* más conocido y universal es, sin duda, la alternancia entre luz y oscuridad. Esta información accede al NSQ a través de la retina y a través del tracto retinohipotalámico. Existen otros elementos que pueden actuar como *zeitgebers* en determinadas circunstancias y especies animales, como por ejemplo, el contacto social con seres de la misma especie, la disponibilidad de alimento y la actividad motora. Este último tiene gran importancia y deriva de la observación de que la realización de actividad física a determinadas horas es capaz de encarrilar el ritmo de animales sujetos a condiciones ambientales constantes. Para situar un fenómeno en el tiempo, se hace referencia al *zeitgeber time*, que consiste en contar horas de 60 minutos a partir del momento en que se aplica el *zeitgeber*. Para considerar que un agente concreto puede funcionar como *zeitgeber*, debe ser capaz de encarrilar un ritmo controlando su período, con una relación de fases estable, de manera que el cambio de fase máximo que produzca sea igual a la diferencia entre el período del ciclo externo y la tau del ritmo endógeno. Por ello hay que diferenciarlo de la coordinación relativa, que se produce cuando un elemento ambiental cíclico es capaz de producir cambio de fase en el marcapasos endógeno pero no de forma suficiente como para producir encarrilamiento.

1.1.2 DESARROLLO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.

El sistema circadiano no está presente en el momento del nacimiento sino que se desarrolla durante el período postnatal. En el momento del nacimiento, la mayoría de animales presentan ritmos ultradianos en la mayor parte de sus variables. La maduración de los ritmos comporta un cambio de ritmicidad ultradiana a circadiana. Posteriormente, el ritmo circadiano aumenta su amplitud hasta llegar a la que es propia de la edad madura, aunque la maduración también puede comportar modificaciones en la tau, la forma, el patrón del ritmo circadiano, así como la sincronización con ciclos externos. El proceso de obtención de dicho ritmo circadiano es cambiante de unos individuos a otros.

Respecto a los patrones de sueño nocturno en lactantes a partir de la segunda y cuarta semana se observa un periodo de duración de entre cuarto y cinco horas (Anders, 1985) esto significa que el ritmo es ultradiano.

La adquisición del ritmo circadiano se inicia entre la cuarta y undécima semana de vida (Meier-Koll, 1978) aunque ciertos autores la describen entre la séptima y la duodécima semana después del nacimiento (Fukuda, 1997). Recientemente Nishihara (2002) indica la existencia de ritmos semi-circadiano y circadianos ya a la tercera semana de vida, y a partir de entre la sexta y la duodécima se inicia el aumento gradual de la amplitud del ritmo hacia la instauración del ritmo circadiano.

Es conocido que el ritmo circadiano de la temperatura corporal en bebés es instaurado de forma más temprana que el ritmo de actividad / reposo. Guilleminault y colaboradores (1996) indica que no existe evidencia de ritmos térmicos hasta la tercera semana y hasta la décima semana no se produce la instauración del ritmo circadiano en la temperatura rectal. Sin embargo, Mc Graw (1999) detectó el ritmo circadiano de temperatura timpánica en el primer mes de vida. Por lo tanto el intervalo semanal donde se produce el inicio del cambio de los ritmos ultradianos a circadianos se encuentra entre la cuarta y séptima semana y la consolidación del mismo es alcanzada entre la undécima y duodécima semana de vida.

En la maduración de los ritmos existen una serie de influencias de la madre que ya empiezan en la etapa fetal, y del ambiente, como son la luz y el acceso a la comida. Las características de los ritmos circadianos se mantienen a lo largo de la vida adulta. No obstante, en la vejez, se producen una serie de cambios como son un acortamiento de la tau, una disminución de la amplitud del ritmo circadiano, la aparición de un ritmo ultradiano y una desincronización interna (Nishihara y cols., 2002).

1.2 LA GLÁNDULA PINEAL.

1.2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

El órgano o glándula pineal es una estructura de la parte superior del cerebro que desempeña un papel esencial en el control de los ritmos circadianos de los procesos biológicos. Directa o indirectamente sensible a la luz, suministra al organismo una información temporal, al liberar diversas cantidades de productos al torrente sanguíneo, en función de la hora del día. Libera por la noche una molécula clave, la melatonina, que controla los ritmos diarios, como el cambio de la coloración cutánea y estacional, y el ritmo de la actividad sexual.

La glándula pineal, o epífisis cerebral se conocía desde tiempos antiguos, asignándole funciones todas ellas de tipo espiritual. Un ejemplo sería Descartes, que indicó que controlaba el flujo del “espíritu animal” por unos fluidos que emanaban de ella. El propio Descartes consideró esta glándula como la “sede del alma humana”.

Durante todo el siglo XIX los estudios avanzaron también en este campo. Ahlborn (1884) correlacionó la glándula pineal con el órgano parietal (tercer ojo) de algunos pequeños vertebrados y con las estructuras de los ojos laterales. Gutzeit (1896) asocia por primera vez la existencia de un tumor pineal a un síndrome de desarrollo sexual precoz. Otto Heubner (1898), publicó el caso clínico de un niño que presentaba pubertad precoz, acompañada de la existencia de un tumor pineal. En los cincuenta años siguientes, fueron observados otros casos similares de niños con tumor de la pineal y desarrollo sexual precoz.

En 1905, Studnicka comprobó que el órgano fotosensorial de algunos pequeños vertebrados evolucionó hasta llegar a ser la glándula pineal secretora de mamíferos (Hadley, 1997). Holgrem apuntó que las células de la pineal de un elasmobranquio eran de naturaleza sensorial, puesto que los pinealocitos se asemejaban a las células sensoriales de la retina (Hadley, 1997). Como algunos reptiles presentan un “tercer ojo” muy prominente, la pineal de los mamíferos fue considerada como un vestigio de este órgano visual primitivo.

La pineal humana puede calcificarse a edades tempranas, por lo que se pensó que era un órgano vestigial, y por ello sin importancia a nivel fisiológico. Sin embargo, otros estudios y los ya comentados de Gutzeit y Heubner, mostraron las posibles conexiones entre la pineal y las funciones reproductoras y describieron algunas correlaciones entre hechos clínicos y disfunciones pineales (Arendt, 1995).

La melatonina fue aislada originalmente por Lerner y colaboradores (1958), que buscaban un factor que pudiese ser responsable del vitiligo de humanos. De esta forma aislaron y determinaron la estructura de una sustancia de la pineal, una indolamina a la que llamó melatonina, cuya naturaleza química era N-acetil-5-metoxitriptamina. Se denominó así debido a su acción blanqueadora cuando se aplicaba a vertebrados inferiores en las que es responsable del empalidecimiento que se observa en algunas especies nocturnas. En aves y mamíferos no se han observado cambios diarios en el color, sin embargo, se ha relacionado a la pineal y la melatonina con los cambios estacionales en el mismo, aunque los descubrimientos más importantes fueron los relacionados con sus efectos antigonadales en el sistema reproductor de los mamíferos (Hadley, 1997).

1.2.2 ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA PINEAL.

La glándula pineal se desarrolla a expensas de una evaginación del techo del ventrículo medio (III ventrículo) y pierde la conexión con el cerebro (concretamente con el diencefalo) a excepción de un tallo muy delgado en animales de sangre fría (Collin, 1971; Vollrath, 1981; McNulty, 1984). El lumen está abierto al tercer ventrículo y está lleno de líquido cefalorraquídeo (Omura y Oguri, 1969; McNulty, 1984; Falcón y cols.,

1992a). La pineal se vuelve foliculada en lagartijas y aves y glandular en ofidios y mamíferos (Collin, 1971; Vollrath, 1981). Estos cambios morfológicos, como los observados en el curso de la evolución, pueden ser vistos también en algunos teleósteos (Omura y Oguri, 1969). Se ha visto también que durante el desarrollo el órgano pineal del pollo ensancha gradualmente su aspecto folicular y acaba compuesto de estructuras parenquimáticas, similar a las observadas en la pineal de mamíferos (Boya y Calvo, 1978; Vollrath, 1981). La evolución morfológica llevada a cabo por la pineal corre pareja con la evolución de sus tipos de células. A esta glándula se la denomina también epífisis o excrecencia superior en contraposición a la hipófisis o excrecencia inferior.

1.2.2.1 Anatomía microscópica de la pineal en mamíferos.

La pineal adulta está inervada por fibras postganglionares que se originan en el ganglio cervical superior (GCS), por lo que se le puede considerar un órgano efector del sistema nervioso autónomo (Wurtman y cols., 1968).

El tipo celular más característico de la glándula pineal de mamíferos es el pinealocito, célula epifisaria o célula principal (Wallace y cols., 1969). Los pinealocitos derivan del foro endimario del epítalamo y pueden distinguirse tanto células claras como células oscuras. Las células oscuras contienen gránulos de un pigmento de naturaleza desconocida, así como depósitos de glucógeno cuyo significado fisiológico tampoco está aclarado (Hadley, 1997). Esta distinción se basa únicamente en la diferencia de densidad electrónica del citoplasma, lo que permite clasificarlos en cromófilos y cromófobos (Quay, 1965).

El resto de la masa glandular está compuesta por elementos gliales y por fibroblastos. La calcificación de la pineal humana se inicia durante la segunda década de vida y, hacia los 60 años de edad el 70% de todas las glándulas pineales pueden estar, al menos, parcialmente calcificadas (Hadley, 1997). Sin embargo, se ha señalado que incluso en estados de calcificación avanzados la glándula pineal puede seguir produciendo melatonina.

1.2.2.2 Anatomía microscópica de la pineal en aves.

El órgano pineal de las aves, a diferencia del de los peces, anfibios y reptiles, aparece en ocasiones como una estructura bipartita: un órgano pineal primario y un 20% de los animales investigados, un tejido pineal secundario o accesorio. Por esta razón algunos autores hablan del sistema pineal en aves.

El órgano pineal primario puede aparecer como una estructura bien conformada o atrofiada, que se extiende desde la región intercomisural hasta el techo de la bóveda craneal (Figura III). Se han citado especies con pineales atrofiadas en dos órdenes diferentes de aves, Procelariformes y Strigiformes. Al parecer, estas especies podrían haber evolucionado a partir de antecesores de hábitos nocturnos.

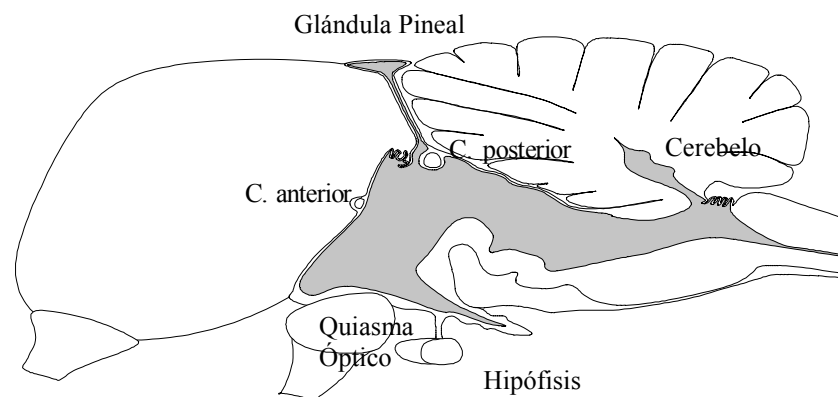


Figura III. Disposición anatómica de la glándula pineal en aves. (Tomado de Barriga y cols., 2004).

Según ciertos investigadores, el parénquima del órgano pineal de aves presenta diferentes tipos celulares. No existe unanimidad a este respecto y los trabajos realizados hasta ahora sobre este órgano no han estudiado en detalle los tipos celulares, por lo que no se puede emitir ninguna conclusión.

Los tipos celulares más característicos son los pinealocitos de tipo receptor, la principal característica de este tipo de célula fotorreceptora, que la distingue de otros tipos celulares de la pineal, reside en la presencia de segmentos externos cortos que contienen una serie de láminas concéntricas. Estas estructuras fueron descritas por primera vez por González y García (1966) en *Gallus gallus*; al microscopio electrónico de transmisión se observan una serie de estructuras rudimentarias, con aspecto de formaciones laminares concéntricas, que se corresponden con los segmentos externos de células fotorreceptoras.

Estudios realizados con microscopio electrónico de barrido en *Urolancho domestica* muestran las diferentes morfologías que adoptan estos segmentos externos: con aspecto de bulbo, de copa, elongado. La estructura interna de estos segmentos y su relación con los segmentos internos no están claramente dilucidadas. Las láminas concéntricas que constituyen estos segmentos externos pueden presentar una imagen caótica o bien pueden sufrir un proceso degenerativo. La prolongación basal de estas células y su pericarion poseen las mismas características de otros fotorreceptores pineales de vertebrados, incluida la presencia de láminas sinápticas; se duda un poco de la existencia de conexiones nerviosas aferentes, aunque en *Gallus gallus* se puede señalar, a nivel ultraestructural, la presencia de una inervación aminérgica por medio de vesículas oscuras (González y García, 1966), inervación que ha sido citada posteriormente por Fujie (1968), Bischoff (1969), y Collin y colaboradores, (1976) entre otros.

La existencia y naturaleza de estas células fotorreceptoras en pineales de pollo ha sido confirmada por los trabajos de Binkley y colaboradores, (1977) y Goto y colaboradores, (1990) respectivamente. Los cuales constituyen un conjunto celular similar al de las células fotorreceptoras pineales de vertebrados inferiores. Este tipo de pinealocito parece estar restringido a órganos pineales de tipo folicular o sacular, distribuyéndose en el borde del lumen (Figura IV).

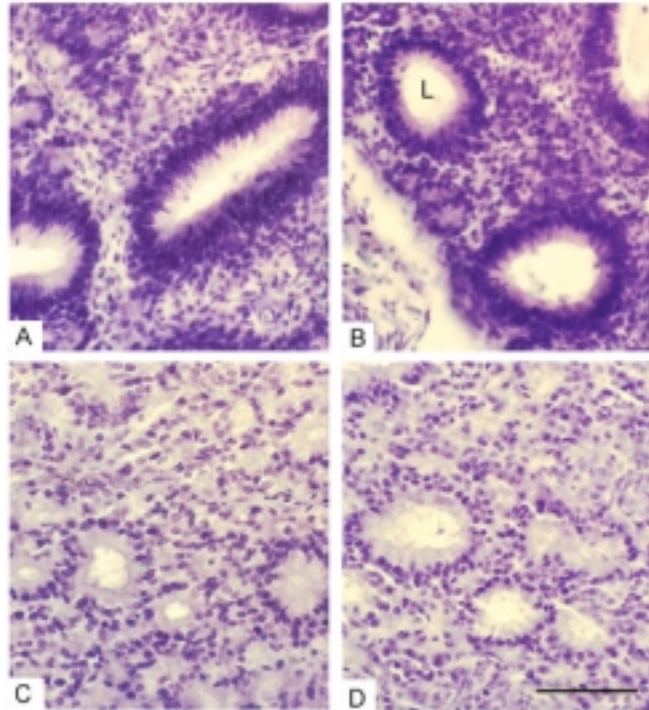


Figura IV. Imagen a microscopía óptica de cortes de tejido de glándula pineal de aves. A y B células con 3 días de vida. C y D células con 79 días. L: lumen. (Tomado de Semple-Rowland. *Molecular vision* 1999).

La presencia de gránulos de secreción en los pinealocitos de tipo receptor del órgano pineal de aves parece señalar que en estas células existe efectivamente un proceso secretor. Se ha señalado la existencia de estos gránulos en pinealocitos de ciertas aves: algunos autores no especifican el tipo celular, mientras que otros indican que estos gránulos se localizan preferentemente en células de tipo receptor. Por ejemplo en el pollo, *Gallus gallus* (González y García, 1966); en la paloma bravía, *Columba livia*, estos gránulos miden aproximadamente de 80-120 nm. Finalmente, ciertos autores mencionan la existencia de dos tipos de células: receptoras y secretoras.

El pinealocito de tipo receptor y de naturaleza secretora, que carece de láminas concéntricas y aparece tanto en el órgano pineal de tipo folicular como en el sacular, ha sido denominado fotorreceptor rudimentario de tipo secretor por Collin (1969) y pinealocito rudimentario de tipo receptor por Oksche y colaboradores (1972). Estas células tienen mucho en común con las células fotorreceptoras típicas: su segmento

externo, que carece de láminas concéntricas, consiste en una serie de protusiones citoplásmicas unidas al segmento interno por un cilio (9+0). Muchas de estas células no presentan cilios en este segmento, pero sí un fuerte acúmulo de mitocondrias, que corresponderían a un segmento interno.

El término pinealocito de secreción implica la presencia de gránulos de secreción, los cuales miden aproximadamente de 50 a 350 nm de diámetro. Los gránulos se originan en el complejo de Golgi y se acumulan en sitios diversos. Unas veces se alojan en las prolongaciones basal y distal, por ejemplo en el pollo (*Gallus gallus*), en la paloma bravía (*Columba livia*) y en el gorrión común (*Passer domesticus*). Otras se acumulan en el pericarion y el proceso basal, por ejemplo en el periquito (*Melospittacus undulatus*) y en el ánade real (*Anas Platyrhynchos*).

Junto a las modificaciones llevadas a cabo por las células de la línea receptora, la innervación pinealofugal ha sido modificada también. Sato y Wake (1983) investigaron la organización de las neuronas de segundo orden en el órgano pineal de 26 especies de aves. Algunas especies exhibieron una densa red de neuronas y fibras; los cuerpos celulares tendían a agregarse en el tronco pineal. En otras especies no se observaron neuronas de segundo orden (codorniz y pollo). Las pineales desprovistas de cuerpos neuronales tenían un aspecto más glandular que las que tenían innervación pineofugal (Sato y Wake, 1983).

No se observan fotorreceptores modificados o en forma de cono en los órganos pineales de serpientes y mamíferos, habiendo sido sustituidos por los pinealocitos *sensu stricto* que están formados sólo por un cuerpo celular (segmentos externos e internos han desaparecido) (Collin, 1971; Vollrath, 1981; Collin y cols., 1986a; Collin y cols. 1989). En modelos neonatales de ratas y hamsters, los pinealocitos primero desarrollan caracteres de fotorreceptores que desaparecen unos días después de nacer (Clabough, 1973, Zimmerman y Tso, 1975). En mamíferos, el pinealocito es el componente mayoritario del órgano pineal porque en el mismo no se observan neuronas y las células gliales representan una pequeña proporción de las células totales.

En cuanto a la presencia de láminas sinápticas en este tipo celular, se observa que éstas no deben desempeñar una función importante en la actividad de la transmisión nerviosa, ya que hasta el momento no se ha señalado la existencia de una inervación aferente en las mismas. Estas láminas son frecuentes en la avefría, *Vanellus vanellus*, la codorniz *Coturnix coturnix japónica*, en *Gallus gallus* (González y García, 1966) y parece estar ausente en *Pica pica*.

Se ha demostrado que la pineal puede actuar como un tejido linfoide periférico en el pollo (*Gallus gallus*) (Cogburn y Glick, 1983). Se ha especulado, por tanto, que la pineal, además de jugar un papel en la periodicidad circadiana, puede proporcionar células inmunocompetentes importantes para la supervivencia del sistema nervioso central (Glick, 1986).

1.2.3 BIOQUÍMICA DE LA GLÁNDULA PINEAL.

1.2.3.1 Fototransducción en la retina de vertebrados.

Los mecanismos de fototransducción han sido estudiados más a fondo en los conos y bastones de la retina, observando que estas células fotorreceptoras muestran una diferente sensibilidad a la luz y respuesta cinética, pero el proceso de fototransducción es similar en ambas células. El receptor del fotón es la rodopsina, que se sitúa en el segmento externo de la membrana plasmática. El GMP cíclico (GMPc) es el segundo mensajero de la fototransducción. La rodopsina consiste en una proteína transmembrana, opsina, unida al 11-*cis*-retinal.

La rodopsina fotoexcitada activa la transducina, una proteína G heterotrimérica. En su estado inactivo, la subunidad α de la transducina une (guanosis difosfato) GDP. En la activación de la rodopsina, este GDP se cambia por un (guanosis trifosfato) GTP, lo que induce una disociación de la subunidad α del complejo de subunidades $\beta \gamma$. En estado activo la subunidad α unida a GTP activa una fosfodiesterasa de GMPc unida a la membrana, que cataliza la hidrólisis de GMPc, dando lugar a una bajada de los niveles intracelulares de GMPc. En la oscuridad, el GMPc induce la apertura de canales catiónicos y la entrada de Na^+ y Ca^{2+} . Debido a esta hidrólisis de GMPc el canal

catiónico se cierra, lo que induce la inhibición de la liberación de neurotransmisores a los espacios sinápticos que hay entre el bastón o cono y neuronas de segundo orden. La subunidad α de la transducina tiene una actividad GTPasa intrínseca y se reasocia con el complejo de subunidades β y γ . Un nuevo ciclo puede empezar; permitiendo la amplificación de la respuesta. La inactivación del sistema implica fosforilación de la rodopsina por una rodopsina quinasa seguido de la unión de arrestina a la rodopsina fosforilada.

Los iones de calcio y proteínas que unen calcio juegan un papel importante en el proceso de fototransducción. En la oscuridad el Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es alto, y se une a: 1) una proteína activadora de guanil ciclasa que resulta en la reducción de la actividad ciclasa y 2) recoverina para inhibir la rodopsina quinasa.

En la luz $[\text{Ca}]_i$ es baja. Esto activa la guanil ciclasa, incrementa la sensibilidad de los canales a GMPc, y favorece la activación de la rodopsina por la rodopsina quinasa. Favoreciendo la entrada de cationes en oscuridad simulando el periodo nocturno, el GMPc permite la despolarización de la célula.

A la inversa, el cierre de los canales catiónicos debido a iluminación hiperpolariza la célula. Esto da lugar a la inhibición de la liberación de un neurotransmisor excitador, como el glutamato o aspartato (Jojich y Pourcho, 1996; Schimtz y Witkovsky, 1997; Vigh y cols., 1997). Investigaciones inmunocitoquímicas han indicado que ambos neurotransmisores se co-localizan en las terminales presinápticas de fotorreceptores en varias especies de animales no mamíferos (Vigh y cols., 1995).

1.2.3.2 Fototransducción y el fotorreceptor modificado de aves.

El órgano pineal de aves tiene una serie de características particulares. Así y mediante electrofisiología no se ha detectado que la pineal en aves sea directamente fotosensible (Morita, 1966; Ralph y Dawson, 1968). Además, el fotoperiodo es capaz de sincronizar la producción de un ritmo de melatonina en órganos pineales de aves aislados. Se ha descubierto mediante técnicas de patch-clamp un canal catiónico dependiente de GMPc en células aisladas de la pineal de pollo, sugiriendo que podría tener lugar en los receptores modificados de aves un mecanismo de fototransducción similar al descrito en la retina (Dryer y Henderson, 1991; Dryer y Henderson, 1993; D'Souza y Dryer, 1995). Se han descrito moléculas de fotopigmentos en los fotorreceptores modificados, así como un componente similar a la opsina en la pineal de varias especies (codorniz, paloma, periquito, pollo y canario) (Vigh-Teichmann, 1981; Araki y cols., 1992). Una segunda molécula de fotopigmento, específica de la glándula pineal de aves ha sido clonada (Okano y cols., 1994; Max y cols., 1995). Denominándose a esta molécula pinopsina la cual en presencia de 11-cis-retinal muestra sensibilidad al color azul ($\lambda_{\max}=470$ nm) (Okano y cols., 1994). Un dato interesante es que el tratamiento *in vivo* con noradrenalina inhibe el proceso de expresión de la rodopsina en células pineales en estados embrionarios tempranos. Se ha propuesto que la inervación simpática de la pineal contribuye a la inhibición de la expresión de caracteres sensibles (Araki y cols., 1992).

El cromóforo 11-*cis*-retinal ha sido descubierto en glándulas pineales de pollo (Sun y cols., 1993), presentando altos niveles durante la noche y bajos durante el día, induciendo isomerización a todo-trans-retinal (Sun y cols., 1991; Sun y cols., 1993). Finalmente en la pineal de aves otros componentes de la fototransducción, como la subunidad α de la transducina (Okano y cols., 1997), el antígeno S y la recoverina (Mirshahi y cols., 1984; Korf y cols., 1992; Bastianelli y Pochet, 1994).

1.2.3.3 El metabolismo de los indoles ocurre en células fotorreceptoras y derivadas.

Quay (1965) propuso que la pineal era capaz de sintetizar 5-metoxi-indoles. El primer paso en la biosíntesis de melatonina (Figura V) es la conversión de triptófano a 5-hidroxitriptófano, por la enzima triptófano hidroxilasa. Posteriormente el 5-hidroxitriptófano es descarboxilado por la aminoácido aromático descarboxilasa para producir serotonina. La melatonina se sintetiza a partir de la serotonina por dos enzimas; la primera arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), que convierte la serotonina en N-acetilserotonina. La segunda, hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), metila la N-acetilserotonina para producir melatonina. Otros indoles (5-hidroxi-indol ácido acético y 5-hidroxitriptofol) son también sintetizados tras la desaminación oxidativa de la serotonina, catalizado por la monoamino oxidasa (MAO). La metilación de estos compuestos por HIOMT lleva a la formación de, respectivamente, 5-metoxi-indol ácido acético y 5-metoxitriptofol. La serotonina puede ser también metilada directamente por la HIOMT para dar 5-metoxitriptamina.

Durante varios años se consideraba que el metabolismo de los indoles tiene lugar en las células fotorreceptoras de la pineal. Estudios previos *in vivo* e *in vitro* han mostrado que indoles tritiados (triptófano, 5-hidroxitriptófano, serotonina y melatonina) son selectivamente tomados y metabolizados por estas células (Collin y cols., 1986a; Collin y cols., 1989; Falcón y cols., 1992a). Técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas han proporcionado pruebas contundentes que el hidroxitriptófano y la serotonina, así como la N-acetilserotonina y la melatonina están localizadas en las células receptoras (Collin y cols., 1986a; Ekstrom y Meissl, 1990; Falcón y cols., 1981 y 1984; Van Veen y cols., 1984; Guerlotte y cols., 1986; Tamotsu y cols., 1990; Ohshima y Matsuo, 1991; Wang y cols., 1996). Las pruebas más directas de que los fotorreceptores y derivados sintetizan metoxi-indoles se debe a la demostración de que las células contienen y expresan enzimas de las rutas metabólicas de los indoles (Collin y Juillard, 1979; Falcón y cols., 1980).

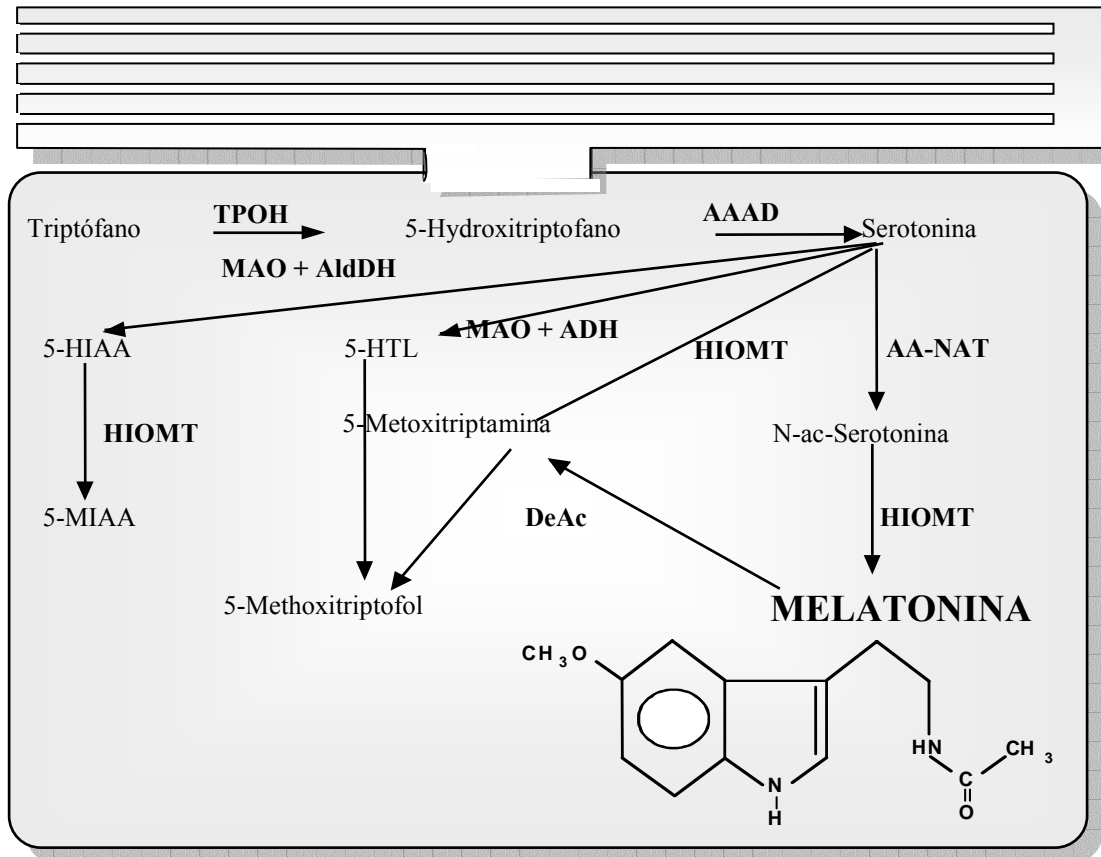


Figura V. Vías del metabolismo de los indoles en las células fotosensibles pineales. Enzimas: AAAD, descarboxilasa de aminoácidos aromáticos; AA-NAT, arilalquilamina N-acetiltransferasa; DeAc, deacetilasa. HIOMT, hidroxindol-O-metiltransferasa; MAO, monoamino oxidasa; TOPH, triptófano hidroxilasa; Indoles: N-Ac-serotonina, N-acetilserotonina; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindol acético; 5-HTL, 5-hidroxitriptofol; 5-MIAA, ácido 5-metoxiindol acético. La estructura química de la melatonina se muestra en la parte de abajo de la figura.

1.2.3.4 Biosíntesis rítmica de melatonina.

Los componentes indólicos muestran variaciones indólicas en la pineal (Quay, 1974). Así los niveles de serotonina y derivados desaminados son normalmente altos durante el día y bajos durante la noche en aves (Quay, 1966; Grady y cols., 1984; Binkley, 1986; Binkley, 1988; Ohshima y Matsuo, 1991;), hecho que también ha sido observado en vertebrados de sangre fría y mamíferos.

La existencia de variaciones luz/oscuridad en el contenido de melatonina en la pineal está bien documentada en todas las clases de vertebrados. Los niveles de melatonina son bastante mayores durante la noche que durante el día en aves (Ralph, 1975; Binkley, 1983; Underwood y cols., 1984; Cockrem y Follet, 1985; Binkley, 1988) y también en mamíferos (Figura VI). Las concentraciones de melatonina en la pineal y en sangre además reflejan el ritmo circadiano en la actividad pineal de AA-NAT, los cuales están correlacionados con los niveles de AMPc en los pinealocitos (Falcon y Begay, 1998). Un ritmo circadiano similar en la producción de melatonina está también presente en aves, aunque los pinealocitos aviares tienen una fotosensibilidad directa (Collin y cols. 1989; Cassone y Natesan, 1997). Los pinealocitos aviares, además tienen receptores α_2 -adrenérgicas además de receptores β y α_1 y su activación ocurre en la fase de luz, causando un descenso en el contenido de AMPc, una inhibición de la actividad AA-NAT y una disminución en la liberación de melatonina (Zatz y Mullen, 1988).

Tanto la duración como la amplitud del ritmo de melatonina depende del fotoperiodo prevalente (Míguez y cols., 1996; Vivien-Roels y cols., 1997). Normalmente, la señal corresponde a la duración de la noche, y la amplitud del ritmo incrementa cuando lo hace el fotoperiodo.

1.2.3.5 Variaciones diarias en la expresión y actividades de las enzimas del metabolismo de los indoles.

Investigaciones en el pollo (Binkley y cols., 1977; Binkley y cols., 1978) demostraron que el ritmo en la síntesis de melatonina es debido a un ritmo en la actividad de la enzima AA-NAT (Figura VI), no pudiendo ser detectado ritmo de AA-NAT en las especies carentes de ritmo de melatonina pineal (Serino y cols., 1993). La exposición de animales a la luz en mitad de la noche decrece rápidamente la AA-NAT rápidamente, resultando una reducción en la secreción de melatonina, en el pollo (Binkley y cols., 1981; Binkley, 1988), además de en otros animales, como en la rata, rana, lucio, etc. La reciente clonación de la AA-NAT ha permitido un rápido progreso en el entendimiento de la regulación de esta enzima (Borjigin y cols., 1995; Coon y cols., 1995; Klein y cols., 1997), observándose que la abundancia de transcritos varía en 24 h de una manera paralela a como lo hace la actividad enzimática.

Otras enzimas del metabolismo indólico que también sufren variaciones luz/oscuridad son:

1.-En el lucio, la actividad de la monoamino oxidasa pineal es mayor al final que al principio del día (Falcón y cols., 1980).

2.-La actividad de TOPH (Triptófano hidroxilasa) es dos veces mayor por la noche que durante el día en la rata (Sugden, 1989). La abundancia de ARNs de TOPH varía durante 24 h en la pineal de pollo y otros animales (Green y cols., 1996; Bégay y cols., 1998).

La actividad de HIOMT, la última enzima en la ruta de biosíntesis de melatonina, se mantiene bastante constante a lo largo del ciclo luz/oscuridad de 24 h en los peces (Falcón y cols., 1987; Morton y Forbes, 1988). Se ha medido una baja amplitud de ritmo en vertebrados superiores mostrando un aumento de un 10/20% por la noche (rata) o durante el día (pollo) (Axelrod y cols., 1965; Quay, 1965; Binkley, 1983). Finalmente señalar que también en la retina tienen lugar mecanismos similares.

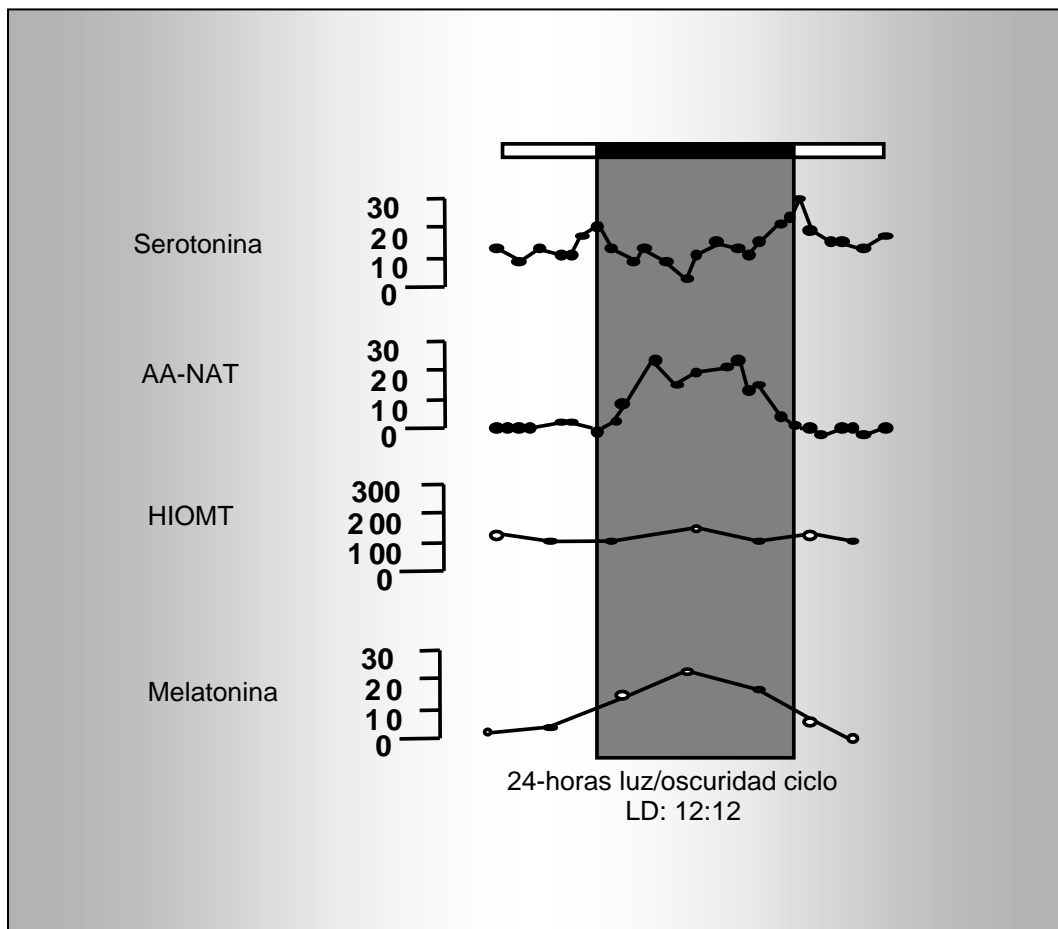


Figura VI. Ritmo circadiano de la actividad enzimática de arilalkilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) y serotonina y melatonina , en la glándula pineal de pollo. Las medidas fueron expresadas como: serotonina y melatonina (ng/ml); AA-NAT y HIOMT (actividad/ng/glándula/h). Modificado del Hadley (1997).

1.2.3.6 Fluctuaciones de melatonina en la sangre.

Además de las fluctuaciones encontradas en mamíferos (Yu y cols., 1981) en los contenidos de melatonina, dichos cambios también fueron detectados en la sangre de aves (Pelham 1975, Pang y cols., 1983; Underwood y cols., 1984; Foà y Menaker, 1988; Van't Hof y Gwinner, 1996 y Gwinner y cols., 1997), así como en la sangre de otros animales, como lagartijas, tortugas, serpientes y mamíferos. Los niveles de melatonina en el plasma, así como en la glándula pineal, son normalmente más altos por la noche que por el día, observándose también que la melatonina de la pineal puede ser liberada en el líquido cerebroespinal. Finalmente señalar que hay suficientes razones para creer que la principal fuente de melatonina circulante es de origen pineal en vertebrados de sangre fría (Reiter, 1981).

Sin embargo, hay que señalar que algunos estudios dan cuenta de que tanto los ojos como la pineal contribuyen a los niveles de melatonina en plasma de aves y mamíferos [Foà y Menaker (1988) en la paloma; Underwood y cols., (1984) en la codorniz japonesa; Yu y cols., (1981) en la rata]. Sin embargo, hay que señalar que en la codorniz y en la paloma los niveles de la hormona no desaparecen totalmente en animales pinealectomizados y cegados (Underwood y cols., 1984; Foà y Menaker, 1988). Otros estudios señalan que la pinealectomía anula totalmente la melatonina plasmática (Lewy y cols., 1980, en la rata, Cogburn y cols., 1987, en el pollo). De todos modos, este efecto de pinealectomía puede ser sólo transitorio, y los niveles de melatonina circulante durante un corto espacio puede también resultar como consecuencia en un aumento del contenido de melatonina en la retina (Yu y cols., 1981, en la rata, Osol y cols., 1985, en el pollo; Vakkuri y cols., 1985 paloma), sugiriendo que la retina puede operar como un órgano compensatorio en la ausencia de pineal.

1.2.3.7 Control fotoperiódico y circadiano de la producción de melatonina *in vivo*.

La información fotoperiódica es un poderoso sincronizador de la producción rítmica de melatonina (Binkley, 1979; Klein y cols., 1981; Binkley, 1983). Aunque la respuesta a la alternancia de luz y oscuridad es algo más que pasivo porque: a) los efectos de la luz dependen de la hora de aplicación por la noche; y b) oscuridad inesperada en medio de la luz no necesariamente induce una elevación en la actividad de la AA-NAT.

Se ha observado, además que la actividad de AA-NAT y los ritmos de melatonina persisten en la pineal de animales mantenidos bajo oscuridad constante (Barret y Underwood, 1992) en la codorniz; Binkley y Séller (1975) en el pollo; Falcón y colaboradores, (1987) en el lucio; Klein y Weller (1970) en la rata; Ralph y colaboradores, (1975) en la rata y el pollo. Además se ha visto que los ARNms correspondientes a las enzimas de la ruta de biosíntesis de melatonina oscilan bajo condiciones constantes.

Diversas observaciones (ritmo de libre curso bajo condiciones de DD (oscuridad total) y/o LL (luz total), sincronización por fotoperiodos de diferente duración y efectos de pulsos de luz en cambios de fase) pusieron de manifiesto que el ritmo de melatonina pineal es llevado por un marcapasos circadiano en la mayor parte de las especies hasta ahora investigadas.

1.2.3.8 Regulación intracelular de la producción de melatonina en el fotorreceptor pineal no mamífero.

1.2.3.8.1 Nucleótidos cíclicos.

Diversas pruebas *in vitro* han demostrado que una alta concentración de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) conlleva un aumento en la actividad de la AA-NAT y esto una mayor producción de melatonina, observando que el GMPc intracelular no parece estar implicado en este proceso.

La inhibición inducida por la luz de la actividad de la AA-NAT y de la secreción de melatonina es parcialmente impedida en la presencia de análogos de AMPc, o de agentes que incrementan los niveles intracelulares de AMPc (Takahashi y cols., 1989; Falcón y cols., 1992b). Un pulso de luz en medio de la noche induce una reducción del 40% en el contenido de AMPc en fotorreceptores aislados. Tal reducción también se observa con forskolin (activador de la adenil ciclasa) o con isobutil-metilxantina (inhibidor de la fosfodiesterasa). Esto sugiere que la luz podría inhibir la adenil ciclasa, y estimular la fosfodiesterasa de AMPc. Así, se supone que hay una fuerte interacción entre la fototransducción, la modulación de la adenil ciclasa y la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc, donde parece estar implicado el Ca^{2+} . La luz también reduce los niveles de GMPc, por lo que la observación de que análogos estables de AMPc nunca reducen completamente los efectos inhibidores de la luz, sugiere que el AMPc no es el único mensajero intracelular implicado en el control de la producción de melatonina (Figura VII).

En la pineal de pollo, la noradrenalina por un lado y el péptido intestinal vasoactivo por otro actúan en los receptores de la superficie celular para, respectivamente, inhibir o estimular la biosíntesis de melatonina (Voisin y Collin, 1986; Pratt y Takahashi, 1989; Zatz y cols., 1990), estando estas respuestas mediadas por AMPc.

La adenosina también modula la actividad de AA-NAT y/o la producción de melatonina en el pollo, la trucha y en el órgano pineal del lucio (Falcón y cols., 1988; Falcón y cols., 1991; Falcón y cols., 1995). Los efectos inhibidores son observados a bajas concentraciones, mediados por la activación de receptores de adenosina A_1 , acoplados negativamente a la adenil ciclasa, así como los estimuladores se ven a altas concentraciones, debidos éstos a la activación de receptores de adenosina A_2 , positivamente unidos a la adenil-ciclasa.

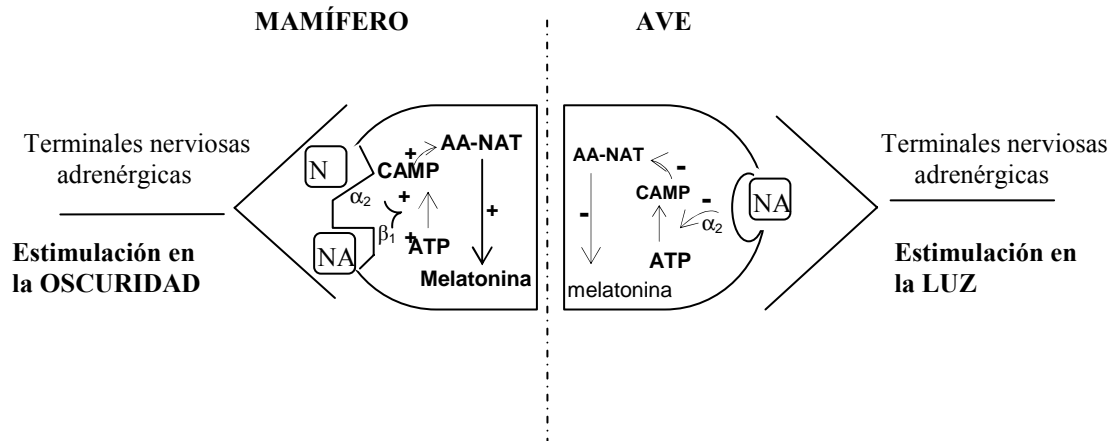


Figura VII. Regulación adrenérgica de la síntesis de melatonina en pinealocitos de mamíferos y aviares. En mamíferos, la NA liberada desde los nervios terminales simpáticos ocurre en la oscuridad. La unión de la NA a receptores β y α 1-adrenérgicos sobre los pinealocitos, estimula la formación de AMPc, la cual activa AA-NAT, incrementando los niveles de melatonina (Vacas y cols., 1995). En los pajaros, la liberación de NA ocurre en la luz. La unión de NA a receptores α 2-adrenérgicos sobre los pinealocitos inhibe la formación de AMPc, bloqueando la actividad AA-NAT y descendiendo los niveles de melatonina (Zatz y Mullen, 1988; Collin y cols., 1989).

1.2.3.8.2 Ión calcio (Ca^{2+}).

Una baja $[\text{Ca}^{2+}]_E$ (concentración extracelular de Ca^{2+}) disminuye la secreción de melatonina, mientras que una alta $[\text{Ca}^{2+}]_E$ incrementa la producción de la misma (Bégay y cols., 1994b; Meissl y cols., 1996). Agentes que incrementan las entradas de Ca^{2+} , mediante canales sensibles a voltaje de Ca^{2+} tipo L, también incrementa la producción de melatonina, mientras que antagonistas de estos canales (verapimil, nifedipina) contrarrestan estos efectos. El estado despolarizado, observado en la oscuridad, favorece la entrada de $[\text{Ca}^{2+}]_E$, mediante la activación de canales voltaje-dependientes tipo L. Una reducción en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (concentración intracelular de Ca^{2+}) podría participar en la reducción de la secreción de melatonina inducida por la luz como consecuencia de hiperpolarización de la célula y cierre de los canales (Figura VIII). Estudios en células de pineal de pollo y de trucha sugieren que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ actúa mediante la modulación de AMPc (Van y cols., 1991; Zatz, 1992a; Bégay y cols., 1994a). De todos modos, esta

podría no ser la única ruta. De hecho, inhibidores de proteínas que unen Ca^{2+} son capaces de reducir los niveles de AMPc a concentraciones mayores que las necesarias para reducir la secreción de melatonina (Bégay y cols., 1994a).

1.2.3.8.3 Relación entre segundos mensajeros y la activación de AA-NAT y otras enzimas.

Cambios en el metabolismo de AMPc están ampliamente asociados con modificaciones en la actividad de la AA-NAT. Sin embargo, los mecanismos que relacionan la modulación de la actividad de la AA-NAT todavía no se conocen muy bien, aunque podemos señalar como definitivos que:

a) La acumulación de AMPc inducida por forskolin tiene poca influencia en los transcritos de AA-NAT, mientras que aumenta alrededor de un 50% la expresión de los transcritos de TOPH (Figura VIII).

b) Los tratamientos con inhibidores de la síntesis de proteínas aumentan la abundancia de ARNm de AA-NAT, además de suprimir completamente la actividad enzimática. Esto sugiere que el AMPc actúa primeramente en los mecanismos post-transcripcionales en la pineal de pollo (Bernard y cols., 1997b; Green y cols., 1996).

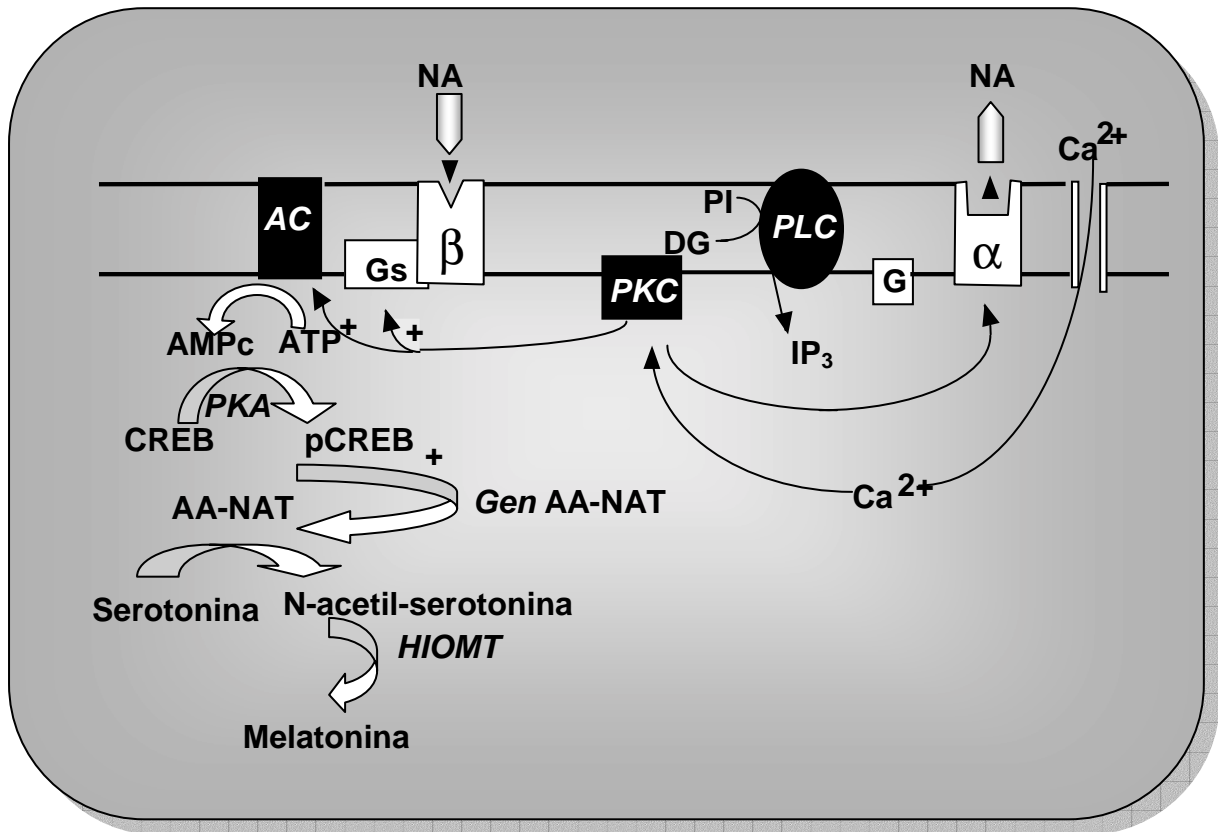


Figura VIII. Regulación de la síntesis de melatonina en la glándula pineal. La unión de noradrenalina (NA) a los receptores adrenérgicos provoca la activación de la adenilato ciclasa (AC). La activación de la AC produce la hidrólisis de la adenosina trifosfato convirtiéndolo en adenosin monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc, con la intervención de la protein quinasa A (PKA) fosforila el factor de transcripción CREB en pCREB, el cual provoca una expresión masiva del gen que codifica la arilalkilamina N-acetiltransferasa (gen AA-NAT) que transforma la serotonina en N-acetilserotonina, la cual metilada por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) lo transforma en melatonina. La unión de receptor α -1 asociado a la proteína G que activa la fosfolipasa C (PLC). La enzima hidroliza el fosfatidilinositol (PI) en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DG). Este componente, vía proteína quinasa C (PKC) y un aumento intracelular de calcio, aumenta la activación de NAT inducido por la estimulación de los receptores adrenérgicos. La estimulación de los receptores alfa 1 incrementa la entrada de calcio extracelular en los canales dependientes de voltaje. (Redibujado de Enderby y cols., 2003).

1.2.4 RECEPTORES DE MELATONINA.

La melatonina, cuyo precursor volvemos a recordar es el aminoácido triptófano, y su metabolito cerebral N-acetil-5-metoxikynurenina tienen afinidad por el receptor central de benzodiazepinas, presente en el complejo receptor GABA_A. Recientes progresos han demostrado a través de la clonación la presencia de una familia de receptores para la melatonina acoplados a la proteína G. Los receptores de melatonina han sido identificados en el área preóptica, corteza cerebral y tálamo, de algunos mamíferos, los cuales pueden mediar los efectos hipnóticos de la hormona. Los receptores cerebrales de melatonina poseen una distribución especie específica. En la mayoría de los mamíferos los receptores de alta afinidad se encuentran en el núcleo supraquiasmático, es decir en el reloj biológico, estos receptores probablemente regulan el ritmo circadiano de sueño-vigilia de la melatonina. Los receptores en la capa flexiforme interna de la retina podrían mediar los efectos de la melatonina sobre la retina.

Existen receptores de melatonina en sitios no neuronales como en la *part tuberalis* de la hipófisis, que es un sitio involucrado en la regulación fotoperiódica de la liberación de prolactina. Los receptores en arterias caudales y cerebrales estarían involucrados en la regulación cardiovascular y de la temperatura.

Los receptores de melatonina pueden clasificarse en ML 1 Y ML 2. Los receptores ML 1 son de alta afinidad y están acoplados a proteína G, los ML 2 son de baja afinidad y no poseen distribución cerebral específica.

Los receptores ML 1 pueden dividirse en los mamíferos en dos subtipos: Mel 1 a y Mel 1 b ambos subtipos en interacción con la proteína G_i, inhiben la adenilciclase y la producción de AMPc. Parecería que el receptor Mel 1 a al ser activado por la melatonina ejercería las acciones reproductivas y el ritmo circadiano en mamíferos.

Los receptores Mel 1 b al ser activado mediaría las acciones de la melatonina en la retina. Se ha clonado un tercer subtipo de receptor Mel 1 c pero su existencia en humanos no está descrita (Valsecchia y Malgor 1998).

1.2.5 GLÁNDULA PINEAL Y RITMOS CIRCADIANOS.

1.2.5.1 Un reloj fuera de la pineal controla el ritmo en mamíferos.

Los ojos y el NSQ son esenciales para mantener una producción rítmica de melatonina. La información fótica capturada por el ojo es retransmitida por el tracto retinohipotalámico al NSQ (Klein y Moore, 1979), actuando éste como un oscilador auto-mantenido (Moore, 1995 y Moore, 1997). A partir de aquí, la información se lleva a la pineal sucesivamente a través del (NPV) del hipotálamo, la columna celular intermediolateral de la espina dorsal y el ganglio cervical superior (Klein, 1985). Fibras simpáticas, concretamente catecolaminérgicas, del GCS inervan el órgano pineal. La liberación nocturna de noradrenalina a partir de las terminaciones nerviosas en el parénquima pineal desencadena la subida de actividad de la AA-NAT y secreción de melatonina a través de una acción sinérgica en receptores adrenérgicos β_1 y α_1 (Klein y cols., 1981; Klein, 1985; Sudgen, 1989 Klein y cols., 1997). El órgano pineal de mamíferos es incapaz de sintetizar melatonina *in vitro* a no ser que se añada noradrenalina o algún análogo al medio de cultivo (Klein y cols., 1981 ; Klein, 1985; Sudgen, 1989; Klein y cols., 1997;).

1.2.5.2 Un reloj dentro de la pineal controla el ritmo en vertebrados no mamíferos.

De modo diferente al órgano pineal de mamíferos, la pineal de peces, lagartijas y aves es capaz de transducir información sobre la luz. Esta propiedad permite un control directo de la luz en la producción rítmica de melatonina. En cultivo, los órganos pineales aislados de estas especies mantienen un ritmo en la liberación de melatonina, sincronizado al impuesto del ciclo luz/oscuridad de 24 h.

Bajo condiciones experimentales (fotoperiodos manipulados) el ritmo de melatonina sigue los ciclos impuestos luz/oscuridad, aunque esto puede afectar al perfil de las subsecuentes subidas nocturnas en la secreción de melatonina (Bolliet y cols., 1995; Gern y Greenhouse, 1998; Molina-Borja y cols., 1996; Wainwright y Wainwright, 1980).

En general parece que en todas las especies no mamíferos investigadas la información fotoperiódica ejerce un control directo sobre el ritmo de secreción de melatonina por la pineal. En la mayor parte de estas especies el ritmo aparece conducido por un reloj intra-pineal, observándose que las pineales de algunas especies no exhiben ritmicidad bajo condiciones constantes. Usualmente, la actividad de la AA-NAT y los niveles de melatonina permanecen altos en la oscuridad y bajos en la luz, independientemente de la duración de las fases de luz y oscuridad (Gern y Greenhouse, 1988; Thibault y cols., 1993a).

1.2.5.3 Relojes intra y extra-pineales controlan el ritmo en aves.

La glándula pineal de aves está extensamente inervada por fibras catecolaminérgicas. Hay evidencias anatómicas y funcionales indicando que la pineal de pollo recibe información de los ojos, en una manera similar a la descrita en mamíferos. De hecho, la extirpación del GCS no tiene efectos en el contenido de melatonina en la sangre en pollos bajo condiciones luz/oscuridad. De todos modos, bajo condiciones de oscuridad constante el ritmo autónomo está considerablemente amortiguado, cuando se compara con el ritmo en animales intactos (Cassone y Menaker, 1983). Además, la administración de noradrenalina a animales con el GCS extirpado inhibe la producción de melatonina (Cassone y Menaker, 1983). Estudios *in vitro* han mostrado que la noradrenalina inhibe la actividad de la AA-NAT y/o la producción de melatonina en el pollo (Deguchi, 1979; Takahashi, 1995) a través de un mecanismo mediado por el receptor α_2 (Voisin y Collin, 1986; Pratt y Takahashi, 1987; Pratt y Takahashi, 1989). Como ya se ha indicado, a diferencia de la situación en mamíferos, la cantidad de noradrenalina es mayor durante el día que durante la noche y contribuye a la inhibición diurna de la producción de melatonina (Voisin y Collin, 1986; Cassone y cols., 1990). Una estructura en el hipotálamo, llamada el núcleo supraquiasmático visual (NSQv) regula la entrada circadiana noradrenérgica en la glándula pineal de pollo (Cassone y cols., 1990), considerando esta estructura como una entrada para el tracto retino-hipotalámico, y su ablación suprime el volumen de noradrenalina pineal (Cassone y cols., 1990). Hay evidencias convincentes que indican que el NSQv del pollo es homólogo al NSQ de mamíferos.

1.2.5.4 Las células sintetizadoras de melatonina son relojes circadianos.

Ya que los conos y las células que son fotorreceptores modificados contienen la ruta de entrada al reloj (la unidad de fototransducción) y producen la señal de salida del reloj (melatonina) se ha supuesto que estas células contengan la maquinaria para que funcione el mismo reloj. En otras palabras, cada una de estas células sería un sistema circadiano (Collin y cols., 1986a; Collin y cols., 1986b y Collin y cols., 1989; Falcón y Collin, 1989; Takahashi y cols., 1989). En un estudio llevado a cabo usando células disociadas de órgano pineal de pollo (Deguchi, 1979) se puso de manifiesto que la actividad de la AA-NAT exhibe un ritmo circadiano similar al que tiene el órgano en cultivo. Esta fue la primera indicación fuerte de que el ritmo es generado a nivel celular. Numerosos estudios han confirmado y ampliado estas investigaciones (Takahashi y cols., 1980, y Takahashi y cols., 1989, en el pollo Falcón y cols., 1991, en el lucio; Bolliet y cols., 1994; Murakami y cols., 1994 en la codorniz japonesa, la paloma y el gorrión), estudios que han sido realizados usando preparaciones de células completas conteniendo células productoras de melatonina así como otros tipos celulares (células intersticiales, neuronas, etc). El uso de una placa de ensayo hemolítica reversa, (Pickard y Tang, 1994) proporcionó la primera evidencia inequívoca de que las células fotorreceptoras individuales de la pineal exhibían tanto un ritmo diario como circadiano en la secreción de melatonina. Con un enfoque similar, Bolliet y colaboradores (1997) controlaron la producción de melatonina por las células fotorreceptoras de la pineal de lucio, aisladas de otras células por un gradiente Percoll. Bajo condiciones luz oscuridad, así como bajo oscuridad constante, su número era mayor durante la fase oscura que durante la fase de luz, y esto resultó en una secreción circadiana de melatonina (Bolliet y cols., 1997). Conclusiones similares han sido obtenidas por Nakahara y colaboradores (1997) los cuales indicaron células pineales que actuaban individualmente bajo condiciones de luz/oscuridad, oscuridad/luz, u oscuridad total. Por todo lo expuesto, se puede indicar que las células que son fotorreceptores sencillos contienen un reloj circadiano, una capacidad fotorreceptiva y la capacidad de secretar melatonina (Bolliet y cols., 1997; Nakahara y cols., 1997; Pickard y Tang, 1993 y Pickard y Tang, 1994).

1.2.5.5 Libre curso y amortiguación.

El periodo del ritmo de libre curso así como su fuerza (capacidad de mantener sostenidas las oscilaciones de altas amplitudes en la liberación de melatonina) son específicas de cada especie. En la mayor parte de especies investigadas hasta ahora, el ritmo tiende a amortiguarse bajo oscuridad constante, ocurriendo de forma más o menos rápida (Menaker y Wisner, 1983; Robertson y Takahashi, 1988; Bolliet y cols., 1994; Murakami y cols., 1994), observando que ésta amortiguación, al menos en las especies investigadas, depende de una función de la densidad de células en las placas.

Observaciones de microscopio electrónico han indicado que la comunicación célula-célula se reduce a densidades bajas como consecuencia de la dispersión de células en las placas de cultivo, lo que podría resultar en una rápida des-sincronización entre la población de relojes. Incrementando la densidad de células aumenta la amplitud del ritmo sin afectar el periodo, llegando a estar el ritmo bien sostenido. Mejor dicho, podría ser que la expresión del ritmo endógeno estuviera afectada por la acción de uno o más componentes endógenos que se acumulan como resultado de una alta densidad de células. La melatonina es el candidato más probable, puesto que podría actuar como sistema de acoplamiento entre la población de fotorreceptores. Esto concordaría con las observaciones de que la melatonina: a) reajusta la fase del reloj en el núcleo supraquiasmático de mamíferos; b) actúa como un sistema de acoplamiento entre los osciladores circadianos en aves y en lagartijas; y c) modula la conductancia de la membrana en bastones de la retina (Mc Arthur y cols., 1991; Foà y cols., 1992; Cosci y cols., 1997).

Indicar que las células gliales son de gran importancia para mantener una amplitud alta y un bien sostenido ritmo de melatonina (Bolliet y cols., 1997). Esto es aparentemente similar a la situación en el NSQ de mamíferos, donde las células gliales juegan un importante papel en la sincronización entre relojes circadianos celulares; pero sus modos de acción son desconocidos (Prosser y cols., 1994; Shinohara y cols., 1995).

1.2.5.6 Efectos de la temperatura.

Se ha observado un efecto de la temperatura en el órgano pineal de pollo (Barrett y Takahashi, 1995; Zatz y cols., 1994), de la lagartija *A. carolinensis* (Menaker y Wisner, 1983), el lucio (Bolliett y cols., 1994). Normalmente, el ritmo de melatonina no se detecta a muy bajas temperaturas (≤ 15 °C en el salmón, ≤ 31 °C en el pollo). La razón para este fenómeno se desconoce, pero ejemplos de otros sistemas sugieren que el reloj se para a una temperatura baja crítica (Barrett y Takahashi, 1995).

Los organismos se exponen a ciclos de temperatura así como a ciclos fotoperiódicos. La pregunta es si la temperatura es capaz de sincronizar el ritmo de producción de melatonina y de ajustar los relojes. Los estudios que se hicieron en poiquilotermos sugirieron que el foto y termoperiodo interactúan para determinar la amplitud y duración del ritmo de melatonina (Falcón y cols., 1994b; Moyer y cols., 1997; Zachmann y cols., 1992c). Bajo condiciones de oscuridad constante los ciclos de temperatura por sí mismos son capaces de sincronizar los relojes que llevan el ritmo de la producción de melatonina. De todas maneras, los experimentos en el lucio sugieren que: a) los ciclos de temperatura son incapaces de ajustar los relojes circadianos y b) pulsos de temperatura bajo condiciones DD son incapaces de cambiar la fase de los relojes (Falcón y cols., 1994b).

Los efectos de los ciclos de temperatura son complejos, poco claros y varían de unas especies a otras. Las diferencias observadas pueden resultar de las variaciones metabólicas propias de cada especie. Además, dichos ciclos sincronizan también los relojes en la pineal de pollo: bajo un ciclo de 37° C(18 h)/42° C(6h) los picos de melatonina coinciden con la baja temperatura (Barrett y Takahashi, 1995). Aparte de esto, una temperatura constantemente alta (42° C) reduce la amplitud del ritmo circadiano y alarga su periodo. En la pineal de pollo los ciclos de temperatura son capaces de ajustar el ritmo de melatonina, y los pulsos de temperatura inducen cambios de fase (Zatz y cols., 1994; Barrett y Takahashi, 1995). De acuerdo con Barrett y Takahashi (1995), pueden estar implicados en la compensación de temperatura o en la transducción de los cambios de temperatura, elementos del sistema de proteínas de choque térmico.

1.3. MELATONINA Y RITMOS DE ACTIVIDAD/ INACTIVIDAD.

Las pruebas de la actividad a nivel del SNC derivan de que la pinealectomía incrementa la actividad motora y EEG, mientras que la administración de melatonina reduce la actividad motora. Dicha administración de la hormona reduce la actividad motora espontánea, promueve el sueño con actividad EEG baja y prolonga la duración del sueño inducido por barbitúricos. La melatonina puede modificar la función de los neurotransmisores del SNC, ya que se ha demostrado que los niveles de serotonina y ácido gamma aminobutírico (GABA) se incrementan en el cerebro tras la administración de la misma.

De todas las funciones de la melatonina, nos centraremos en las dos que mayor relevancia tienen desde el punto de vista de estudio del “reposo”: una es la de inductor de sueño, es decir la hipnótica, y otra segunda es la de sincronizador de ritmos circadianos (Valsecchia y cols. 1998) Ambas funciones están mediadas por distintos receptores siendo los de melatonina de alta afinidad ML 1 donde se regula la función de sincronizador circadiano, y en los receptores de benzodiazepinas donde se ejecuta la función hipnótica (presente en el receptor GABAA).

Se ha estudiado, durante los últimos 20 años los efectos de la administración exógena de melatonina, para determinar las acciones, si las tiene, que esta indolamina realiza sobre funciones corporales, con la esperanza de describir si las aplicaciones terapéuticas eran capaces de corregir anomalías en los ritmos circadianos. Así, se ha visto que la administración oral de melatonina puede adelantar el momento de autoevaluación de la “fatiga”, o dicho de otra forma, del inicio del sueño. También se ha visto que la hormona puede inducir un adelanto en su ritmo endógeno de secreción. En base a estas observaciones se ha administrado la hormona como un remedio capaz de paliar los efectos del desfase horario (“jet-lag”) que se produce como consecuencia de los vuelos transmeridianos, y se ha afirmado que los resultados apoyan el concepto de que la secreción de melatonina actúa como sincronizador interno, evitando la pérdida de sincronía entre los distintos ritmos corporales (Petrie y cols., 1989; Claustrat y cols., 1990).

Aunque el efecto de cambio de fase de la melatonina ha mejorado el sueño en individuos con ritmos circadianos desincronizados, esta acción debe considerarse de modo separado de los efectos hipnóticos más inmediatos que también han sido descritos para la hormona, ya que esta puede producir dicha acción a corto plazo sin afectar al sistema circadiano. Así, no es probable que los efectos hipnóticos de la hormona a corto plazo estén ligados a cambios inmediatos en los ritmos del individuo. Los resultados más recientes indican que la administración de melatonina aumenta la probabilidad de sueño cuando la tendencia a dormir es baja, pero no cuando esta última es alta. Esto puede interpretarse como que los efectos hipnóticos de la hormona son suaves, o como que funciona como un modulador de la propensión al sueño (Dawson y cols., 1993). Aunque puede demostrarse que la melatonina mejora las pautas de sueño/vigilia en los individuos ciegos, no está claro si este efecto está mediado por mecanismos hipnóticos o circadianos (Sack y col., 1991). Existe evidencia de que cuando la melatonina es administrada al final de la tarde a dosis que permitan ser eliminadas antes del periodo de sueño, pueden producir adelantos significativos de fase en los individuos tratados. Esto sugiere que la mejora en el sueño observada tras la aplicación en la noche puede reflejar los efectos hipnóticos, mientras que los efectos de su administración a media tarde estarían relacionados con su actividad en el sistema circadiano.

1.3.1 MELATONINA Y LOS RITMOS DE ACTIVIDAD/ REPOSO EN AVES.

En aves, como en mamíferos, la actividad de los enzimas responsables de la síntesis de melatonina (NAT y HIOMT) así como la cantidad de melatonina en la glándula pineal se encuentran incrementados por la noche y disminuidos por el día en aves. Los niveles séricos de melatonina son mayores durante los periodos de oscuridad, e incluso en animales ciegos se producen cambios en la biosíntesis pineal de indolaminas como respuesta a las variaciones en la iluminación ambiental. Este hecho podría deberse a que el cráneo de las aves, que es muy fino, podría permitir que la luz llegase directamente hasta la pineal. Se ha visto, además que se produce un ritmo circadiano de síntesis de melatonina en glándulas pineales aisladas mantenidas en cultivo y en ausencia de luz, aunque estas pineales aisladas son sensibles a la luz directa.

En el gorrión, *Passer domesticus*, la glándula pineal resulta esencial para el mantenimiento de los ritmos circadianos locomotores en condiciones de oscuridad constante. La ablación de la pineal provoca una actividad locomotora arrítmica, aunque los gorriones pinealectomizados todavía se ajustan a ciclos de luz/oscuridad y presentan otros signos parcialmente indicativos del mantenimiento de un sistema circadiano. El ritmo libre de actividad locomotora no queda abolido por la alteración de las aferencias neuronales a la pineal ni por la disrupción de sus aferencias. Resulta interesante constatar que la ritmicidad de pájaros pinealectomizados puede restaurarse mediante la implantación de una pineal en la cámara anterior del ojo, y que la pineal transplantada transfiere la fase del ritmo del pájaro donante al pájaro receptor. Parece, por tanto, que la pineal de las aves se encuentra acoplada a los otros componentes del sistema circadiano mediante mecanismos endocrinos en vez de nervioso.

Se ha sugerido que la pineal de las aves contiene un oscilador propio que produce una salida hormonal rítmica. Es más, se cree que las fluctuaciones circadianas de las hormonas ajustan a un oscilador amortiguador situado en alguna parte del cuerpo, que a su vez dirige la actividad locomotora.

La administración continua de melatonina reduce la cantidad total de actividad de saltos en la percha de los gorriones, un efecto que vuelve a la normalidad cuando se interrumpe el tratamiento. Esto sugiere que la pineal, mediante su hormona, puede desempeñar un papel sobre la cantidad y temporalidad de la actividad que se expresa a lo largo de los ciclos de descanso/actividad en aves. La pinealectomía elimina el ritmo circadiano normal de temperatura corporal si los animales se mantienen en oscuridad constante (Binkley y cols., 1979, 1988).

1.3.2 MELATONINA Y RITMOS DE ACTIVIDAD/ REPOSO EN LACTANTES.

Los recién nacidos durante el periodo neonatal (28 primeros días de vida) no sintetizan melatonina ya que, empiezan a producir escasos niveles de la misma a partir de 12 semanas de vida (Kennawey y cols., 1992) iniciándose su síntesis a partir del desarrollo de su propia epífisis, estableciéndose un ritmo circadiano de dicha hormona (Ardura J. y cols., 2003). Los niveles melatonina van incrementándose desde los nueve o diez meses hasta la pubertad, momentos en el cual empiezan a decrecer.

El ritmo sueño/ vigilia es muy difícil de consolidar durante el periodo neonatal. Desordenes crónicos en el sueño de los bebés pueden afectar adversamente el desarrollo de los mismos, ya que el sueño ejerce un importante papel en la temprana maduración del cerebro.

Los estudios de melatonina realizados en lactantes con alteraciones en el sueño son abundante, pero todavía no existe un contrastado protocolo terapéutico, ya que la pauta en la dosis de administración con la hormona sintética no está todavía totalmente dilucidada, aunque en los ensayos pertinentes se utilizan 2,5 mg pasando en niños de mayor edad a 5 mg (Jan y cols., 1996). Hasta el momento se ha observado en niños que los niveles plasmáticos se elevan transcurridos una hora y muestra un patrón bifásico de eliminación con una vida media de entre tres a cuarenta y cinco minutos (Penev 1997). Hay que resaltar que la mayoría de los estudios llevados a cabo en niños a los que se les administraba melatonina se realizaron frente a problemas acarreados por patologías como el insomnio y no se centraban en el estudio de la hormona en sí. En los trabajos llevados a cabo por Espezel y colaboradores (1996) que trataron a niños con melatonina (2,5-10 mg) porque sufrían un desorden crónico del sueño debido a alteraciones en la visión, fueron altamente revelador, ya que se observó un adelanto en el momento de la acrofase de la hormona y una mejoría en el estado anímico y como consiguiente un desarrollo más beneficioso. Palm y colaboradores (1997) usando la terapia oral de la melatonina sintética en niños con cegera funcional, los cuales tenían severas alteraciones en el ciclo sueño-vigilia y signos de desincronización, observaron que en estos niños se apreciaba una mejoría significativa, reduciendo el insomnio nocturno y el estado de somnolencia con el tratamiento terapéutico durante el día. Estos

autores llegaron a la conclusión de que la causa de dicha alteración, es que estos niños no perciben los cambios de luz/oscuridad y no tienen sincronizado el día cronológico con el día fisiológico.

No podemos olvidar los beneficios de la melatonina sobre niños epilépticos; Así Molina y Carballo (1997) ponen de manifiesto el beneficioso uso terapéutico de la melatonina debido a la potenciación de los receptores GABA-Benzodiazepina produciendo la inhibición de neuronas en el SNC, involucradas en la generación de mioclonías. Para finalizar señalaremos los resultados de los estudios de Miyamoto (1999) sugiriendo que la administración de melatonina sintética puede ser efectiva en niños de mayor edad, con síndrome de autismo y retraso severo de aprendizaje mostrado en algunos instantes un incremento en la duración y calidad del sueño.

1.4 MELATONINA Y SISTEMA INMUNE.

1.4.1 ASPECTOS GENERALES DE DE LA INMUNIDAD.

En el medio ambiente hay gran cantidad de agentes infecciosos con diversidad de formas, composición, tamaños, virulencias, etc, que afectan a la homeostasis de los vertebrados, y frente a los que luchamos gracias al sistema inmune (Roitt, 2000). Esta palabra deriva del latín “inmunitas”, que significa libre, exento, por lo que sería un sistema por el que los organismos están “libres” de contraer enfermedades. Tal definición se ha completado para abarcar al conjunto de reacciones encaminadas a la eliminación de los agentes infecciosos, células extrañas al organismo, células carcinogénicas, etc, las cuales son llevadas a cabo por factores humorales y celulares.

Se considera que hay dos tipos de inmunidad: una innata o inespecífica, y constitutiva, que actúa sin necesidad de ser activada, como pueden ser: 1) barreras mecánicas (piel y mucosas); 2) factores químicos (pH ácido en distintas cavidades, ácidos grasos no saturados de la piel, lisozimas, esperminas, secreciones mucosas, etc; 3) defensas fagocíticas (monócitos o mononucleares, los macrófagos del sistema retículo endotelial, los polimorfonucleares o granulocitos, como los heterófilos [neutrófilos en humanos], eosinófilos y basófilos); 4) el proceso inflamatorio, con

aumento de la permeabilidad capilar y dilatación de los vasos sanguíneos, facilitando por tanto la llegada de fagocitos y otros recursos para combatir la infección; 5) el antagonismo de la flora bacteriana corporal; 6) las células NK (natural killer) y 7) los factores solubles proteínicos como el complemento.

Por otro lado tenemos la inmunidad adquirida o específica, que tiene que ser desencadenada en presencia del antígeno. Está mucho más evolucionada que la inespecífica, y sólo se encuentra en la escala evolutiva en los vertebrados. Las aves poseen ciertas particularidades que hacen su sistema inmune único, pues poseen la bolsa de Fabricio, que es un órgano específico para la diferenciación de los linfocitos B y posee además antígenos de histocompatibilidad en la superficie de los glóbulos rojos.

Además, el estudio de las diferentes etapas del sistema inmune en estos animales, los cuales se constituyen durante el desarrollo embrionario, resulta relativamente fácil, siendo por ello las aves unos sujetos de estudio perfectos desde el punto de vista inmunológico.

1.4.1.1 La inmunidad innata o inespecífica.

La forma más simple de impedir la infección es evitar el paso del microorganismo al interior del cuerpo. La principal barrera es la piel, que si está intacta, es impermeable a la mayoría de los agentes infecciosos. Ante pérdida de su integridad (v.gr. una herida), se produce una infección, que será más grave cuanto mayor sea la cantidad de piel que se pierde. De todos modos, la mayoría de las bacterias no pueden sobrevivir en la piel mucho tiempo, por los efectos inhibidores del ácido láctico y de los ácidos grasos, responsables ambos del bajo pH de la piel.

El moco que recubre las superficies internas del cuerpo bloquea la adherencia de microorganismos a las células epiteliales. Además, los atrapa y facilita su expulsión por mecanismos físicos como el movimiento ciliar, estornudo o tos. Otros mecanismos que luchan contra los patógenos pueden ser: orina, saliva y lágrimas, pues sus componentes líquidos le permiten realizar una importante función de lavado.

También nos encontramos sustancias bactericidas como el HCl del jugo gástrico, espermina y el zinc en el semen, lactoperoxidasa de la leche y lisozimas en las lágrimas, secreciones nasales y saliva.

La flora bacteriana normal del cuerpo lleva asociado un mecanismo de defensa, el antagonismo bacteriano, para suprimir el crecimiento de muchas bacterias potencialmente patógenas y hongos en las zonas superficiales. Esto se lleva a cabo por la competencia por nutrientes esenciales o por la producción de sustancias inhibitoras como las colicinas o el ácido láctico.

Si se produce una ruptura de la piel, los organismos penetran en el cuerpo, entrando en juego los factores químicos solubles, como el sistema del complemento, o el mecanismo de la fagocitosis.

1.4.1.1.1 Inmunidad inespecífica en aves.

A. Granulocitos.

Son estos un tipo celular que se encuadra dentro del grupo de leucocitos o glóbulos blancos. Hay tres tipos de leucocitos granulares aviares: heterófilos, eosinófilos y basófilos, siendo aquellos los más abundantes. El nombre de heterófilo se debe a que, entre los vertebrados, células homólogas de este linaje contienen gránulos que se tiñen de modo diferente. A microscopía óptica (Olson, 1973), se observa que en aves y conejos se tiñen con eosina, por lo que a veces se denominan granulocitos polimorfonucleares pseudoeosinófilos, pero por brevedad se los llama heterófilos. Son equivalentes a los neutrófilos humanos (aunque estos tienen gránulos de tinción neutra, esto es, no se tiñen. A microscopía electrónica, los diferentes tipos de granulocitos aviares se han identificado mediante las características principales de los granulocitos de mamíferos, como puede verse en la tabla 1.

B. Heterófilos.

Aparecen como células redondas en frotis de sangre teñida, con diámetro aproximado de 10-15 μm . Tienen gránulos acidofílicos, fusiformes o espirilizados. Se tiñen con eosina (rosa brillante) . Por eso se pueden confundir con eosinófilos, aunque los de estos son esféricos. Los gránulos de heterófilos inmaduros son esféricos también, pero se tiñen de rojizo-púrpura. A microscopía electrónica tienen un núcleo polimórfico, con tres o más lóbulos, asociados mediante estrechos puentes, y son más lobulados cuyo tienen más edad. La cromatina se asocia con la membrana nuclear, y aparece como masas teñidas de oscuro.

Hay distintos tipos de gránulos en los heterófilos (Maxwell y Trejo, 1970; Osculati, 1970; Daimon y Caxton-Martins, 1977; Mac-Rae y Powell, 1979; Maxwell, 1984a). Suelen tener forma alargada, espiralada, un contenido homogéneo y densoelectrónico, y 1,5 μm de longitud por 0,5 μm de ancho. Hay otro tipo de gránulos (Daimon y Caxton-Martins, 1977) con un diámetro más pequeño, 0,5 μm , y un contenido translúcido al microscopio electrónico. También hay un tercer tipo, más pequeño (0,1 μm de diámetro) y con el centro separado por una envoltura membranosa mediante un área transparente al microscopio electrónico.

Respecto a las enzimas lisosomales, las actividades fosfatasa ácida (Osculati, 1970; Daimon y Caxton-Martins, 1977) y arilsulfatasa (Osculati, 1970) sólo se encuentran en los gránulos grandes de pollo, pudiendo considerarse sólo a estos como lisosomas. Aunque según Maxwell (1984b) también hay actividad fosfatasa ácida (detectada con trimetafosfato) en los gránulos redondos, de tamaño medio. Por eso, según este autor los dos tipos de gránulos serían el mismo tipo, pero con diferente estado de maduración. Los heterófilos de pollo carecen de actividad peroxidasa, lo que los hace excepcionales (Brune y Spiztnagel, 1973; Maxwell, 1984a), pues no producen peróxido de hidrógeno durante la fagocitosis (Pennial y Spiztnagel, 1975), aunque sí pueden destruir una gran variedad de microorganismos.

C. Eosinófilos.

Éstos tienen un diámetro medio de 7,3 μm , aunque puede variar de 4 a 11 μm . Su citoplasma se tiñe de azul pálido, pero no se distingue bien, pues está lleno de gránulos eosinófilos grandes y redondos, que se tiñen de rojo oscuro, en comparación con el rojo brillante de los heterófilos. Tienen un núcleo bilobulado, y de una azul más oscuro que el de heterófilos. A nivel ultraestructural se distinguen dos tipos de gránulos en algunas especies aviares (Maxwell, 1984a). Algunos se conocen como primarios, son grandes, homogéneos, esféricos y corresponden con un estadio primario de maduración, y como producto de ésta se obtienen gránulos maduros, también llamados específicos, que contienen un cristal.

Tienen una alta concentración de arginina, que porta un grupo guanidil terminal fuertemente catiónico, de ahí su eosinofilia. También tienen presentes varias enzimas, siendo la peroxidasa la más abundante (Maxwell, 1978). Durante la maduración la actividad enzimática de los gránulos se incrementa. La actividad fosfatasa alcalina se limita a los gránulos cuyo se hacen tan densos como los maduros. La actividad arilsulfatasa es débil, sólo es positiva en los polos de los gránulos eosinofílicos de células maduras.

D. Basófilos.

Son los menos estudiados. Son circulares y su diámetro medio es de 8,2 μm , por lo que por término medio son más pequeños que los heterófilos. Tienen un citoplasma abundante e incoloro, con gránulos esféricos de un morado intenso, así como un núcleo débilmente basófilo y redondo u oval, generalmente unilobular. Tales gránulos son variables en tamaño y fibrilares (Dhingra y cols., 1969), distinguiéndose tres tipos de gránulos.

El más común es redondo y densoelectrónico. El segundo tiene una estructura interna punteada. El tercero tiene una disposición en “panal reticulado” (Maxwell, 1973). Daimon y Caxton-Martins (1977) encontraron la actividad fosfatasa ácida sólo en los grandes gránulos punteados, y además en pequeña proporción.

Tabla 1: Tipos y Características de los granulocitos.

Características	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos
% en sangre *	26	2,25	2,8
Diámetro medio*	8,7 μm	7,4 μm (rango 4-11)	8,2 μm
Función	Bactericida	Modulador de la respuesta inflamatoria en la hipersensibilidad tipo IV	Liberación de histamina
Propiedades de tinción de gránulos	Eosinofílicos	Eosinofílicos	Basofílicos
Forma de los extensiones de los gránulos	Esféricos Alargados	Esféricos	Esféricos
Actividad enzimática	Arilsulfatasa Fosfatasa ácida	Peroxidasa	Fosfatasa ácida

* Datos obtenidos de la especie *Gallus domesticus*.

1.4.1.1.2 Fagocitosis y desgranulación.

Se supone que los heterófilos funcionan de forma muy similar a sus homólogos, los neutrófilos, de mamíferos. Se destaca su participación en las reacciones inflamatorias (Carlson y Allen, 1969; Fox y Solomon., 1981; Awadhiya y cols, 1982; Maxwell, 1984b), y su capacidad fagocítica (Carlson y Allen, 1969). Se han aislado los gránulos de este tipo celular, viéndose que poseen actividad bactericida y siendo las proteínas catiónicas y la lisozima las responsables de esta actividad (Brune y Spitznagel, 1973).

Los eosinófilos de mamíferos sufren incremento en número y eosinofilia durante reacciones alérgicas, como casos de anafilaxis o infecciones parasitarias. Hay estudios que señalan la eosinofilia como un proceso que se da durante la inflamación (Fox y Solomon, 1981), aunque no se han realizado observaciones sobre casos semejantes en respuestas a infecciones de helmintos o protozoos. Maxwell (1984b) concluyó que, a diferencia de en mamíferos, las eosinofilia aviares eran partícipes activas en las reacciones de hipersensibilidad tipo IV (retardada).

Los basófilos aviares también producen histamina, como en mamíferos (Chand y Eyre, 1978). Pueden jugar además un papel en la inflamación aguda y en las reacciones de hipersensibilidad tipo I (inmediata) (Carlson y Allen, 1969; Fox y Solomon, 1981).

A. Ingestión de la partícula.

Una vez la célula fagocítica establece contacto por sus receptores de membrana con la membrana del germen que va a ser fagocitado, o con moléculas de anticuerpos o de fragmentos del factor C3b del complemento que se encuentran adheridos a ella, el fagocito emite prolongaciones citoplasmáticas, tipo pseudópodos, en la zona de unión del germen que rodean a éste. Ligandos específicos de la partícula a fagocitar se unen a receptores de los pseudópodos, provocando esto señales fagocíticas que producen un mayor desarrollo de los pseudópodos. Todo este proceso se va repitiendo hasta el engoblamiento total de la partícula por parte de la célula fagocítica, dando un proceso que se conoce como “en cremallera” (Murphy, 1990).

Se forma así un fagosoma o vacuola digestiva, que se separa de la membrana celular y realiza un movimiento hacia el interior de la célula (centrípeto). Respecto a la membrana celular no hay problema por la parte que forma el fagosoma, pues está en continua renovación, sintetizándose nuevas porciones.

El movimiento de los pseudópodos tiene lugar por una concentración de microfilamentos y su sistema de proteínas contráctiles (actina y miosina), así como de las proteínas que unen actina [actina binding protein (ABP)] (David y cols., 1971;

Malawista y cols., 1971; Stossel, 1974; Hartwig y Stossel, 1975; Root y Cohen, 1981). Stendahl y colaboradores (1980) observaron al microscopio electrónico una mayor concentración de filamentos de actina y miosina en los lugares donde se estaban ingiriendo partículas. La citocalasina B, al ser inhibidor de la formación de filamentos también inhibe el proceso de digestión.

Stossel y Hartwing (1976) aislaron del citosol de células fagocíticas actina y miosina y una proteína que une actina (ABP), que producía gelificación de la actina, y al añadir miosina el gel se contraía. La gelsolina, que es Ca^{2+} -dependiente o la acumentina (independiente del mismo) se encargan de controlar la longitud de los filamentos de actina. La acumentina, los acorta. Estos investigadores proponen que la unión de una partícula a moléculas apropiadas de la membrana plasmática de la célula fagocítica hace que la ABP abandone la membrana y se une a la actina en la región que rodea la partícula, promoviéndose el ensamblaje de G-actina (monómeros globulares), dando F-actina (filamentosa, globular) y finalmente se forma una red de filamentos que da lugar a un gel, mientras que la miosina contrae los filamentos. También debe haber un mecanismo que haga desaparecer el gel formado y que los filamentos vuelvan a su estado de reposo.

Hartwig y Stossel (1979) aislaron otra proteína del citoplasma de células fagocíticas. Se vio que al incubar las tres proteínas junto con cantidades micromolares de Ca^{2+} la gelificación de la actina estaba impedida por la gelsolina mediante la ABP. Si no hay Ca^{2+} en el medio la gelsolina no tiene efecto sobre la interacción de actina con ABP.

Luego se dilucidó que las transformaciones sol-gel podían ser reversibles variando la concentración de Ca^{2+} en el medio de incubación, y que la gelsolina podría cambiar las transformaciones gel-solución en una relación una molécula de gelsolina/166 de actina. También propusieron que la relación del polímero actina con el formador de la red bidimensional (ABP) regulaba el estado físico del conjunto de filamentos, rompiendo la gelsolina a la actina, sólo en determinados sitios de la red de filamentos. Se produce así un pequeño, aunque significativo incremento en la relación anterior, solubilizándose el gel.

La ingestión de partículas es diferente cuando han sido previamente opsonizadas y cuando no lo han sido. En el caso de previa opsonización los procesos de activación celular son más rápidos (Murphy, 1990). También se ha visto que la velocidad media de ingestión de partículas es aproximadamente de 1 minuto, y la difusión en la membrana del receptor Fc de 2 a 3×10^{-9} cm^2/seg (Michl y cols., 1983).

Las interacciones ligando-receptor determinan la unión de las partículas, generan la señal de transmisión y también juegan un papel importante en la digestión. Se supone que es además la responsable de activar la maquinaria intracelular, mediante repetidas interacciones que provocan señales fagocíticas, produciéndose la extensión de los pseudópodos, que darán lugar a la ingestión de la partícula unida, y el resto de los ligandos situados sobre la partícula actúan sólo como sitios de unión “pasivos” a los receptores, esto es, permitiendo el avance de los pseudópodos que completa la ingestión (Silverstein y cols., 1989).

Participan en este proceso cationes divalentes (como Ca^{2+} o Mg^{2+}), así como nucleótidos cíclicos (Stossell, 1974). Chakravarti (1988) encontró que se puede hacer la ingestión de eritrocitos de conejo por monocitos humanos de forma independiente a la presencia de suero, y aunque se bloqueasen los receptores CR1, CR3, Fc y OKM1, entre otros, ésta no se inhibía, y sólo dependía de una concentración óptima de magnesio. Como en la quimiotaxis, los factores que incrementan el GMPc intracelular estimulan la ingestión, y los que aumentan el AMPc intracelular la inhiben (Ammon, 1997).

También se consume energía en este proceso, y no puede ocurrir ni a bajas temperaturas ni en presencia de inhibidores de la glucólisis anaerobia (Sbarra y Karnousky, 1959; Karnousky y cols., 1975). En granulocitos y monocitos la energía es producida por la glucólisis y en macrófagos alveolares por fosforilación oxidativa (Karnousky, 1962; Cline, 1965). Aunque la glucólisis proporciona toda o casi toda la energía necesaria para la fagocitosis, no es ésta la única ruta metabólica que se activa durante este proceso, puesto que se observa un aumento en el consumo de oxígeno y del metabolismo del mismo, además de en la ruta de las pentosas monofosfatos (Karnousky

y cols., 1970; Densen y cols., 1978). Aunque ésta no es requerida para la ingestión como tal, sí es necesaria para la digestión intracelular del germen.

Una vez producida la ingestión e iniciada la fagocitosis, tienen lugar una serie de acontecimientos morfológicos y bioquímicos. Se activa una enzima presente en la membrana del fagocito, una nicotín-adenín-difosfo-oxidoreductasa NADP(H), que en polimorfonucleares (PMNs) parece ser una flavoproteína oxidoreductasa, pues requiere Flavín adenín dinucleótido (FAD) para su actividad óptima (Babior y Kipnes, 1977), y después se lleva al interior de la vacuola fagocítica donde reduce el oxígeno parcial o totalmente a ion superóxido (O_2^-) para la destrucción del germen (Babior, 1984).

B. Desgranulación.

Tras la formación de la vacuola fagocítica o fagosoma, se activan los movimientos en el citoplasma y por ello los gránulos azurófilos y los específicos se aproximan a la membrana común y vierten los enzimas al interior del fagosoma. Así se forma el fagolisosoma donde se inician los procesos encaminados a la destrucción y digestión del germen o partícula fagocitada; este proceso se conoce como desgranulación (Spiztnagel, 1977). El movimiento de gránulos hacia el fagosoma también implica la interacción de microtúbulos (Williams, 1982).

Es necesaria la presencia de Ca^{2+} intracelular (Dougherty y Niedel, 1986; Styrk y cols., 1988), el metabolismo de fosfolípidos y la proteína quinasa C (Tauber, 1987), además del ATP generado a partir de la glucólisis, no habiendo desgranulación cuyo añadimos inhibidores de la misma (Henson y Oades, 1975; Goldstein, 1985).

De todos modos, no todo proceso de fagocitosis conlleva desgranulación, pues gérmenes como *Toxoplasma gondii* y las brucelas, por ejemplo, son fagocitadas, aunque no inducen desgranulación y pueden permanecer vivos dentro del fagosoma.

Una vez se produce la desgranulación interna, se desarrollan unos acontecimientos químicos que conllevan la muerte y digestión del material digerido.

C. Destrucción del material ingerido: mecanismos microbicidas.

Tras la digestión del microorganismo tienen lugar unos eventos en el fagocito que conducen a la muerte y digestión de éste (Spiztnagel, 1977). Primero se produce la fusión de la membrana fagocítica con la membrana del gránulo lisosomal, se forma un fagolisosoma y se libera el contenido de los gránulos a la vacuola fagocítica (Haslett y cols., 1989; Kaufmann, 1989).

Se pueden considerar dos tipos de procesos químicos como mecanismo microbicida y que conllevan la destrucción del material ingerido: sistema dependiente de oxígeno y sistema independiente de oxígeno; como indica el nombre, en el primer caso tienen lugar una serie de reacciones redóx que dan lugar al “estallido respiratorio”, donde se consume mucho oxígeno y acompaña a la fagocitosis, y el segundo es un conjunto de compuestos que actúan en ausencia de oxígeno.

C.1 Procesos microbicidas oxígeno-independientes.

Se deben a diversas sustancias procedentes de los heterófilos con actividad microbiana y se producen en medio anaerobio y en fagocitos donde es deficiente o ausente la capacidad oxidativa (Weiss y cols., 1982), como:

-Cambio de pH.

Debido al metabolismo anaerobio dentro del fagosoma se produce rápidamente ácido láctico y ácido ascórbico, lo que conlleva una disminución del pH hasta 6 y 4. Esto ya funciona como bactericida o bacteriostático.

-Liberación de lisozima.

Procedente de los gránulos azurófilos y específicos de los neutrófilos, actúa rompiendo la unión entre el ácido N-acetil-murámico y la N-acetil-glucosamina de la pared celular de las Gram positivas.

-Lactoferrina.

Esta proteína procede de los gránulos secundarios o específicos de neutrófilos y funciona como un eficiente quelante de Fe^{2+} . Así, priva a las bacterias de este microelemento necesario para el metabolismo, teniendo un efecto bacteriostático sobre ellas.

-Proteínas catiónicas.

Éstas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular y con grupos ácidos que interfieren en el metabolismo de muchas bacterias, actuando de modo bactericida y/o bacteriostático. Encontramos aquí la fagocitina y la leucina, entre otras (Shafer y cols., 1984). El efecto de éstas es diferente sobre los distintos gérmenes, y por ello, la carencia genética de una o varias puede provocar procesos infecciosos crónicos según el microorganismo (Rojas, 1982).

C. 2 Procesos microbicidas oxígeno-dependientes.

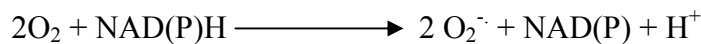
El metabolismo de los fagocitos es una importante fuente de radicales libres endógenos. Están dotados de diversos enzimas líticos (proteasas, lipasas, nucleasas, mieloperoxidasas, etc) y tienen varias vías metabólicas que generan especies químicas agresivas, tales como el peróxido de hidrógeno, radicales superóxido o hidroxilo y, probablemente singlete de oxígeno, que lesiona y destruye elementos extraños. Estas especies reactivas se producen y se utilizan en compartimentos como los lisosomas que están en el interior de los fagocitos, aunque si los mecanismos antioxidantes funcionan bien no tienen porqué dañar a la célula. Los estados inflamatorios son realmente causa de una producción aumentada de radicales libres que puede terminar dañando la defensa antioxidante celular (incluso de modo irreversible) y afectar a su función.

Los procesos microbicidas constan de mieloperoxidasas y cofactores (halidas, tiocianato, tiroxina, triyodotiroxina), peróxido de hidrógeno, aniones superóxidos, radicales hidroxilos y singletes de oxígeno. Estos sistemas, mediante reacciones rédox, llevan a cabo la destrucción y digestión de las partículas fagocitadas. Tras la activación,

las células fagocíticas aumentan el consumo de oxígeno, lo que se conoce como “estallido respiratorio”. Esto ocurre en las células fagocíticas tras estar expuestas a un estímulo determinado, lo que se produce mediante la activación de una enzima, la NADPH-oxidasa que en algunas especies está asociada a la membrana, que realmente constituye una cadena de transporte electrónico, donde participan NADPH deshidrogenasa, FAD, ubiquinona y citocromo B; formarían parte de gránulos terciarios que se unirían a la membrana celular durante la formación del endosoma y serían necesarios para la activación de la oxidasa (Bellavite y cols., 1987; Mollinedo y Schneider, 1987).

-Formación de anión superóxido.

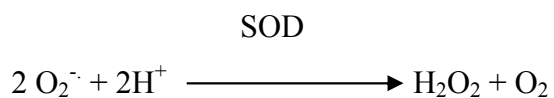
La mayoría del oxígeno consumido en la fagocitosis se transforma en superóxido, intermediario para la formación de agua oxigenada, según la reacción:



El O_2 recibe un electrón adicional. El anión superóxido tiene gran poder bactericida al alcanzar determinadas concentraciones (Prince y Gunson, 1987). Puesto que es muy tóxico, se elimina rápidamente mediante la superóxido dismutasa (SOD) (Makino y cols., 1986), dando lugar a la formación de agua oxigenada, que será posteriormente eliminada por diversos mecanismos que serán comentados posteriormente.

-Formación de peróxido de hidrógeno.

La reacción mediante la cual se forma el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, de gran actividad bactericida es:

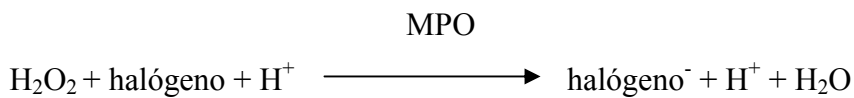


Aquí el oxígeno capta dos electrones y se puede realizar de modo espontáneo o bien por la superóxido dismutasa.

Como este peróxido de hidrógeno difunde al citoplasma y puede ser tóxico para los fagocitos, se degrada por el sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa. A través de esto se produce H₂O evitándose que el citoplasma de estas células sufra algún daño.

-Activación de halógenos.

En presencia de halógenos puede incrementar notablemente la actividad germicida del peróxido de hidrógeno y de una peroxidasa. Los distintos halógenos intracelulares como Br⁻, Cl⁻ y especialmente I⁻ son activados por la presencia de agua oxigenada y de mieloperoxidasa (MPO). La enzima se une al agua oxigenada, formando así un complejo enzima-sustrato que oxida al haluro y lo transforma en un haluro activado que representa en sí un agente tóxico pudiendo convertirse además en otros compuestos con también gran capacidad destructiva. La reacción es:

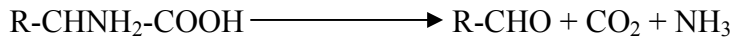


Se ha encontrado así yodación, bromación y cloración de microorganismo con pérdida de la integridad de la superficie bacteriana. En el caso del cloruro parece ser que el principal producto que se forma por el sistema de la mieloperoxidasa es el hipoclorito, que se caracteriza por una gran toxicidad.



-Descarboxilación de aminoácidos.

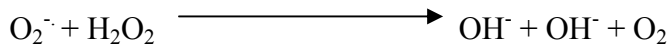
La reacción básica es:



Esta reacción está controlada en parte por la mieloperoxidasa. Muchos de los aminoácidos de la membrana bacteriana se degradan, dando lugar a la muerte del germen.

-Formación de radicales hidroxilos.

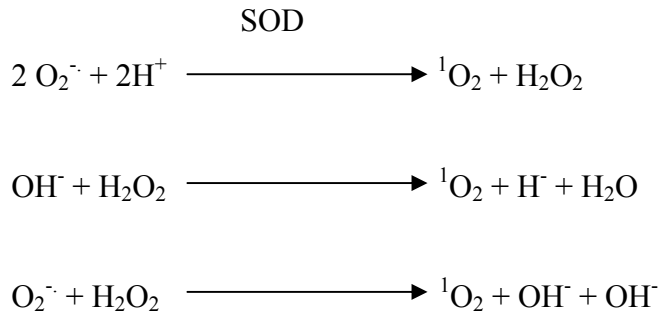
La formación de estos radicales hidroxilos dentro del proceso de fagocitosis no está muy claro, pero se sabe que son inestables y reaccionan rápidamente con cualquier material orgánico, por lo que cumplen un papel bactericida importante (Cohen y cols., 1980). Aquí la reacción sería:



-Formación de singletes de oxígeno.

A consecuencia del consumo de oxígeno durante la fagocitosis, además de producirse radicales hidroxilo también se forman los singletes de oxígeno ($^1\text{O}_2$). Así se denomina una forma del oxígeno, electrónicamente excitado, que al formarse emite luz y es muy inestable, y trata constantemente de revertir a la forma normal o triplete del oxígeno atmosférico. La diferencia entre triplete y singlete de oxígeno radica en la distribución de los electrones alrededor de los núcleos de oxígeno. La alteración electrónica en la molécula del singlete de oxígeno le confiere gran actividad química, sobre todo en aquellos compuestos con doble enlace. Debido a esto tienen la capacidad de dañar y alterar muchos de los sistemas biológicos (Klebanoff, 1980).

Las reacciones quimioluminiscentes son:



También parece que los factores liberados por plaquetas, además del lipopolisacárido bacteriano (LPS) amplifican la secreción de enzimas digestivas y radicales de oxígeno (Haslett y cols., 1989). Además, ha de existir balance entre producción de radicales libres de oxígeno, proteasas y antioxidantes que mantengan el equilibrio para que no se produzca ningún daño tisular (Haslett y cols., 1989).

-Factores que afectan al “estallido respiratorio”.

La activación de la respiración y producción de metabolitos tóxicos de oxígeno, que se conoce como “estallido respiratorio” es una respuesta no sólo producida por el proceso fagocítico, también por la interacción de los fagocitos con un gran número de factores estimulantes solubles, como pueden ser componentes del complemento, lectinas, péptidos quimiotácticos, ionóforos de Ca^{2+} , leucotrienos, factores de activación de plaquetas (Rossi y cols., 1982) y factor estimulante de colonias (FSC) producido por macrófagos y granulocitos (Nathan, 1988).

Tras la estimulación de receptores de neutrófilos con anticuerpos frente al factor C3, se ha encontrado un incremento dosis-dependiente de Ca^{2+} libre intracelular independiente de los niveles extracelulares de este ion. Posteriormente Hartiala y colaboradores (1987) encontraron que había relación entre movilización de Ca^{2+} y estallido respiratorio, aunque la movilización parecía insuficiente para estimularla.

También se considera la posible modulación β -adrenérgica del estallido respiratorio en los fagocitos. Nielson (1987) observó que a bajas concentraciones de prostaglyina 2 e isopropanolol se inhibía el estallido respiratorio inducido por péptidos formilados o ionóforos de Ca^{2+} , como el A23187, quizá al aumentar los niveles de AMPc.

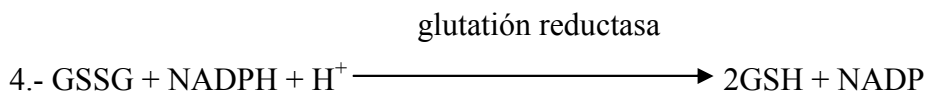
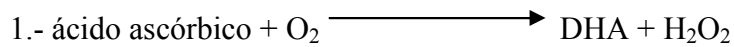
La unión de diferentes moléculas (anticuerpos monoclonales específicos) a los receptores de la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (Ig G) en neutrófilos, provocan un aumento en la desgranulación y liberación de enzimas, además de ir acompañada de una subida en la producción de superóxido (Godfrey y cols., 1987; Willis y cols., 1988).

-Mecanismo microbicida asociado al ácido ascórbico.

A excepción de los eritrocitos todos los tipos celulares sanguíneos contienen más ácido ascórbico (vitamina C) que el plasma (Moser y Weber, 1984). Tal vitamina desempeña un papel importante en la función de estas células inmunes (Bendich, 1988), por ello reconocida como inmunoestimulador (Yerson, 1982). Participa concretamente en la función fagocítica (Oberriter y cols., 1986; Goldschmidt y cols., 1988), aunque el mecanismo de actuación todavía no está claro.

La vitamina C se encuentra en el plasma en su forma reducida (ácido ascórbico), y así es tomada por los neutrófilos. La captación de este ácido por los granulocitos sólo se produce cuando éstos están activados. Probablemente el ácido ascórbico podría actuar estimulando sistemas independientes de la mieloperoxidasa. El ácido ascórbico por sí sólo no afecta a la viabilidad bacteriana, aunque potencia la actividad bactericida de los granulocitos, quizá por un mecanismo de interacción entre el ácido ascórbico y la lisozima.

Las reacciones para explicar el mecanismo por el que actuaría el ácido ascórbico serían:



DHA = ácido dehidroascórbico.

GSH= glutación reducido.

GSSG= glutación oxidado.

Así se postularon unos mecanismos bactericidas que requieren H_2O_2 aunque son independientes de la mieloperoxidasa. El NADP que se produce en la cuarta reacción podría reaccionar con la glucosa-6P, explicándose así el aumento de la ruta de las hexosas monofosfato (glucólisis). En la estimulación de dicha vía podrían intervenir el DHA, 2GSH y NADPH, puesto que la falta de algunos de ellos produce la inhibición de la glucólisis, produciéndose esto de forma posterior a la producción de H_2O_2 y es dependiente de la misma.

De todos modos no se producía ninguna variación en la producción de agua oxigenada, ni en la actividad bactericida de las células fagocíticas cuando actuaba el ácido ascórbico, lo que sugiere que el ácido ascórbico no interviene ni en la producción de agua oxigenada ni en los mecanismos microbicidas.

Aunque se ha visto que el ácido ascórbico actúa preservando la integridad celular por inactivación de los radicales libres y oxidantes (O_2^- y H_2O_2) que mermarían la funcionalidad de los neutrófilos (Englard y Seifter, 1986). A tenor de esto, parece que

el ácido ascórbico es más importante para proteger los daños oxidativos que como activador del proceso microbicida (Yerson y cols.; 1980; Levine, 1986).

1.4.2 CONEXIÓN FUNCIONAL ENTRE LA MELATONINA Y EL SISTEMA INMUNE: ASPECTOS GENERALES Y PARTICULARES EN AVES.

La respuesta inmune altera la función neuronal y endocrina, así como, la actividad neuronal y endocrina modifica la función inmunológica (Blalock, 1994). En esta triple conexión, la melatonina como mayor componente sintetizado en la glándula pineal, es considerada como un nuevo miembro de la red neuroinmunoendocrina (Guerrero y Reiter, 2002; Skwarlo-Sonta, 2003).

Una hormona cuya secreción muestra profundas relaciones con el sueño y el estado inmunológico y que además es uno de los principales reguladores de los ciclos circadianos es la melatonina, producida en la glándula pineal exclusivamente durante la fase oscura y que posee poderosas acciones antioxidantes e inmunorreguladora (Barriga y cols., 2004). En 1987, Kuci y colaboradores al analizar el papel inmunomodulador de la glándula pineal en ratones C57BL/6JHAN, observando que el pico nocturno de la melatonina circulante se encontraba estrechamente sincronizado con el máximo valor en la curva de las variaciones circadianas que presentaban la proliferación de las células progenitoras de granulocitos y macrófagos. Una correlación entre los valores máximo nocturno de melatonina circulante y los valores máximos de linfocitos circulantes han sido observados en ratones (Blom y cols., 1994; Demas y cols., 1996b; Nelson y cols., 1998), ardillas tropicales (Haldar y cols., 2001) y humanos (Depres-Brummer y cols., 1997). Otro aspecto de la función inmune que ha sido evaluado en orden a determinar si existe una correlación con el ritmo circadiano de melatonina ha sido en la respuesta inmune inespecífica debida a la acción de los fagocitos. La fagocitosis, ingestión y digestión de antígenos, es probablemente el más extendido mecanismo de defensa en todos los animales del reino. En las aves, los heterófilos son considerados las células fagocíticas por excelencia y representan el mayor porcentaje de leucocitos circulantes. Estudiando estas células, Rodríguez y colaboradores (1999), han mostrado que en la tórtola collariza los picos nocturnos de melatonina en suero se correlacionan con un incremento en la actividad fagocítica de los heterófilos, sugiriendo por tanto una clara relación entre la melatonina y la respuesta inespecífica inmune. Sin embargo no existe

una correlación inequívoca del 100 % entre de que la melatonina sea la única responsable de los cambios circadianos y circanuales en la respuesta inmune tanto específica como inespecífica, por lo que podemos sugerir que la melatonina participa en estos procesos pero no es el único factor responsable de su regulación estacional o circadiana. Finalmente añadir que en situaciones de estrés, aunque el pico de secreción nocturna de melatonina permanezca, se provoca alteraciones y pérdidas en los ritmos inmunes circadianos. Así, en ratones sometidos a estrés se observa una pérdida y elevación en la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales así como una desaparición del ritmo circadiano de corticosterona, principal glucocorticoide en esta especie (Barriga y cols., 2001; 2003). Estos resultados podrían explicar en parte las alteraciones circadianas de la respuesta inmune durante la pérdida o alteración del sueño, teniendo en cuenta el estrés que para el organismo representa la alteración del sueño.

Partiendo de la interconexión sistema inmune, sistema nervioso y endocrino, y que dicha interconexión está influida globalmente por el medio ambiente, podemos indicar que la función del sistema inmune, la cual consiste en la defensa frente microorganismos, moléculas extrañas o células tumorales, debe ser coordinado en periodos de 24 horas para que su efectividad sea máxima. Similar a otras funciones corporales, la actividad del sistema inmune experimenta cambios circadianos, y esta sincronización recíproca es primordial para la homeostasis. De otro modo, los estados de enfermedad pueden alterar temporalmente la coordinación (Levi y cols., 1992). Los corticoides fueron considerados como reguladores de los ritmos diarios del sistema inmune (Skwarlo-Sonta, 1996). Sin embargo, existen claras evidencias de que determinados parámetros y algunas células inmunes fluctúen en periodos de 24 horas y exhiben diferentes fases a la de los niveles corticoides circulantes (Levi, 1992). Todo esto implica la existencia de algún otro u otros factores implicados en la regulación de la ritmicidad circadiana de la función inmune y la glándula pineal, siendo la secreción de melatonina, uno de los principales candidatos para llevar a cabo dicha regulación. Existen varias razones para esta aseveración: a) la función de la glándula pineal muestra una ritmicidad circadiana y estacional en la mayoría de las especies; b) la síntesis rítmica de melatonina es fuertemente dependiente de las condiciones de luz, y c) la melatonina participa en el control de diferentes ritmos biológicos, incluidos los asociados con la edad, por lo tanto está relacionada con un incremento en la incidencia

de las infecciones, desordenes autoinmunes y cáncer (Skwarlo-Sonta, 1996). En los últimos años, diferentes experimentos apoyan una conexión funcional entre la pineal y el sistema inmune en mamíferos y aves y que en dicha conexión influye, entre otros parámetros, el desarrollo y la edad de los animales.

Diferentes mecanismos del sistema inmune actúan sobre la glándula pineal y viceversa complementándose ambos mecanismos entre si. Está interconexión incluye la participación por parte de la glándula pineal de su principal producto secretor, la melatonina altamente lipofílica, pudiendo por tanto penetrar en las células inmunes incluso sin actuar sobre receptores específicos. El sistema inmune, por su parte, puede sintetizar y secretar factores solubles y citoquinas, influenciando en la función de la glándula pineal y todo ello como único fin de mantener la homeostasis del organismo (Skwarlo-Sonta, 1996).

1.4.2.1 Pinealectomía y sistema inmune.

El embrión aviar ofrece un excelente modelo para el estudio de las interconexiones entre la glándula pineal y el sistema inmune, puesto que en estos animales el timo y la glándula pineal empiezan a desarrollarse al mismo tiempo (Skwarlo-Sonta 1996,1999, 2002). Así, en embriones de pollos pinealectomizados a las 96 h de incubación, Jankovic y colaboradores (1994) observan un retraso en el desarrollo de los órganos linfoides primarios (timo y bolsa de Fabricio) al mismo tiempo que un descenso en la respuesta inmune humoral, hechos que van acompañados por una disminución de numerosas actividades celulares, observándose también cambios significativos en los niveles de serotonina, dopamina y noradrenalina en hígado, cerebro e hipotálamo. Estos resultados claramente indican la necesidad de una glándula pineal intacta para el desarrollo del sistema inmune, sugiriendo la influencia directa de la glándula pineal sobre el desarrollo del tejido linfoide, y de forma indirecta mediante la vía neuroendocrina (Skwarlo-Sonta, 2002). Sin embargo, no se excluye la posibilidad de la compensación de la síntesis de melatonina en lugares extrapineales en estadios tardíos de la vida postnatal.

Una relación estratégica entre el sistema inmune y la glándula pineal fue demostrada en experimentos centrados en la bolsa de Fabricio, la primera glándula linfoide existente exclusivamente en la especie aviar y responsable de la maduración de células B. Así, al extirpar la bolsa de Fabricio en embriones, se observó no sólo una disminución de la respuesta inmune en pollos, sino que también que dicha extirpación influenciaba sobre el ritmo circadiano de la glándula pineal, ya que aparecía un descenso en los picos nocturno de la actividad de NAT pineal y de los niveles de melatonina en suero (Youbicier-Simo y cols., 1996). Por otra parte, Moore y colaboradores (2002) observaron que tras la pinealectomía, se produce la abolición del ritmo circadiano del sistema inmune no específico, ritmo que puede ser de nuevo restaurado mediante un tratamiento prolongado con dosis fisiológicas de melatonina (Rosolowska y cols., 1991).

En 1994, Rodríguez y Lea estudiaron el efecto de la pinealectomía sobre la respuesta inmune inespecífica (proceso fagocítico), así como ciertos parámetros hematológicos y niveles plasmáticos de diversas hormonas. Los resultados indicaron que los animales pinealectomizados poseían un incremento en el número de glóbulos blancos y proteínas totales y ciertas alteraciones en el proceso fagocítico de los heterófilos sanguíneos en comparación con los animales no pinealectomizados. Además, el metabolismo oxidativo de los heterófilos (niveles de anión superóxido), medido a través de la reducción de nitroazul de tetrazolio, mostró un descenso en los animales con la glándula pineal intacta en comparación a los pinealectomizados (Rodríguez y cols., 1999b). Teniendo en cuenta que dichos autores llevaron el estudio tanto en condiciones basales como tras la inmunización con suero de carnero, se observa que la administración del antígeno no provoca diferencias entre ambos grupos de animales en ninguno de los parámetros analizados.

1.4.2.2 Acción inmunomoduladora de la melatonina en aves.

De forma general podemos sugerir que los efectos ejercidos por la melatonina sobre aspectos de la función del sistema inmune dependen de la especie, edad y sexo de los animales, así como del protocolo experimental, incluidas las estaciones, las dosis de melatonina y la vía de administración (Maestroni y cols., 1987; Conti y Maestroni

1994). Una de las más interesantes relaciones entre melatonina y sistema inmune son las variaciones estacionales observados en animales salvajes en la naturaleza y condiciones de laboratorio, cuando los animales son conservados en diferentes periodos de luz artificial (Markowska y cols., 2000).

En aves, la melatonina ha sido mostrada como un modulador de numerosas funciones inmunes, producción de anticuerpos, proliferación linfocitaria, actividad CCDA (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), actividad citotóxica NK (natural killer), síntesis de de citoquinas y liberación. (Skuarlo-Sonta, 1996). Estas acciones son debidas a que la melatonina aumenta la proliferación celular tanto de los linfocitos T sanguíneos como de linfocitos T y B procedentes del hígado frente a mitógenos (Kliger y cols., 2000). En los pollos, el ritmo circadiano de diferentes parámetros estaban estrechamente relacionados con la presencia de una glándula pineal intacta (Rosolowka-Huszcz y cols., 1991). En pollos de siete días de vida, inmunizados con antígeno porcino tres veces en el intervalos de 9 días Youbicier-Simo y colaboradores (1996) observaron un incremento de la melatonina diurna circulante a partir de la segunda inmunización. Finalmente, Moore y colaboradores (2002) apuntan la posibilidad de que la melatonina exógena podría reconstituir la respuesta deficiente tanto celular como humoral en la codorniz japonesa.

Cuando la melatonina, en un amplio rango de concentraciones, es añadida a cultivos de linfocitos, se observa que no se producen cambios en la captación de timidina tritiada, medida directa de la proliferación celular. Sin embargo, si la melatonina es añadida junto a un mitógeno, se aprecia una disminución en la proliferación celular, siendo mayor el efecto cuando los cultivos de linfocitos proceden de pollos muy jóvenes (5 días de edad). Si la melatonina es añadida dos horas antes del mitógeno, no aparecen cambios en la proliferación celular pero cuando la misma es administrada 2 horas después del mitógeno, se aprecia una disminución en la proliferación linfocítica, debido seguramente a una acción bloqueante por parte de la melatonina. Además, cuando los esplenocitos son pretratados con mitógenos durante 2 horas y posteriormente son expuestos a la presencia de melatonina, se bloquea la proliferación de los mismos (Skuarlo-Sonta, 1999).

En la tórtola turca (*Streptopelia roseogrisea*), se han llevado a cabo diferentes estudios en relación con el efecto *in vitro* de melatonina sobre la respuesta inmune inespecífica (fagocitosis), mecanismo fundamental en la defensa frente a las infecciones. En dichos estudios se emplearon heterófilos aislados de sangre periférica, utilizando estas células por su capacidad de ingerir y destruir diferentes antígenos. Así, Rodríguez y colaboradores (1997) evaluaron los diferentes pasos del proceso fagocítico en estas células, consistentes en: adherencia, movilidad, capacidad de ingestión y digestión, así como el metabolismo oxidativo que acompaña a la destrucción del antígeno ingerido. Estos autores observan que cuando los heterófilos son incubados en presencia de dosis farmacológicas de melatonina (5, 25, 50, 75 o 100 μM) presentan un aumento de ingestión de partículas de látex (antígeno suministrado) a todas las dosis estudiadas. Además, la concentración de 100 μM de melatonina posee un importante papel como quimioatrayente para los heterófilos (movilidad inducida necesaria para atraer al fagocito hasta el lugar de infección). En adición, el metabolismo oxidativo producido durante el estallido respiratorio, aparece disminuido tras la incubación con 100 μM de melatonina. Posteriormente estos mismos autores comprobaron que la melatonina controla los niveles de anión superóxido (primer radical libre que se produce en el estallido respiratorio que acompaña a la digestión del antígeno) a través de la modulación de la actividad de la superóxido dismutasa (enzima encargada de eliminar el anión superóxido) en los heterófilos de tórtola collariza, observándose también que la melatonina incrementa la concentración de mieloperoxidasa en las células fagocíticas de aves (Barriga y cols., 1998).

En los heterófilos de la tórtola collariza, existe una correlación entre los ritmos circadianos de melatonina, fagocitosis, y niveles de anión superóxido, observándose una correlación positiva entre las fluctuaciones circadianas de melatonina y la capacidad fagocítica, con valores máximos en ambos ritmos por la noche (los máximos índices de fagocitosis se obtienen a las 4:00 am coincidiendo con el pico más alto de los niveles séricos de melatonina). Sin embargo, se encontró una correlación negativa entre los niveles séricos de melatonina y el metabolismo oxidativo en estas células (Rodríguez y cols., 1999a). Además, en estudios *in vitro* llevados a cabo por Rodríguez y colaboradores (2001) se ha observado en la tórtola turca que a la concentración fisiológica de melatonina se provoca un aumento en la fagocitosis por los heterófilos,

presentando la melatonina propiedades inmunomodulativas, con efecto sinérgico con de la corticosterona *in vitro* en la modulación del proceso fagocítico. Basándose en todos los datos expuestos anteriormente, Terrón y colaboradores (2002) estudiaron *in vitro* el efecto de las concentraciones fisiológicas de melatonina encontradas en tórtolas jóvenes y viejas (300 pg/ml como concentración fisiológica mas alta y 50 pg/ml como concentración fisiológica más baja) en heterófilos procedentes de animales viejos, evaluando en los mismos la capacidad de ingestión y destrucción de *C. Albicans*, así como el estallido respiratorio tras la fagocitosis a través de la determinación de los niveles de anión superóxido. Los resultados obtenidos por estos autores indicaron que la melatonina produce un incremento tanto en la fagocitosis como en el poder candidicida, siendo ambos efectos dosis dependientes. En relación con el metabolismo oxidativo, se observa un descenso de los niveles de anión superóxido después de la incubación con ambas concentraciones de la hormona.

Kirby y Froman (1991) estudiaron en aves maduras, el efecto de periodos constantes de oscuridad comparados con periodos alternos de luz y oscuridad sobre la inmunidad celular y la respuesta secundaria en la producción de anticuerpos. Así, y junto con los trabajos llevados a cabo por Moore y Siopes (2000) se puso de manifiesto que la inmunodepresión producida tras someter a los animales a una luz continua, podía ser contrarrestada mediante la administración exógena de melatonina en estas aves maduras

Finalmente, señalar que la melatonina pineal y no la producida en la retina, es suficiente para mantener una normal respuesta humoral y celular en la codorniz japonesa adulta (Moore y cols., 2002). Todos los datos expuestos apoyan el hecho de que la melatonina es una hormona inmunorreguladora y establece a la glándula pineal, a través de la melatonina, como la primera fuente de regulación del sistema en aves.

1.4.2.3 Melatonina como antioxidante en las células fagocíticas.

La fagocitosis representa un mecanismo fundamental en la defensa frente a las infecciones, formando parte del sistema inmune no específico en el organismo. Las células fagocíticas tras ingerir el antígeno, lo destruyen por la acción de enzimas que

forman radicales libres, en medio de una serie de reacciones de oxido-reducción las cuales son denominadas estallido respiratorio. En este proceso se forman diferentes compuestos químicos, como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, o radicales hidróxilos, compuestos que tienen como función la destrucción de microorganismos. Por tanto, en estas células la presencia de radicales libres representan una ventaja ya que gracias a estas moléculas los microorganismos son destruidos en su interior.

Evidentemente una neutralización o una bajada de estos oxidantes una vez que han realizado su cometido de destruir a los antígenos, representarían una ventaja para las células fagocíticas, ya que podrían mantener durante más tiempo su integridad. Recientemente, muchos artículos han mostrado que la melatonina tiene un amplio espectro como antioxidante, debido a que esta molécula tiene la capacidad de secuestrar radicales libres, estimulando la actividad de diferentes enzimas antioxidantes (Tan y cols., 2000), mostrándose que esta hormona es capaz de realizar estas funciones *in vivo* tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas (Reiter y cols., 2000).

Rodríguez y colaboradores (1997) tras la incubación *in vitro* con dosis farmacológicas (desde 5 a 100 μM) de melatonina, observaron una disminución en los niveles de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), primer radical libre liberado durante el estallido respiratorio en heterófilos de *Streptopelia roseogrisea*. Además, y en la misma especie animal y células fagocítica, estos mismos autores encontraron que la incubación con dosis farmacológicas de 100 μM (23×10^6 pg/ml) de melatonina induce una modulación de la actividad de la superóxido dismutasa, metaloenzima que cataliza el paso de anión superóxido a oxígeno y agua oxigenada (Rodríguez y cols., 1998). Posteriormente, este mismo grupo de investigación, observó que esta misma dosis farmacológica de melatonina producía un aumento en la concentración de mieloperoxidasa, la cual se almacena en los gránulos azurofilos de heterófilos constituyendo el mayor componente de armamento bactericida de los fagocitos, al ser capaz de catalizar la producción de ácido hipoclorito (HCL), un potente oxidante procedente del ion cloruro (Cl^-) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Finalmente se determinó si la melatonina podría actuar sobre el daño oxidativo que se genera tras la fagocitosis en las membranas lipídicas de estas células, medida que se llevó a cabo a través de la concentración de malonaldehído (MDA). Para ello se incubaron a los

heterófilos con dosis farmacológicas de melatonina (23×10^6 pg/ml), observando que la melatonina protege de forma efectiva frente a la lipoperoxidación tanto en condiciones basales como inducidas por antígeno (Terrón y cols., 2001), encontrándose incluso que concentración fisiológica de melatonina (300 pg/ml), reduce la producción de MDA (Terrón y cols., 2001). Todos estos datos corroboran la existencia de una correlación negativa entre los niveles séricos de melatonina, a lo largo de un periodo de 24 horas y los niveles séricos de anión superóxido en estas células fagocíticas, con mínimos valores de estos radicales de oxígeno por la noche y mayores por el día (el mínimo valor coincidió con el pico máximo nocturno de la hormona) (Rodríguez y cols., 1999a). Este hecho probablemente este relacionado con la capacidad de la melatonina de secuestrar radicales libres como antioxidante debido al grupo indol de su molécula, hecho que debe ser utilizado por las células fagocíticas para estabilizar y dar resistencia a la estructura de sus membranas al hacer más resistentes a las bicapas lipídicas de los ataques oxidativos.

En resumen, la hormona melatonina actúa como un antioxidante exógeno en heterófilos de aves, observando su efecto incluso a concentraciones fisiológicas, siendo además un secuestrador efectivo de radicales libres en estas células, protegiéndolas por tanto del daño oxidativo que se produce tras el estallido respiratorio que acompaña a la fagocitosis. A la vista de los presentes resultados, nosotros podemos concluir que la melatonina, al menos *in vitro*, favorece la actividad fagocítica en heterófilos de la tórtola turca, a la vez que neutraliza el estrés oxidativo cuando actúa tanto a concentraciones fisiológicas altas (coincidiendo con las horas de oscuridad) como a concentraciones farmacológicas.

1.4.2.4 La acción directa de la melatonina en el sistema inmune.

Además de las evidencias existentes sobre las interconexiones de la melatonina y el sistema inmune o las consecuencias de la pinealectomía y la enfermedad, las investigaciones en este campo también están centradas en los receptores para la melatonina que se encuentran presente en la respuesta inmune (Nelson y Demas, 1996). Mencionar a este respecto los trabajos llevados a cabo por Yu y colaboradores (1991) los cuales demostraron la presencia de receptores para la melatonina en las células

inmunes, observando que presentaban más densidad de los mismos las aves (pato y pollo) que los ratones, sugiriendo posteriormente Dubocovich (1998) que estos receptores eran de la clase ML 1.

Una unión con alta afinidad entre la melatonina y sus receptores ha sido encontrada en preparaciones de membranas linfocíticas de pollos, en el timo de pato, y en la bolsa de Fabricio (Liu y Pang, 1992). Otros investigadores (Skwarlo-Sonta y cols., 1994) han demostrado la presencia de receptores para la melatonina en cerebro, tejidos linfoides y gónadas en gallos de cuatro semanas, aunque en estos dos últimos tejidos los receptores se presentaban con menor densidad. De los tejidos linfoides examinados, una unión laxa para la indolmelatonina se encontró en preparaciones de membrana aislada de Bolsa de Fabricio, menos unión fue observada en el bazo y sólo un pequeño rastro de la misma apareció en el timo (Liu y Pang, 1992). En aves, los receptores de melatonina están presentes no sólo en diferentes estructuras del sistema nervioso central y periférico (Cassone y cols., 1995) sino que además se encuentra presente en otros órganos periféricos como pulmón (Pang y cols., 1993), hígado (Yu y cols., 1991) y tracto gastrointestinal (Lee y Pang 1992). La extensa distribución de receptores para la melatonina, refleja una extensa sensibilidad de los diferentes procesos fisiológicos a los cambios circadianos, todo ello señalado por los diferentes niveles de melatonina a lo largo del día. Se observa que dicha distribución es más extensa en aves que en mamíferos, apuntándose por tanto la posibilidad de que la melatonina en las aves juegue un papel más primordial. En la mayoría de los casos estudiados el valor de la K_d para estos receptores es de 10-100 pm rango que se presenta similar tanto en los encontrados en aves como en Hamster y rata (Calvo y cols., 1995). Los valores bajos de K_d indican que los lugares de unión específicos para la melatonina dentro del del sistema inmune son de alta afinidad.

La melatonina ejerce un efecto directo en los tejidos del sistema inmune, tanto en mamíferos como en aves, que intervienen e la respuesta específica. En el momento actual quedan muchas incógnitas sobre el significado adaptativo de los receptores de melatonina en los tejidos periférico, siendo una posible explicación que estos receptores ejerzan una ventaja adaptativa para mantener y potenciar un rápido incremento de la función inmune cuando las condiciones ambientales son complicadas (malnutrición,

migración). Finalmente mencionar que los lugares de unión de la melatonina en órganos linfáticos primarios de pollos (bolsa de Fabricio) y secundarios (bazo) parecen contener subtipos de receptores diferente de la proteína G (Poon y Pang, 1996).

1.4.2.5 Influencia del sistema inmune sobre la función de la glándula pineal en aves.

Si la glándula pineal participa en la transmisión de la información entre el medio externo y el interno, y juega un papel en la modulación de la función del sistema inmune, es esencial que el sistema inmune envíe su propia información a la glándula pineal y que estas señales sean adecuadamente transformadas para mantener la homeostasis. Investigaciones recientes indican que la glándula pineal es capaz de recibir esta clase de información y parece ser que la citoquinas son los mejores mediadores para efectuar esta importante función, efecto que parece estar mediado por opiáceos endógenos (Diestefano y Paules, 1994).

Para cerrar el ciclo de regulación entre el sistema inmune y la glándula pineal es absolutamente necesario que el mensajero enviado tras la activación del sistema inmune transmita información precisa a la glándula pineal influenciando en su actividad y en la consiguiente síntesis de melatonina. Dichos estudios que evidencien dicha integración son escasos tanto en mamíferos como en aves (Skwarlo-Sonta, 2002). Se encontró en pollos de 2 a 8 semanas de edad, que su glándula pineal contiene linfocitos infiltrados formando una acumulación periférica bien organizada similar a la que ocupan los órganos linfoides (Olah, 1995). Usando anticuerpos mononucleares se apreciaron que las células linfoides intrapineales podían ser células T, así como células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, formando un verdadero tejido linfopineal. La función fisiológica que se desencadena por infiltración de linfocitos en la glándula pineal hasta el momento se desconoce, pero pone de manifiesto una vez más las interacciones inmunoendocrinas. Embriones de pollos a los que se había producido la extirpación de la bolsa de Fabricio presentaban tanto la respuesta inmune y los niveles de melatonina disminuidos y tras la inyección de bajas dosis de Bursin en los embriones ambos efectos fueron revertidos (Youbicier y cols., 1996). La inmunización con SRBC causó un cambio, dosis y tiempo dependiente en la actividad nocturna de NAT en

pollos, logrando con ello observar que la glándula pineal no sólo capte las variaciones fotoperiódicas sino también las variaciones inmunológicas (Markowska y cols., 2000).

1.4.3 MELATONINA Y EL SISTEMA INMUNE EN LACTANTES.

Los estudios centrados en el efecto de la melatonina y el sistema inmune en lactantes son muy escasos. Los trabajos aparecidos hasta el momento se centran en los casos de amigdalitis infantil, donde los niveles de la hormona pineal se presentan, respecto a niños controles, significativamente bajos en dichas patologías. Se observa un aumento de linfocitos B en suspensiones mononucleares de amígdala, cuantificados por citometría de flujo laminar, tras su incubación en presencia de melatonina, apuntándose la posibilidad de que la melatonina junto con los linfocitos de las amígdalas se unan en la defensas autoinmune para luchar de forma más efectiva frente al ataque de microorganismos, polen o sustancias inertes que penetren en el cuerpo (López-González 1998). Además, la inmunoterapia específica en niños alérgicos al olivo y gramíneas, es capaz de modificar la secreción por la pineal de melatonina, disminuyendo los niveles circulantes de melatonina tras una pauta hiposensibilizante específica, así como en las relaciones inicialmente existentes entre melatonina y beta-endorfinas una vez completada la pauta de inmunoterapia, datos que por otra parte abren nuevas expectativas en la investigación clínica relativa al tema de las alergias infantiles y su eventual tratamiento con pautas hiposensibilizantes. Finalmente, para valorar la funcional de la glándula pineal, Moreno y colaboradores (1999) administraron en diferentes periodos del día y de forma oral, L-triptófano 20 mg/kg de peso a niños sanos, observando un aumento significativo en la producción de melatonina durante la noche, debido a una mayor actividad de la NAT, apareciendo en la orina de los lactantes diferentes compuestos provenientes de la degradación de la melatonina durante el periodo de oscuridad, mientras que durante el día la degradación del triptófano se producía principalmente por la vía de la quinurenina.

1.4.3.1 Melatonina y estrés oxidativo en lactantes.

Tras exponer los mecanismos de acción de la melatonina, modulando la respuesta inmune y actuando como antioxidante en modelos de experimentación animal, pasamos

a centrarnos en el posible papel de antioxidante de esta hormona actuando en afecciones pediátricas mediadas por alta concentración de radicales libres en diferentes periodos de la etapa del lactante. Durante el periodo neonatal, justo durante el periodo de transición de la leche materna a la fórmula de inicio (hacia el cuarto mes de vida), la producción de estrés oxidativo y la formación de radicales libres que se generan, pueden intervenir en procesos tan distintos como en diferentes patologías pulmonares ligadas a daños producidos por oxígeno, lesiones del sistema nervioso central, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades autoinmunes y afectaciones en el curso de infecciones y enfermedades crónicas diversas. Por este motivo, Gitto y colaboradores en el año 2001 realizaron estudios pioneros en este campo, administrando melatonina a lactantes que presentaban enfermedades infecciosas. Para ello, los bebés fueron tratados con 20 mg de melatonina administrada en dos dosis y con un intervalo de una hora. Los niveles de lipoperoxidación obtenidos en los lactantes antes del suministro de melatonina fueron comparados con los que presentaban lactantes sanos, observándose valores en suero de MDA y 4-hidroximaloldialdehído (4-HDA) significativamente elevados en los primeros. Sin embargo, transcurrido de 24 a 48 horas de la administración de melatonina, los niveles en suero de los parámetros de lipoperoxidación revertían a los valores normales encontrados en bebés sanos. La tasa de mortalidad con este tratamiento fue nula.

1.4.3.1.1 Estrés oxidativo en lactantes.

El balance de elementos antioxidantes en el recién nacido realizadas las mediciones en suero difiere del de adultos, en el sentido de que los primeros presentan un bajo poder antioxidante. Este hecho puede dar lugar a la aparición de ciertas situaciones de estrés oxidativo al intentar recién nacido adaptarse al nuevo medio. El hecho mismo del parto supone un cierto grado de estrés que conduce a una inducción de la actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes (Metsvaht y cols., 1999).

El grado de inmadurez del recién nacido es el factor determinante en la velocidad de producción de radicales libres en los mismos, observándose que es en los prematuros es donde se produce un elevado grado de radicales libres durante la primera semana de la vida con respecto a los recién nacidos a término (Varsila y cols., 1994).

Las observaciones llevadas a cabo por De Lubec y colaboradores, 1997, demostrando un aumento de la excreción urinaria de o-tirosina debida a la o-hidroxilación de la fenilalanina, facilitan una evidencia directa del ataque por parte de los radicales libres a los recién nacidos que reciben oxígeno.

Tanto la exposición de los recién nacidos al oxígeno, como si los mismos presentan infección, provocan un aumento por parte de las células fagocíticas de anión superóxido y agua oxigenada, elementos que son particularmente dañinos al actuar en las reacciones redox del hierro presente en el plasma (Moison y cols., 1993). En la sangre del cordón umbilical se ha comprobado concentraciones significativas más alta de uratos, bilirrubina y grupos sulfhídricos que en la sangre materna, elementos que pueden contribuir al aumento de la resistencia por parte del plasma del cordón umbilical a la inducción de lipoperoxidación por iones Cu^{2+} (Kiely y cols., 1999).

En cuidados intensivos, donde los recién nacidos reciben alimentación parenteral y por tanto con un aporte alto de grasas por vía intravenosa, se observa un aumento en la producción de radicales libres valorados a través de un incremento en la lipoperoxidación, provocándose un incremento de pentano el cual se ha asociado con alta mortalidad en los niños de bajo peso, hemorragia ventricular o retinopatía del prematuro (Nycyk y cols 1998).

1.4.3.1.2 Oxidación de proteínas en el pulmón neonatal.

En el líquido tensoactivo que recubre el tracto broncoalveolar se encuentran productos como mucina, ácido úrico, GSH reducido, enzimas antioxidantes, ácido ascórbico y grupos proteína-SH, que constituyen los elementos antioxidantes. Alguno de estos compuestos, como la mucina y el GSH, poseen un alto poder antioxidante y otros, como el ácido ascórbico, se presentan en el líquido tensoactivo a una concentración mayor que en el plasma.

Ante una situación de hipoxia como es corriente cuando aparece una dificultad respiratoria, aparece una liberación de hierro libre intraeritrocitario que puede dar lugar a problemas de oxidación. Además, y durante la hipoxia, hay una depleción de ATP,

acumulándose hipoxantina, la cual y mediante la xantina dehidrogenasa lentamente es convertida en xantina oxidasa. Cuando posteriormente se suministra oxígeno a estos niños, la oxidación de la hipoxantina a uratos es catalizada por xantina oxidasa y en presencia de radicales libres de oxígeno inducidos por el hierro se genera anión superóxido y agua oxigenada. Finalmente, el Ca^{++} entra en las neuronas y activa la sintasa del óxido nítrico, aumentando la producción de óxido nítrico. Este último compuesto reacciona con el superóxido, formándose finalmente radicales peroxinitrilos tóxicos que pueden iniciar el daño tisular.

En resumen, podemos indicar que las circunstancias que favorecen la patología por radicales libres en el recién nacido y prematuro son:

1. Aumento tensión del O_2 en los tejidos.
2. Hiperoxigenación.
3. Baja actividad de los antioxidantes celulares.
4. Baja actividad de las sustancias que eliminan radicales libres.
5. Déficit de carnitina tisular.
6. Exceso de oferta lipídica por la grasa durante la nutrición parenteral.

La oxidación de proteínas en el ámbito pulmonar va acompañada de la introducción de grupos carbonilos en las cadenas laterales de las proteínas. Por tanto, la cuantificación de los grupos carbonilos es un método para poder determinar la extensión del daño oxidativo y el estudio del aspirado traqueal del niño pretérmino, sería un indicador válido de la cuantificación del daño oxidativo de las proteínas.

La concentración de carbonilos se expresa por $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína. Los inmaduros que desarrollan displasia bronco-pulmonar muestran durante los primeros días de vida un alto grado de carbonilación de las proteínas a nivel pulmonar. Esta carbonilación de proteínas, identificable en el aspirado traqueal, representa una reacción oxidativa que afecta al tejido pulmonar. Sin embargo, los productos de peroxidación obtenidos del aire espirado representan una manifestación de lipoperoxidación del organismo conjunto.

Los niños pretérmino parecen mostrar una respuesta antioxidante en el líquido aspirado traqueo-broquial tras un estrés oxidativo, pudiendo el ácido úrico jugar un papel importante como antioxidante del tracto respiratorio durante los primeros días de vida.

En conjunto la capacidad antioxidativa plasmática es más elevada a los dos días de vida en los recién nacidos a término que en los pretérmino con o sin problemas respiratorios, y los factores que favorecen la oxidación con la consiguiente producción de radicales libres son:

1. Grado de inmadurez.
2. Exceso de administración de oxígeno.
3. Aumento del estrés oxidativo por inmadurez de la actividad enzimática.
4. Respuesta inflamatoria asociada por posible infección.
5. Episodios de isquemia-reperfusión.

La producción de surfactante y la función del mismo pueden estar alterados por la hiperoxia y las especies oxígeno-reativas, haciendo que los pulmones sean más vulnerables y respondan de un modo deficiente a suplementación con antioxidantes.

Todo lo expuesto resume el estrés oxidativo, procedente del exceso de radicales libres, en que queda encerrado un lactante, por el sólo el hecho de respirar al intentar adaptarse a un nuevo medio aerobio. Tras analizar en recién nacidos, con problemas respiratorios, los niveles de MDA y nitrito/nitrato en sangre, se observó como era de esperar valores elevados de los mismos respecto a niños sanos utilizados como control. Pero tras el tratamiento con 80 mg de melatonina (8 dosis de 10 mg separados por intervalos de dos horas) y analizando los niveles sanguíneos de MDA y nitrato/nitrito, transcurridas 12 y 24 horas, se observó que ambos parámetros se redujeron significativamente a las dos horas analizadas, reduciéndose la tasa de mortalidad a cero. La acción protectora de la melatonina en este estudio esta relacionada con las propiedades antioxidante de su grupo indol, el cual tiene la capacidad de incrementar la eficiencia del transporte mitocondrial de electrones (Fulia y cols., 2001).

1.4.3.1.3 Fibrosis quística del páncreas.

La inflamación pulmonar debido a infecciones, así como la fibrosis quística del páncreas (FQ), van asociadas a una activación de los neutrófilos y proteínas, con la correspondiente generación de especies reactivas de oxígeno y la consiguientes reacciones inmuno-inflamatorias. La participación de estas especies en la FQ se apoya en el hecho de aparecer un aumento en la actividad de radicales libres los cuales provocan un incremento en la peroxidación lipídica.

Una de las infecciones más frecuentes se deben a pseudomonas, las cuales liberan piocianina causantes del daño oxidativo en presencia de hierro produciendo especies reactivas del oxígeno (ROS). Ello es debido a que los sideróforos, junto a proteínas ligantes de hierro como transferrina y lactoferrina presenten en las secreciones del tracto respiratorio, son degradadas por proteasa y ROS que liberan hierro libre y hacen posible la producción de reacciones con nueva generación de ROS. Asimismo, se observa en esta patología causada por pseudomonas un aumento de la actividad prooxidante de citocinas y una disminución de glutatión en la capa líquida que cubre el epitelio del tracto respiratorio.

Por tanto podemos decir que los neutrófilos activados y los macrófagos alveolares son fuentes principales de las especies endógenas oxígeno-reativas. Una variedad de estímulos tales como bacterias, inmunocomplejos o el factor de necrosis tumoral α (TNF α), aumentan la explosión de neutrófilos y su degranulación provocando seguidamente la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno lo que contribuye al consumo y disminución de la capacidad antioxidante, unido además la hecho de presentarse una disminución en la concentración tisular de vitamina C y α -tocoferol, ya que la vitamina C se considera que juega un papel principal en el sistema de defensa extracelular del pulmón y puede actuar como un potente barredor de los radicales hidroxilos.

El estudio llevado a cabo por Winklhofer-Roob y colaboradores (1997), pone de manifiesto que una disminución de los valores plasmáticos de vitamina C va acompañada de un aumento del nivel plasmático de MDA y de la concentración de

TNF α en casos de FQ, lo que supone que la administración de vitamina C pudiera ser útil en estos procesos. Diversos autores han señalado que en FQ se aprecian valores bajos de β -carotenos e incluso con disminución de otros carotenos como criptoxantina, luteína y licopene.

Se han observado síndromes neurológicos de tipo degenerativo espinocerebelosa en pacientes con FQ y niveles de vitamina E indecibles, observando en estos pacientes alteraciones en la conducción nerviosa en el sentido de observar un aumento del período de latencia y una disminución del potencial de amplitud del nervio peroneo comparado con niños controles sin deficiencia en vitamina E.

Además, y también en la FQ, se observan que los valores de vitaminas E (potente antioxidante) dependen en parte del grado de malabsorción existente, de la suplementación o no que se este efectuando y de las etapas de la enfermedad, especialmente de las exacerbaciones en relación a infección y del grado de malnutrición existente. La deficiencia en vitamina E en el curso de la FQ esta ampliamente aceptada, considerándose obligada su administración conjuntamente con un alto contenido en grasas para favorecer una óptima absorción. Como el estrés oxidativo puede jugar un papel importante en la patogenia de FQ es conveniente que los tejidos alcancen una concentración suficiente de vitamina E actuando como antioxidante a nivel de membranas.

Teniendo en cuenta que una de las situaciones que conducen a la aparición de FQ es el daño oxidativo, la administración de melatonina en estos niños sería tremendamente interesante. Sin embargo, no solo desconocemos trabajos relacionados con este tema, sino que además en ningún estudio, se han medido niveles plasmáticos de melatonina durante estas patologías.

1.4.3.1.4 Enfermedad inflamatoria intestinal.

En la fase activa de la enfermedad de Crohn se han observado una disminución de la capacidad potencial de atrapamiento de radicales libres (TRAP), comprobándose una reducción plasmática de α y β carotenos y de criptoxantina en relación a niños sanos

Además, los valores de ubiquinona plasmática en los niños con esta enfermedad presentan un aumento de hasta un 35% las mismas en comparación con niños controles. Por tanto se podría apuntar la idea de que bajo el efecto de una situación de estrés oxidativo se estimula la producción de ubiquinona efectiva en el atrapamiento de los peroxininitros.

En 24 niños con enfermedad de Crohn y en 12 niños con colitis ulcerosa se hallaron valores bajos en la concentración de vitamina C así como aumento de los valores de glutatión peroxidasa y α -tocoferol en relación a niños sanos, indicándose en este estudio (Hoffenberg y cols., 1997) que en las enfermedades inflamatorias intestinales se producen alteraciones de las defensas antioxidantes. Tanto las lesiones tisulares como la disfunción que se produce en la enfermedad inflamatoria intestinal podrían desarrollarse por los mediadores solubles liberados por los fagocitos que se acumulan en los intersticios del intestino y del colón durante la fase activa de la enfermedad.

A través de exámenes por quimioluminiscencia de las zonas inflamadas del colón obtenidas tanto en el curso de intervención quirúrgica en niños como en colitis experimental llevadas a cabo en animales, se han observado que se producen grandes cantidades de especies de oxígeno reactivas (Keshavarzian y cols., 1992) y (Simmonds N.J. y cols., 1992). En biopsias de colón de niños enfermos con gran actividad de esta zona se han encontrado un aumento de la peroxidación lipídica (Grisham M. y cols., 1990). Además, en 96 casos de enfermedad inflamatoria intestinal estudiados en el Hospital de Niños de Boston, se han encontrado bajos niveles de vitamina A y E en la fase activa de la enfermedad en la infancia, la carencia en vitamina E es frecuente y existe una correlación positiva entre los valores de vitamina A y de vitamina E, siendo rara la hipovitaminosis E en ausencia de hipovitaminosis A (Bousvaros y cols., 1998).

La situación de desequilibrio creado en estos casos por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno dentro del tejido intestinal y del colón inflamado sugieren que una suplementación con antioxidantes puede ser útil en tratamiento. Por este motivo, Kazez y colaboradores (2000) ensayaron el efecto en ratas Wistar jóvenes con el intestino dañado por isquemia el efecto de la melatonina, observándose que tras el

tratamiento con dicha hormona, los niveles elevados de MDA, indicativos de lipoperoxidación, que aparecían en las ratas descendían significativamente, observando también, mediante estudios histopatológicos, que todos los trastornos encontrados en el intestino de las ratas eran consecuentes de la lipoperoxidación del tejido.

1.5 LA IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL TRIPTÓFANO.

1.5.1. TRIPTÓFANO COMO AMINOÁCIDO ESENCIAL.

Los aminoácidos son sustancias compuestas por carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno, caracterizados por contener un grupo ácido débil, llamado carboxilo (-COOH) y un grupo básico débil llamado amina (-NH₂). Dependiendo de que presenten algún grupo ácido o básico demás, se les clasifica como aminoácidos ácidos, básicos o neutros, existiendo también aminoácidos aromáticos o de cadena lineal según presenten estructura cíclica o lineal (Gómez y Llorca 2000).

Dichos aminoácidos constituyen las proteínas en el organismo uniéndose mediante enlaces peptídicos formados entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amina del otro liberándose una molécula de agua, formando así secuencias de aminoácidos que darán lugar a la gran diversidad de proteínas existentes (Guyton y Hall, 1997). Son necesarios 20 aminoácidos para construir los diversos tipos de proteínas implicadas en la reparación, mantenimiento, y crecimiento de los tejidos corporales. De todos los aminoácidos, 10 de ellos (tiroxina, glutamina, asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, serina, alanina, glicina y prolina) pueden ser sintetizados por nuestro propio organismo, considerándose por ello “no esenciales”. El resto de los aminoácidos que el organismo no es capaz de sintetizar (treonina, lisina, metionina, arginina, valina, fenilalanina, leucina, triptófano, isoleucina e histidina) se denominan “esenciales” y tiene que ser ingeridos en la dieta. Actualmente se ha propuesto una tercera categoría en la que se incluirían aquellos aminoácidos que son condicionalmente esenciales y que sería indispensable suministrarlos en la dieta en ciertos estados clínicos, como es el caso de la cisteína, tirosina y taurina que son requeridos en prematuros, posiblemente por una deficiencia de las enzimas

sintetizadoras de los mismos. Finalmente señalar a la arginina fundamental en procesos de desnutrición, infecciones, recuperación de lesiones y cirugía. Si falta uno sólo de los aminoácidos denominados esenciales no será posible sintetizar ninguna de las proteínas en las que sea requerido dicho aminoácido, dando lugar a diferentes tipos de desnutrición, según cual sea el aminoácido limitante.

Las necesidades diarias de aminoácidos son máximas en lactantes para ir disminuyendo progresivamente hasta la edad adulta, donde se estabiliza dependiendo del peso corporal del sujeto, a la vez que de la composición y digestibilidad de los ingredientes que la componen (Jansman, 2000). Por lo general las proteínas animales contienen todos los aminoácidos esenciales, mientras que las proteínas vegetales suelen tener déficit de alguno de estos aminoácidos, recomendándose una ingesta de ambos tipos de proteínas para lograr así una dieta equilibrada que contenga todos los aminoácidos esenciales.

La concentración normal de aminoácidos en sangre está entre los 35 y 65 mg/dl, esta concentración aumenta inmediatamente después de una comida, pero pocos minutos después estos aminoácidos son absorbidos por los enterocitos de las membranas celulares, y transportados activamente hacia el hígado, donde formarán las proteínas que posteriormente se distribuirán por todos los órganos. Además de formar proteínas, estos aminoácidos son transformados en piruvato, oxalacetato y α -cetoglutarato, actuando como intermediarios metabólicos, se utilizan también en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, síntesis de neurotransmisores, de hormonas no polipeptídicas y peptídicas y como proteínas transportadoras, el exceso de aminoácidos es eliminado por la orina (Linder, 1988). De forma contraria, puede ocurrir que la concentración plasmática de aminoácidos disminuya por debajo de sus valores normales, saliendo estos, mediante descomposición de las proteínas, de las células donde permanecían almacenados hasta reponer sus niveles en el plasma, manteniendo de esta forma, la concentración plasmática de cada tipo de aminoácido un valor relativamente constante.

Dentro de los aminoácidos anteriormente clasificados como “esenciales” se encuentra el que ahora nos ocupa, el triptófano (Figura IX). Este aminoácido,

clasificado también como no polar e hidrófobo, es imprescindible en la síntesis de proteínas, participando como promedio en un 1,1% de la composición de las proteínas. Además, es el principal precursor de algunos metabolitos tales como melatonina, serotonina, niacina y quimureina, que influyen sobre el comportamiento del organismo, percepción del dolor, estrés, periodo de sueño y estado de ánimo, así como en el consumo de comida, interviniendo también en la reducción del estrés oxidativo, y producción de radicales libres (Henry y Seve, 1999; Rodríguez y cols., 1999; 2001). El triptófano es utilizado como suplemento enriquecedor de leches infantiles (15 g Prot. / litro) en aquellos bebés que no toman leche materna, ya que se ha observado que la concentración de triptófano es muy alta en la circulación fetal, y además esta concentración es mayor en los primeros días de alimentación en la leche materna (Steinberg y cols., 1992), realizando en estas fases un importante papel en la regulación de los ciclos de sueño, en la maduración y desarrollo del cerebro. En los primeros momentos de la vida el triptófano va a ser fundamental ya que es en este periodo cuando el sistema nervioso central presenta su máxima sensibilidad (Heine, 1999), interviniendo además en el correcto funcionamiento del sistema inmune.

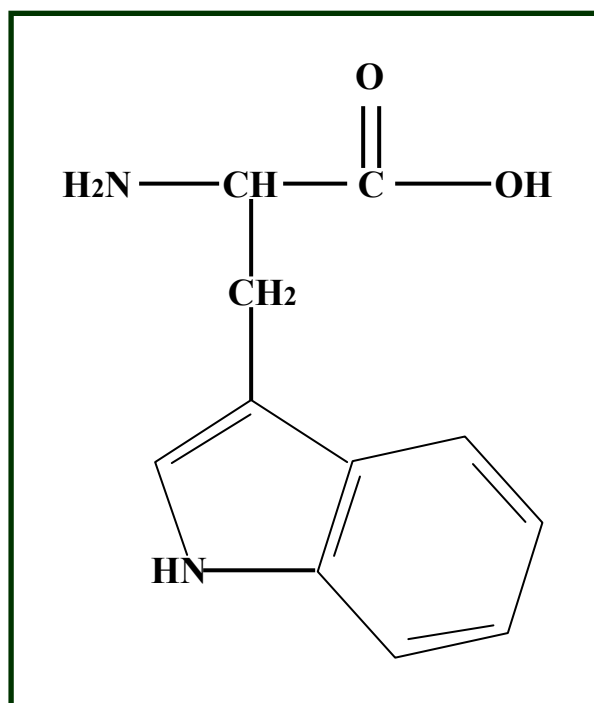


Figura IX. Estructura molecular del aminoácido L-Triptófano.

1.5.2. ALIMENTOS RICOS EN TRIPTÓFANO.

Debido a que el triptófano debe ser ingerido en la dieta, se presenta a continuación una lista de alimentos ricos en este aminoácido esencial según Krausse y Mahan (1998):

- Lácteos (leche, queso, yogurt, requesón).
- Huevos.
- Cereales (arroz, soja, trigo, cebada).
- Pescado (bacalao, gambas).
- Carnes (vacuno, pollo, porcino).
- Legumbres y hortalizas (judías, lentejas, garbanzos, lechuga, tomates).
- Frutos secos (almendras, nueces, cacahuets, dátiles).
- Plátanos.

A pesar de que el triptófano es un aminoácido que solamente se adquiere a través de la dieta y que además aporta numerosos beneficios, no podemos olvidar el dicho popular que dice: que todo en exceso es perjudicial, por lo tanto tenemos que tener en cuenta que las recomendaciones de administración diaria son 17 mg/kg de peso en niños lactantes y 3 mg/kg de peso en adultos. Se estima que se deberían ingerir del orden de 25g de este aminoácido diariamente, considerando como la cantidad más óptima la de 50g diarios. Cantidades superiores a esta pueden resultar perjudiciales para el organismo, pudiendo producir peroxidación lipídica (Aviram y cols., 1991), daños en algunos tejidos, disminución de proteínas antioxidantes y aumento de ácidos grasos poliinsaturados con la consiguiente acumulación de colesterol (Mokaky y cols., 1990).

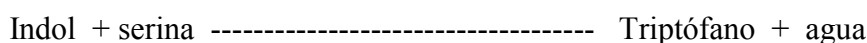
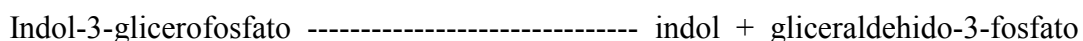
Una vez que el triptófano es ingerido en la dieta, este es absorbido de las paredes del intestino pasando a las membranas celulares, quedando una pequeña cantidad del mismo en forma libre y el resto (80-90%) será transportado unido a la albúmina a través de la sangre hacia el cerebro, transporte que puede verse alterado por la competencia que puede existir con otros aminoácidos libres neutros de alto peso molecular y aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) así como la fenilalanina y la tiroxina (Steinberg, 1992; Jansman, 2000), que se unen a las mismas células

transportadoras, la bajada en la absorción de triptófano tras competencia en su transporte con otros aminoácidos puede producirse por la ingestión de una dieta rica en proteínas que dará lugar posteriormente a estos aminoácidos libres. Para que esto no se produzca sería recomendable ingerir alimentos que sean más ricos en carbohidratos que en proteínas, lo cual producirá la liberación de insulina, que ayudaría además a que el triptófano pase de la sangre al cerebro y utilizarse para la posterior síntesis de sus metabolitos (Stiteler, 1984; Peris-Gisbert y cols., 1998).

Un exceso de triptófano produce un aumento en la concentración de este aminoácido en el sistema nervioso central, lo que a su vez eleva los niveles de serotonina cerebrales. Las necesidades de triptófano dependen de la cantidad en BCAA de la dieta, ya que su efecto sobre el consumo puede reducirse cuando el nivel de BCAA sea alto. Esto podría estar relacionado con el hecho de que un déficit de triptófano en el cerebro, ligado a un exceso de BCAA en la dieta, resulta en una menor concentración de serotonina en el cerebro y un mayor consumo de alimento (Henry y Seve, 1993; Jansman, 2000).

1.5.3. METABOLISMO DEL TRIPTÓFANO.

El metabolismo del Triptófano es totalmente distinto al de cualquier otro metabolito. El precursor principal de este compuesto es el ácido antanílico o antranilato, y después de una serie de reacciones químicas, el paso final se caracteriza por la actuación de la enzima triptófano sintetasa sobre la unión de indol-3-glicerofosfato más serina para dar lugar al gliceraldehido-3-fosfato y triptófano. Esta reacción se lleva a cabo en dos pasos, con el indol como intermediario unido al sitio activo de la enzima (Gómez y Llorca., 2000).



Como se representa en la figura X después de su síntesis este aminoácido es transportado al hígado, donde se llevará a cabo su degradación mediante la enzima triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO) o enzimas extrahepáticas, indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), y la consiguiente formación de quimureina, ácido nicotínico y otros subproductos que quedan almacenados (Cooper y cols., 1991). La reacción inicial es una oxigenación que provoca la apertura del anillo de cinco átomos del núcleo indólico para formar formilquinurenina por medio de la acción de la enzima triptófano oxigenasa. Posteriormente la hidroxiquinurenina es hidrolizada por la quinurenina formamidasa que actúa sobre varias formamidas aromáticas y aparece la quinurenina, que es un punto de ramificación.

Por un lado, se transforma en 3-hidroxiquinurenina que, a su vez, se ramifica, primero por medio de la acción de quinurenasa produce 3-hidroxiantranilato, que después de sucesivas reacciones sirve de base para algunos productos importantes como el quinonilato, picolinato, y glutarato. Por transaminación se origina el ácido xanturénico en segundo lugar.

Por otro lado, a través de la acción de una oxigenasa, al separarse la mayor parte de la cadena lateral se forma la alanina. En la última ramificación, por transaminación se elimina el grupo α -amino apareciendo el quinurenato, un compuesto aromático estable.

La contribución del triptófano al metabolismo energético es doble, por una parte es cetogénico, puesto que forma acetil coenzima A (Acetil CoA); y por otra parte es glucogénico ya que produce alanina (Gómez y Llorca, 2000).

El metabolismo del triptófano es complejo y tiene muchos procesos, requiriendo de una cantidad adecuada de biopterina, vitamina B6 y magnesio. La vitamina B6 está involucrada en la conversión de este aminoácido en serotonina y en el metabolismo de otros metabolitos, por ejemplo la quinurenina.

Recientemente se ha observado que la degradación pirrolítica del triptófano ha dado origen a la formación de compuestos mutagénicos potentes, tales como 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido(4,3b)-indol y 3-amino-1-metil-5H-pirido(4,3b)-indol (Shibamoto,1982), además de ácido quinolínico y 3-OH-quimureina peden causar daño celular, apoptosis y muerte neural (Okuda y cols., 1998; Morani, 1999). Así mismo dietas con exceso de triptófano producen anormalidades en su metabolismo, asociadas con procesos de fibrosis e inflamación, síndrome carciniode, y síndrome de esclerosis (Bruce y cols., 1990; Gross y cols., 1999).

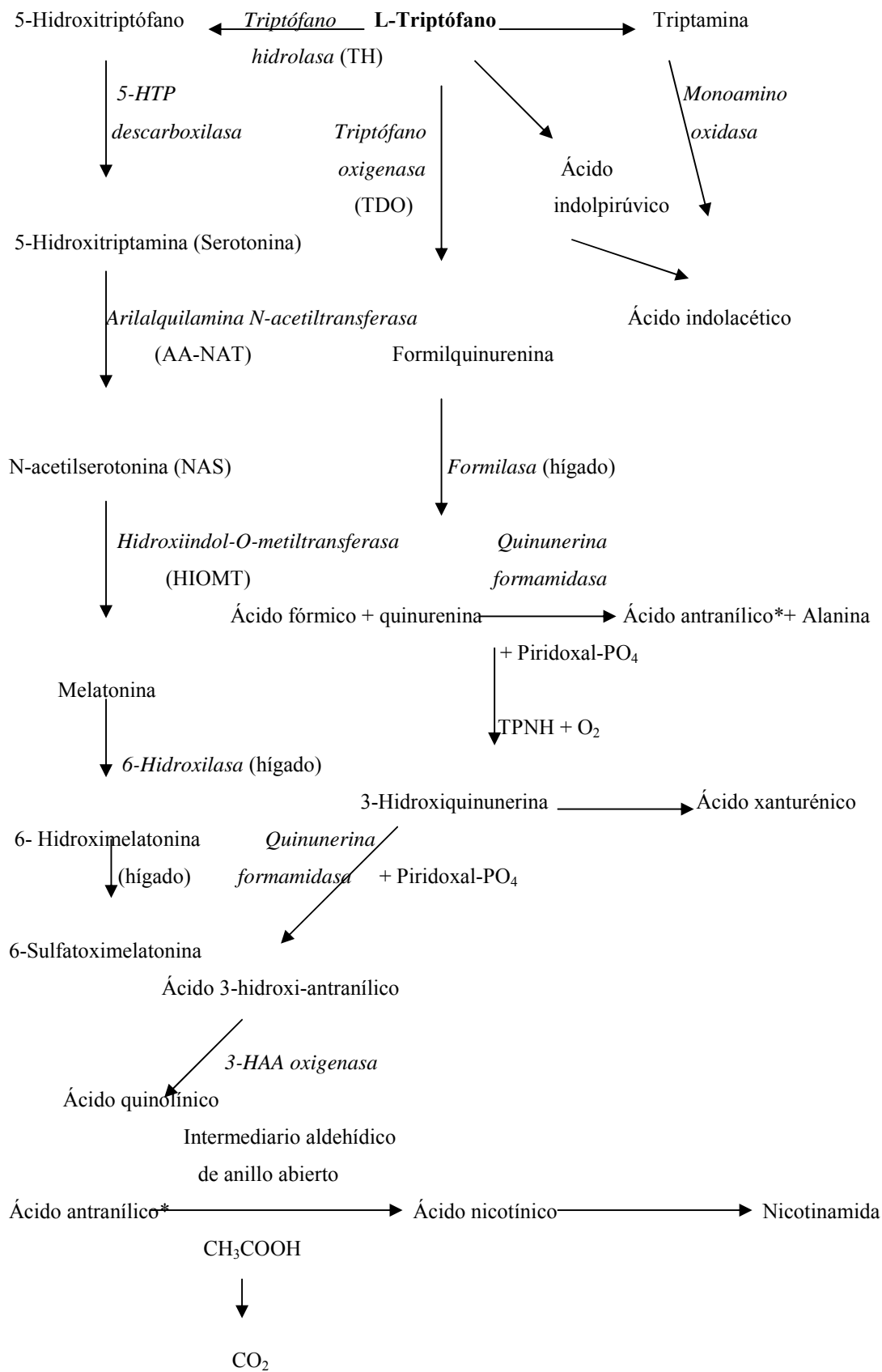


Figura X. Metabolismo endógeno del triptófano.

1.5.4 ACCIÓN DEL TRIPTÓFANO SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Aunque no son prolíficos los estudios que hasta la fecha relacionan directamente la acción del aminoácido triptófano sobre el sistema inmune, existen algunas evidencias que así lo confirman. Principalmente esta interacción se ha estudiado en dos casos concretos, embarazo y depresión.

El triptófano es un compuesto imprescindible para la supervivencia de los linfocitos T, componentes del sistema inmune. Estos linfocitos T pueden atacar al feto durante el embarazo y producir la interrupción de este fenómeno, este hecho se produce porque el sistema inmune de la madre reconoce al feto como extraño y la ataca a través de estos linfocitos y demás componente del sistema inmune. A principios del año 1998, Munn y colaboradores descubrieron un mecanismo para la supresión de esta respuesta inmune y permitir con ello la viabilidad del feto, observando que las células de la placenta producían una proteína, la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), encargada de degradar el aminoácido triptófano, imprescindible para los linfocitos y transformarlo en quinurenina. La activación de la enzima IDO por el INF- γ en macrófagos inhibe el grado de sensibilidad o respuesta de los linfocitos T hacia antígenos, así su activación en trofoblastos es crucial para establecer un buen grado de tolerancia para el feto durante el embarazo, ya que cuando se bloquea la actividad de la enzima IDO en ratas de laboratorio preñadas, se produce rechazo al feto, no siendo capaces de continuar con el estado de preñez (Munn, 1998; Mellor, 2001). Por tanto, la presencia de esta enzima en concentraciones óptimas, así como los niveles de la relación quinurenina/triptófano, son imprescindibles para el correcto desarrollo del embarazo y la adecuada inmunotolerancia del feto (Schröcksnadel y cols., 2002).

Debido a que el triptófano es metabolizado hacia quinurenina por la acción de esta enzima, se ha observado que durante el embarazo aparece una disminución en los niveles de este aminoácido y un aumento tanto en los niveles de quinurenina como en los de quinurenina/triptófano, incrementándose a su vez, la actividad inmune de neopterinas y del receptor del α -FNT, existiendo por lo tanto una correlación positiva entre los niveles de dichos parámetros de actividad inmune y la relación quinurenina/triptófano. Tras el parto los niveles de neopterinas y receptor de α -FNT

vuelven a sus valores basales, momento en el que aumenta la concentración de triptófano, permaneciendo elevados los niveles de quinurenina y quinurenina/triptófano (Widner y cols., 2000).

Se ha observado que en cultivos de monocitos derivados de macrófagos, donde se encuentran las enzimas que transforman el triptófano en quinurenina (Heyes y cols., 1992), se produce un incremento en algunos componentes del sistema inmune tales como INF- γ , FNT- α , lipopolisacáridos (LPS) y citocinas pro-inflamatorias, a la vez que va disminuyendo la concentración de triptófano en plasma y aumentando la de quinurenina, proponiéndose que son estos factores los que actúan sobre la enzima IDO activándola y produciendo la degradación de triptófano hacia quinurenina (Chiaurugi y cols., 2001). El mecanismo por el cual el INF- γ , LPS y citocinas inducen la modulación sobre el metabolismo del triptófano en monocitos, es todavía desconocido, sugiriendo que este metabolismo, no sólo es regulado por los parámetros anteriormente citados, sino que también es regulado por la IL-4 e IL-10, que inhiben la transformación de triptófano en quinurenina, haciendo esto pensar que los metabolitos de la quinurenina juegan un papel significativo en la función de los macrófagos (Heyes y cols., 1992), ya que del metabolismo de dicha sustancia se liberan cantidades importantes de ácido quinolínico y 3-OH-quinurenina, que pueden producir daños celulares, apoptosis, muerte neural y radicales libres (Okuda y cols., 1998). Este daño puede ser reducido o reparado usando un antagonista del receptor NMDA y PARP (Wetkins y cols., 1990; Stuto y cols., 1993).

Numerosos estudios demuestran que la concentración del aminoácido triptófano disminuye en pacientes deprimidos con respecto a personas normales (Yathan y cols., 2000), produciéndose una disminución de los niveles de serotonina, neurotransmisor sintetizado a partir de este aminoácido y que también está directamente implicado en la depresión (Maes y cols., 1997). Cuando se produce un trastorno depresivo, este va acompañado de una respuesta del sistema inmune inflamatorio (citocinas, interleucinas, etc.) observándose una relación inversamente proporcional entre estos indicadores del sistema inmune y la concentración de triptófano en plasma (Cai Song y cols., 1998). Durante el tiempo que persiste este proceso, se observa un incremento en diversos componentes del sistema inmune, como son, IL-6, IL-8, y un antagonista del receptor

de la IL-1(IL-1RA), existiendo de esta manera una correlación negativa entre la concentración de triptófano y la relación triptófano/BCAA y los niveles de IL-8, IL-6 y IL-1RA, número de leucocitos y número de la relación células CD4⁺/CD8⁺ (Maes y cols., 1993; 1996; 1997).

Recientemente, se ha observado que las personas que presentan alteraciones del sueño, al igual que ocurría en pacientes depresivos, existe una disminución de los niveles de triptófano en plasma respecto a personas normales, además de existir también un aumento de IL-6 e IL-8 (Maes y cols., 1997; Cai Song y cols., 1998), así como una disminución en la IL-2 (Uthgenannt y cols., 1995). Si se produce una interrupción del sueño de 5 horas durante el periodo nocturno, se elevan los niveles de IL-1 e IL-2, cuando existe ya un exceso de somnolencia, se incrementan también la IL-6 y α -FNT (Vgontzas y cols., 1997), aumentando con ello el número de monocitos, leucocitos y neutrófilos (Dinges y cols., 1994).

1.5.5 ACCIÓN TERAPEÚTICA DEL TRIPTÓFANO.

El aminoácido que ahora nos ocupa ha ido adquiriendo gran interés a lo largo de los años debido a su implicación en la mejora de numerosas enfermedades, pero al igual que es beneficioso para diversas patologías, alteraciones en su metabolismo pueden generar también algunos trastornos en el organismo, debidos sobre todo a un déficit de niacina. A continuación exponemos brevemente su papel en el tratamiento de diversos trastornos del organismo:

- **Triptófano y estados depresivos.** Este es sin duda el mayor y más conocido empleo del triptófano en el tratamiento de esta enfermedad. Son muchas las investigaciones que corroboran su efecto beneficioso frente a esta patología, ya que se ha visto que pacientes con depresión tienen menores niveles de este aminoácido en plasma que personas normales. La administración intravenosa de triptófano se ha usado durante décadas para analizar la función de la serotonina en pacientes deprimidos, antes y durante el tratamiento antidepresivo (Price y cols., 1990; Yathan y Steiner, 1993). Cuando a pacientes con depresión se les disminuía la cantidad de triptófano, se producía una recaída de sus síntomas, produciéndose déficit en la actividad serotoninérgica y una

disminución en su recaptación (Delgado y cols., 1990), pero no se producían efectos inmediatos sobre el humor (Delgado y cols., 1994). Sin embargo, cuando se les administraba de forma intravenosa este aminoácido, se producía una disminución de los síntomas depresivos y una mayor respuesta del cortisol, disminuyendo con ello el nerviosismo y la irritabilidad.

Los niveles bajos de triptófano circulante también se han relacionado con el suicidio, ya que varios estudios han demostrado niveles bajos de serotonina en el líquido cefalorraquídeo en pacientes suicidas.

- **Triptófano y dolor.** Se ha iniciado un nuevo uso de este aminoácido en la reducción de ciertas variedades de dolor tales como, dolor de cabeza, dolor dental, y dolor asociado con el cáncer, incluso podría mejorar el rendimiento y aumentar la tolerancia al dolor durante una actividad física intensa (Segura y Ventura, 1989). La base orgánica para este efecto del triptófano sobre el dolor yace en el área del cerebro llamada *nucleus raphus magnus*, un centro primario inhibidor del dolor. Este núcleo es la estructura serotoninérgica principal del cerebro, de esta manera depende de la serotonina y de su precursor el triptófano para su óptimo funcionamiento (Gómez, 2000)

- **Triptófano e insomnio.** Desde hace muchos años se descubrió que el tiempo para conciliar el sueño se puede reducir en forma importante administrando en forma oral triptófano. La reducción en la latencia para dormir es un hecho importante a dosis de un gramo de triptófano. Según estudios realizados por Dinges y colaboradores en 1994, incluso pacientes con insomnio se quedan dormidos mas fácilmente, después de una sola dosis de triptófano.

- **Triptófano, hormona del crecimiento y prolactina.** La deficiencia de vitamina B₆ y de triptófano pueden llevarnos a una deficiencia de hormona del crecimiento y posiblemente a una deficiencia de prolactina. Los complementos de triptófano son útiles como tratamiento en ambas deficiencias. El efecto de la liberación de prolactina por el triptófano también puede explicar algunas de sus propiedades antipsicóticas (Gómez, 2000).

- **Triptófano y lesiones gástricas.** El triptófano, a concentraciones de entre 25-200 mg/Kg de peso, y la hormona melatonina sintetizada a partir de este, ayudan a prevenir las lesiones gástricas causadas por el estrés e isquemia (Brzozoswsky y cols., 1997). Este efecto protector conlleva una disminución de la presión sanguínea e hipertensión, lo cual influye en el flujo de sangre y provoca un aumento en la producción de gastrina, reduciendo así las lesiones gástricas y protegiendo con ello la mucosa, ejerciendo a su vez, tanto la melatonina como el triptófano, un papel como secuestrador de los radicales libres producidos por el estrés (Heine, 1999; Reiter y cols., 1999).

- **Triptófano y reducción del apetito.** La administración de triptófano se ha asociado con una disminución del apetito, ya que los complementos de triptófano pueden inhibir la gluconeogénesis, elevar el azúcar sanguíneo, aumentar el aporte de glucosa al cerebro y disminuir el apetito. Por ello el triptófano puede ser utilizado, solo o junto a la vitamina B₆, en enfermos bulímicos, ya que disminuye la apetencia por los alimentos en general y por los hidratos de carbono en particular, reduciendo de manera significativa la ingestión convulsiva de alimentos en estos pacientes (Heine, 1999; Reiter y cols., 1999).

1.5.5.1 Patologías asociadas a la nutrición del triptófano.

Existen enfermedades relacionadas con alteraciones nutricionales del triptófano, ya sea por falta de este o por exceso. La ataxia cerebelosa, síndrome carcinoide, pelagra, y anorexia son enfermedades que se deben a una disminución de los niveles de triptófano a la vez que de niacina, sintetizada a partir de este aminoácido. Mientras que un exceso de triptófano contribuye al desarrollo de enfermedades tales como cirrosis, coma hepático y encefalopatía hepática. Además dosis elevadas de triptófano son perjudiciales en personas alérgicas, personas con desordenes autoinmunes, y mujeres embarazadas, ya que provoca una sobreestimulación del sistema inmune. Se ha observado igualmente que el exceso de triptófano produce oxidación lipídica y aumento de la esterificación del colesterol por macrófagos, peroxidación asociada a LDL y disminución de proteínas antioxidantes o ácidos grasos poliinsaturados (Aviran, Cogan, y Mokady; 1991).

Aunque normalmente el triptófano es utilizado como fármaco frente algunas patologías, su uso no adecuado, así como alteraciones en su metabolismo pueden causar el efecto contrario, es decir, enfermedad. Quizás de todas ellas la más conocida y que mayor controversia ha tenido sea el “*Síndrome de Mialgia Eosinofílica*”. Esta enfermedad apareció en Estados Unidos en 1989, cuando una compañía japonesa que producía este aminoácido de manera natural, usando para ello cultivos de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, decidió manipular esta bacteria genéticamente para producir así dicho aminoácido en grandes cantidades, eliminando a su vez varios procesos de filtración durante su procesamiento (Duffi, 1992). El triptófano era consumido como suplemento alimenticio por atletas para aumentar la masa muscular, poco tiempo después de su venta empezaron a aparecer diferentes patologías en estos atletas, llegando a causar un total de 37 muertos y 1500 personas discapacitadas, estos problemas surgieron porque la bacteria modificada genéticamente, además de producir al aminoácido triptófano deseado producía una potente toxina (Sidrasnsky y cols., 1994), que no fue detectada al eliminar los procesos de filtración, y que fue la responsable de este fenómeno afectando al sistema inmune y neurológico, causando defectos cognitivos, problemas emocionales, parálisis, problemas cardiacos, reumatismo y artritis (Nayeno y cols., 1994; Nordlee y cols., 1996).

2. OBJETIVOS.

Para el estudio del efecto del triptófano y la melatonina sobre los ritmos de actividad / inactividad en lactantes y en animales de experimentación, así como la fagocitosis y metabolismo oxidativo en células fagocíticas hemos abordado los siguientes objetivos:

- 1.- Evaluación de la función fagocítica y metabolismo oxidativo de heterófilos sanguíneos (indicadores de respuesta inmune inespecífica y estrés oxidativo dentro de los mecanismos bactericidas oxígeno-dependiente). Teniendo en cuenta la íntima conexión del sueño-melatonina-sistema inmune, en este primer objetivo se valorará si la administración de triptófano, precursor de dicha hormona pineal, produce variaciones en la respuesta inmune. El estudio se llevará en *Streptopelia roseogrisea* de menos de un año de edad (animales de actividad diurna y ritmos de actividad afines a la especie humana). Se utilizarán como células fagocíticas heterófilos sanguíneos, valorándose la función fagocítica (a través del Índice de fagocitosis, el Porcentaje fagocítico y la Eficiencia Fagocítica) y el metabolismo oxidativo (a través de los niveles de anión superóxido).

- 2.- Efectos, en animales experimentales, de la administración de triptófano sobre los ritmos de actividad-inactividad.

El aminoácido triptófano determina cambios rápidos en el Sistema Nervioso Central. De hecho, a las dos horas después de su ingesta, ya se observa incremento en los niveles de 5-hidroxitriptamina cerebral que afecta al comportamiento. Teniendo en cuenta que este aminoácido es precursor de la hormona melatonina y conociendo la íntima conexión de la misma con los ritmos de sueño/vigilia, en este primer objetivo se analizará si a través de la ingesta de triptófano en animales diurnos, se puede influir sobre los ritmos de actividad / inactividad, así como sobre la temperatura y peso corporal, parámetros ambos correlacionados directamente con los ritmos sueño/vigilia.

3.- Análisis del contenido en triptófano de la leche materna y sus oscilaciones circadianas frente a 6-sulfatoximelatonina en orina materna y del lactante.

Aunque es sabido que la leche humana presenta mayor concentración de triptófano que las fórmulas adaptadas para la lactancia artificial, y a pesar de que el triptófano es precursor de la melatonina (hormona reguladora de los ritmos circadianos), no hemos encontrado referencias a la presencia o ausencia de oscilaciones circadianas en su concentración en este fluido. En consecuencia, el tercer objetivo será medir en las madres los parámetros cronobiológicos del triptófano en la leche; y en la orina de las madres y de sus bebés las concentraciones circadianas de 6-sulfatoximelatonina, metabolito de excreción de la melatonina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 MATERIALES.

3.1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los experimentos fueron realizados en tórtolas de menos de un año, “tórtola turca” *Streptopelia roseogrisea*. Este animal posee un ritmo de actividad /inactividad similar al de los humanos, manifestándose su mayor actividad por el día y el descanso durante la noche.

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España) en concordancia con la Guía del Instituto Nacional de Salud para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

3.1.2 MADRES Y NIÑOS LACTANTES.

A través de los Servicios de Pediatría de la comunidad autónoma de Extremadura y diferentes Clínicas privadas, se seleccionaron catorce niños sanos entre tres y seis meses de edad, que mantenían exclusivamente lactancia materna. A si mismo los análisis eran completados con el estudio de las madres de los niños lactantes. Debemos indicar que los padres o tutores fueron totalmente informados del proyecto, dando su consentimiento por escrito para nuestro estudio científico.

Todas las determinaciones que se llevaron a cabo en los niños lactantes fueron aprobadas por el Comité Ético de la Universidad Extremadura (Badajoz, España).

3.1.3 SOLUCIONES Y MEDIOS.

-Agua.

El agua utilizada era destilada y esterilizada en autoclave a 120°C y 1,5 atmósferas de presión durante 30 minutos.

-Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS).

La solución salina fisiológica utilizada tiene la siguiente composición por litro:

Cloruro sódico	7,20 g
Fosfato monopotásico	0,44 g
Fosfato disódico	1,54 g

Una vez disueltas las sales, la solución se envasó en frascos de 100 ml previamente esterilizados para su conservación en nevera a una temperatura de 4°C hasta su posterior utilización.

-Medio Hank's.

Se preparó disolviendo en un litro de agua destilada:

Glucosa	1 g.
Cloruro cálcico	0,14 g.
Cloruro magnésico	0,1 g.
Cloruro potásico	0,4 g.
Cloruro sodico	8 g.
Fosfato disódico	0,35 g.
Fosfato magnésico	0,1 g.
Fosfato monopotásico	0,06 g.
R rojo fenol	0,02 g.

-Medios separadores (Histopaque).

Para el aislamiento de los heterófilos de sangre periférica se utilizaron dos medios de distinta densidad: Histopaque de 1.077 y de 1.119 (Sigma), envasados y conservados a 4°C en un lugar oscuro hasta su utilización.

-Nitroazul de Tetrazolio (NBT).

Se presenta como un compuesto liofilizado en viales protegidos de la luz, conservándose a la temperatura de 4°C (Sigma). En el momento de su uso se reconstituye con PBS a concentración de 1 mg/ml.

-Partículas de Látex.

Las partículas de látex utilizadas para el estudio de la fagocitosis y el NBT fueron de un tamaño de $1,07 \pm 0,0082 \mu\text{m}$ de diámetro (Sigma) diluidas al 1% en PBS estéril. Fueron conservadas en la nevera a 4°C hasta el momento de su utilización.

-Material de Tinción.

Para la observación y conteo de las células sanguíneas y las determinaciones de las fórmulas leucocitarias, se procedió a su tinción mediante Wright modificado (Diff-Quick de Dade) previa fijación en alcohol metílico durante 5 minutos.

3.1.4 REACTIVOS.

- Ácido bórico (Panreac).
- Ácido clorhídrico (Panreac).
- Ácido ortofosfórico (Panreac).
- Agua destilada.
- Alcohol etílico (Panreac).
- Azul de metileno (Panreac).
- Cloruro cálcico (Panreac).
- Cloruro magnésico (Panreac).
- Cloruro potásico (Panreac).
- Cloruro sódico (Panreac).
- Detergente neutro multiusos (Lupeba).
- Dietil éter estabilizado con etanol (Panreac).
- Dic-Quick (DADE).

Dioxán (Panreac).
Eosina (QCA).
Fosfato disódico (Panreac).
Fosfato magnésico (Panreac).
Fosfato monopotásico (Panreac).
Glucosa (Panreac).
Hematoxilina (QCA).
Heparina de litio (Analema).

3.1.5 MATERIAL DE LABORATORIO.

Agujas.
Algodón.
Diverso material de vidrio y plástico (tubos, placas, pipetas, portas, cubre, matraces, etc.) perfectamente limpio y esterilizado.
Tubos Eppendorf.
Filtros Millex 0,22 µm (Millipore).
Gradillas.
Guantes de látex.
Hemocitómetro de Neubauer.
Jeringas estériles de un solo uso.
Parafilm.
Pipetas automáticas de 50, 200, 1000 µl (Biohit).
Pipetas Pasteur.
Placas MIF (Sterilin creiner labortechnic).
Placas Petri (TLC).
Tubo con gel separador de suero (Tapval).

3.1.6 APARATOS.

Agitador de balanceo (Selecta).
Agitador de tubos (Heidolph tipo reax 1).
Autoclave (P-Selecta Autoester mod. 437-P).
Analizador Automático de Inmunodiagnóstico Labotech. (Biodata).
Balanza de precisión (Pacisa mod. 1602).
Baño con agitación (P-Selecta mod. S-549).
Cabina de flujo laminar con ultravioleta (Cruma).
Centrífuga (P-Selecta mod. S-240).
Centrífuga (P-Selecta mod. S-549).
Centrífuga refrigerada (Kubota mod. 5800).
Congelador hasta -30°C (Fagor).
Espectrofotómetro (UV-120-01, Shimadzu).
Estufa de cultivo (P-Selecta incubador CO_2).
Microscopio de contraste de fases (Iroscope mod. U-BH).
Refrigerador (Corberó).
Termómetro clínico.
Ordenador Intel Pentium III
Ordenador Intel Inside Pentium IV.

3.2 MÉTODOS.

3.2.1 MÉTODOS EN LOS ENSAYOS CON ANIMALES.

3.2.1.1 Diseño experimental.

Las aves se mantuvieron con comida y agua “*ad libitum*” a una temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en una habitación de 4 metros de largo, 2 metros de ancho y 2 metros de alto, ventilada de forma indirecta, estando expuestas a periodos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (de 08:00 h a 20:00 h y de 20:00 h a 08:00 h respectivamente) mediante luz artificial de 3000 lux. Cada una de la aves se encontraba en jaulas individuales fabricadas de metacrilato transparente ($25 \times 25 \text{ cm}^2$), las cuales llevaban adaptados un

actímetro que consiste en dos emisores y dos receptores de infra-rojos situados de forma perpendicular (Figura XI). Todos los ensayos *in vitro* fueron realizados por duplicado introduciendo un control con metil-celulosa, libre del aminoácido.

3.2.1.2 Administración del triptófano.

El aminoácido precursor de la hormona melatonina, triptófano fue administrado de forma oral mediante cápsulas en dosis 125 y 300 mg L-triptófano (Sigma)/kg de peso, (Huether G. y cols., 1992, Bakalian M.J. y cols., 1992). Se siguió dos protocolos diferentes, uno antes de iniciarse el fotoperiodo de oscuridad (19:00 h) y otro después de iniciarse el fotoperiodo de luz (09:00h). Los animales controles recibieron cápsulas que contenían únicamente el excipiente: metilcelulosa (Sigma).

3.2.1.3 Método para la determinación de actividad en animales.

3.2.1.3.1 Dispositivos empleados para la detección de la actividad en animales de laboratorio.

Para cuantificar los ritmos de actividad-reposo, se instalaron, en las jaulas transparentes de las aves, un sistema de detección de actividad consistente en dos emisores de haces infrarrojos (leds TSUS3400) perpendiculares entre sí y enfrentados a dos receptores (BPW14C) que están sintonizados para responder únicamente a la frecuencia de los emisores (4866 Hz), evitando, de esta forma, posibles interferencias de otras fuentes de radiación (Figura XI).

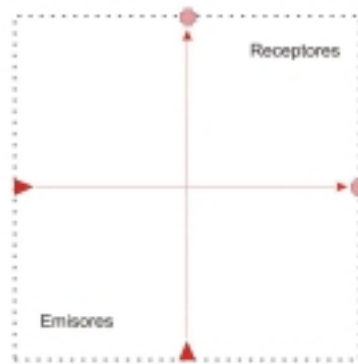


Figura XI. Los emisores dirigen sus haces, perpendiculares entre sí, hacia los receptores con los que están enfrentados. De esta forma se asegura cubrir todo el campo en el que se mueve el animal.

Los haces se activan, a través del receptor, una señal TTL de 5V, conmutando a 0V si uno o ambos haces son interrumpidos dependiendo de la posición del jumper J1 que configura el circuito (Figura XII).

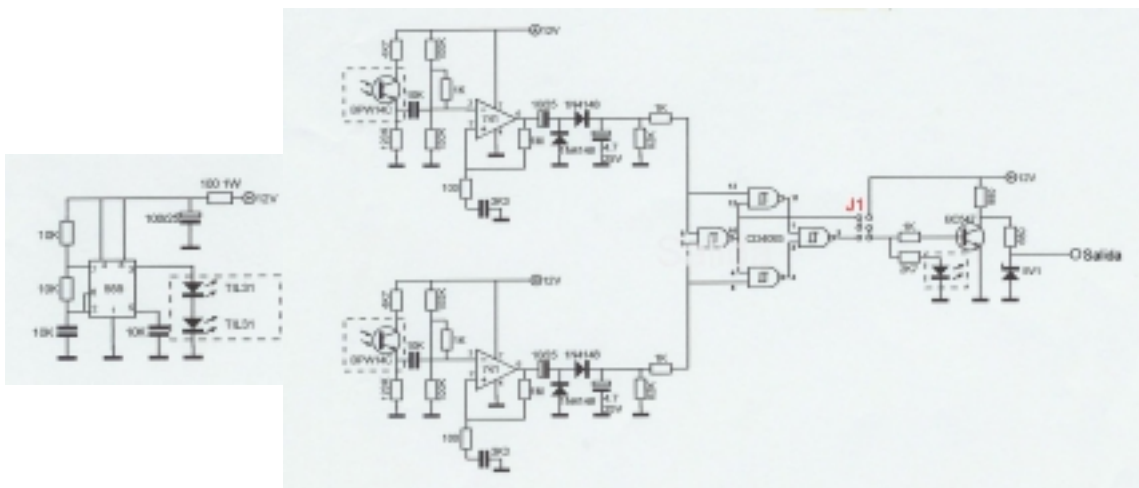


Figura XII. Los emisores son los encargados de activar, a través de los receptores, una señal TTL medida a la salida del circuito. Cuando los receptores reciben el haz de radiación infrarroja, la salida registra una señal de 5V. Si no es así, es decir, si el haz es interrumpido, la salida será 0V.

De esta forma, se pueden utilizar tres protocolos de detección, que se corresponden con las puertas lógicas XOR (configuración empleada en la que se produce un cambio de estado cuando se interrumpe un solo haz), OR (se produce un cambio de estado cuando se interrumpe al menos un haz) y AND (se produce un cambio de estado cuando se interrumpen los dos haces. Figura XIII).

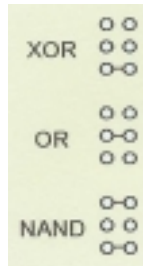


Figura XIII. Para configurar el modo de detección tan solo se ha de situar el jumper en el lugar deseado, fijando, de esta forma, una de las tres puertas lógicas.

Considerando que la tórtola se mueve dentro de la jaula interrumpiendo los haces de infrarrojos, la actividad de la misma fue medida contabilizando el número de veces que se generaba un pulso cuando el estado, o señal de voltaje a la salida, conmutaba de 0 a 5V (Figura XIV).



Figura XIV. Se construyeron jaulas especiales de metracrilato que descansaban sobre un soporte en el que se incorpora el sistema de sensores para la detección de la actividad, es decir, el movimiento de la tórtola. Los emisores y sus correspondientes receptores están situados de forma que aseguran cubrir todo el campo de movilidad del animal (Diez-Noguera y cols., 2004).

En total se disponen de 10 jaulas cuyos actímetros funcionan con la misma fuente de alimentación, de 12V, unidos a una placa que está conectada a su vez, mediante una cinta de 26 vías, a un convertidor analógico digital. Así, la señal de salida es adquirida con la tarjeta SmartLab 8255/8253 instalada en un PC con procesador Pentium IV y sistema operativo Windows 98. Además se han conectado al sistema un fotómetro y un termómetro para validar las condiciones en las que se desarrollan los experimentos (Figura XV).

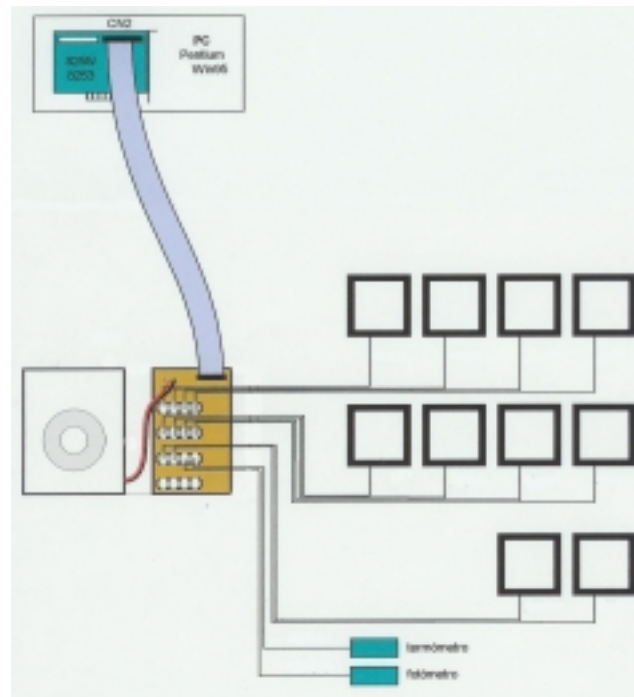


Figura XV. Los 10 actímetros de las jaulas se conectan a una placa para ser alimentada con una tensión de 12 V. Además, se conectan a la misma placa una termorresistencia y una fotorresistencia que permiten tener también un registro de las condiciones térmicas y lumínicas en las que se desarrollan los experimentos. Para adquirir estos datos, la placa se conecta con una cinta de 25 vías a una tarjeta SmartLab 8255/8253 instalada en un PC Pentium IV con Windows 98.

El programa informático “Das 16” (Díez-Noguera y cols., *Current Biology*. 2004) permite salvaguardar, la información detectada por los actímetros en archivos ASCII que posteriormente son analizados con la hoja de cálculo Excel (Office 2000, USA).

3.2.1.3.2 Programa “Das 16” empleado para la adquisición de la actividad.

Este programa está diseñado específicamente para la medida de actividad simultánea de 22 animales, temperatura e intensidad lumínica. Y está escrito para tarjeta de adquisición SMARTLAB. En la pantalla se observa el cambio de actividad por canal en tiempo real, registrándose mediante valores numéricos. Además en la misma pantalla se representa mediante barras de color dicha actividad en función del valor numérico. Este muestreo se realiza en intervalos seleccionados por el usuario y el caso de nuestro

ensayo es de 40 milisegundos. Y el intervalo de grabación es de quince o cinco minutos. Puesto que el tiempo de ensayo que se realiza ocupa diferentes días seleccionando el día de inicio así como la hora, terminado la adquisición cuando damos por concluido el final del experimento, cerrando el registro. Los registros se almacenan en un fichero escrito en formato texto que puede ser abierto con cualquier editor e importado desde una hoja de cálculo.

3.2.1.3.3 Análisis de datos adquiridos.

Una vez generados y archivados los pulsos de actividad, que fueron adquiridos por el programa “Das 16” cada 5 minutos, estos son importados a la hoja de cálculo, en dónde aparecerán tabulados y separados por canales. Cada canal, en total diez, corresponderá a un animal, más los correspondientes a los controles de temperatura e iluminación.

El primer paso es separar, para canal, los datos agrupados por ciclos de 24 horas. Esto se realiza observando el control de iluminación que señala los periodos de luz y oscuridad. En segundo lugar se hace la media de los canales agrupados por días, evitando de esta forma valores dispersos que pudieran deberse a comportamientos irregulares de algún animal. Por último se representa gráficamente el número de pulsos frente al tiempo (Figura XVI).

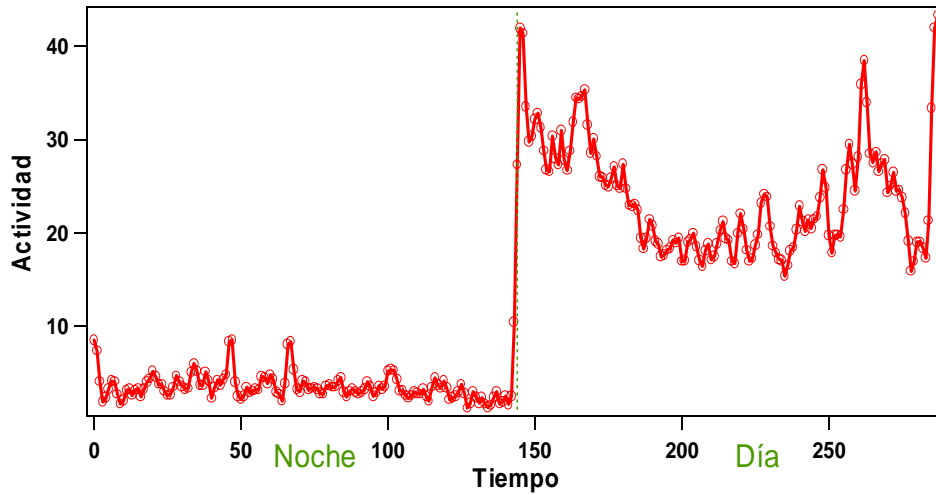


Figura XVI. Representación del número de pulsos de actividad acumulados cada cinco minutos. Para simplificar la descripción del método se presentan únicamente los datos correspondientes a un canal.

Como podemos apreciar en la figura XVII cuando se presentan de forma conjunta todos los datos y se comparan con el control, la visualización gráfica resulta compleja.

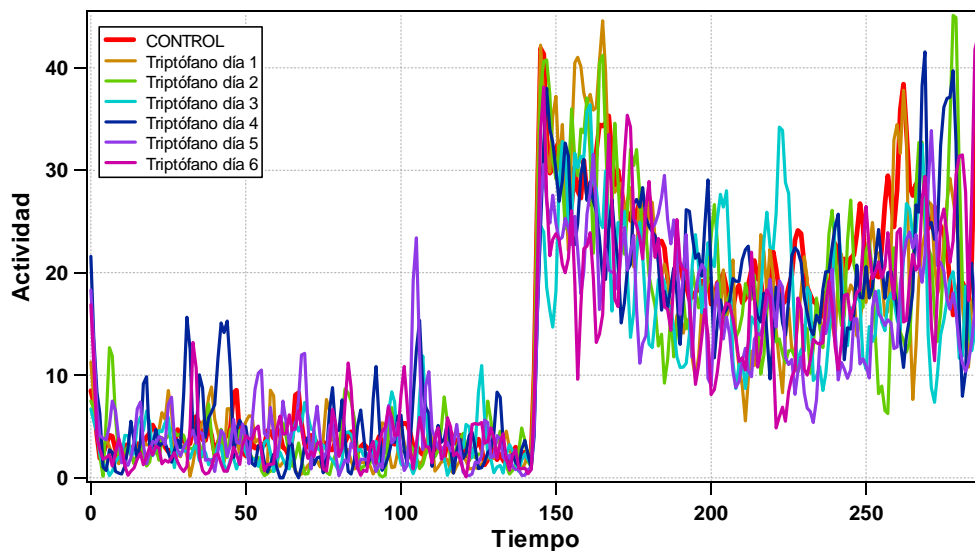


Figura XVII. Cuando se representa en un mismo gráfico el número de pulsos de actividad correspondientes a diferentes días en los que duró el experimento, resulta confusa su descripción

Por ese motivo, y con el fin de facilitar la exposición gráfica de los datos, se representa para cada instante a lo largo de los periodos diarios, la actividad acumulada. De esta forma, el final del día se corresponde con el número de pulsos total en dicho periodo (Figura XVIII).

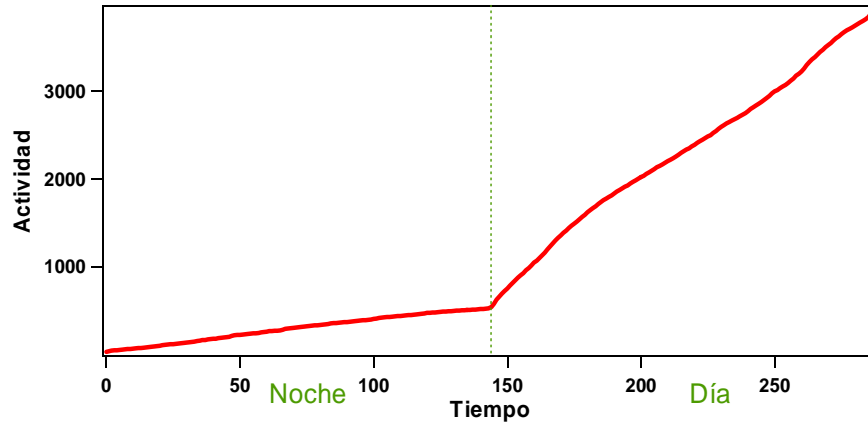


Figura XVIII. Representación del sumatorio de la actividad ejercida durante 24 horas, en 10 animales de experimentación, de manera que cada valor representado, indica la actividad acumulada media para cada instante.

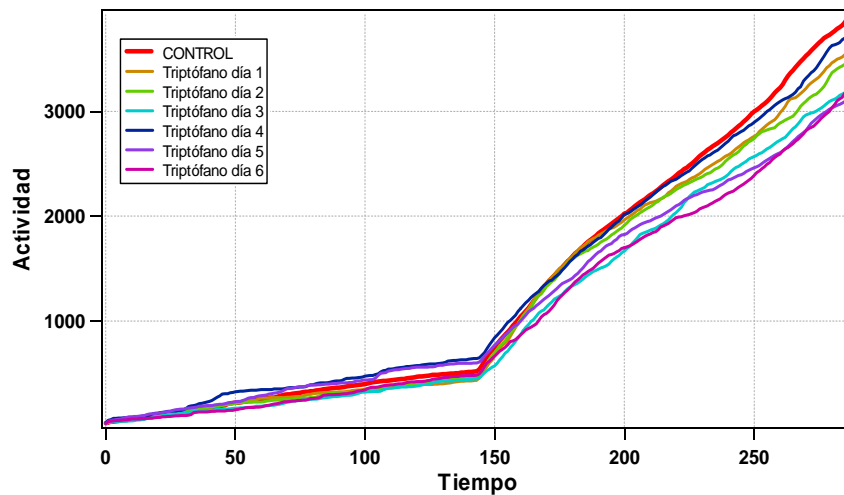


Figura XIX. Representación del sumatorio de la actividad ejercida durante 24 horas tanto en animales controles (línea roja) como en animales de experimentación (cada experimento corresponde con una línea de color).

3.2.1.4 Esterilizaciones.

Se utilizaron dos tipos de esterilizaciones:

1.- Esterilización en autoclave: este modelo se eligió para esterilizar material de vidrio así como el agua. El proceso se efectuó a 120°C y a 1,5 atmósferas de presión durante 30 minutos.

2.- Esterilización por rayos ultravioleta: se utilizó para materiales de plástico no resistentes al autoclave. El tiempo medio de exposición a estas radiaciones fue de 40 minutos.

3.2.1.5 Obtención de muestras biológicas.

3.2.1.5.1 Sangre.

La sangre se obtuvo de la vena braquial del ala mediante jeringa hipodérmica (de 1 ml), previamente heparinizada. Posteriormente fue transferida a un tubo de ensayo esterilizado, al cual se le habían dispensado 0,5 ml de heparina de litio por mililitro de sangre, para evitar la coagulación sanguínea, y finalmente diluido con 0,5 ml de PBS.

3.2.1.5.2 Plasma.

La sangre obtenida a partir de la vena braquial por medio de una jeringa sin heparinizar, fue transferida a un tubo preparado con EDTA y posteriormente fue centrifugada a temperatura ambiente (20°C) durante 15 minutos a 240 x g. Posteriormente, el plasma fue alicuotado en tubos Eppendorf, y congelado a -24°C hasta su utilización.

3.2.1.5.3 Aislamiento de leucocitos heterófilos.

Partimos de 1 ml de sangre (preparada y diluida como se ha mencionado anteriormente), que se deposita en tubos que contienen dos gradientes de densidad (medios separadores). Los medios separadores utilizados fueron Histopaque 1.077 y 1.119. Se depositó en el fondo del tubo 1 ml de 1.119 y, después, suavemente para que no llegen a mezclarse, 1ml de 1.077. A continuación se deposita la sangre, lentamente, dejándola caer por las paredes del tubo sin que llegue a mezclarse con los gradientes de densidad. La preparación se centrifuga a 600 x g durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se recoge el anillo de heterófilos, y se lava con PBS (480xg durante 10 minutos) dos veces. Seguidamente se elimina el sobrenadante, golpeándose el precipitado para separar los heterófilos de las paredes y el fondo del tubo. Finalmente, se realizó el recuento celular en Hemocitómetro de Neubauer y microscopio de contraste de fases, ajustándose la suspensión celular a 5×10^5 cels/ml tanto para los estudios de la fagocitosis como para la reducción del NBT.

3.2.1.6 Funcionalidad de las células fagocíticas.

Las células fagocíticas se caracterizan por una serie de propiedades, de las cuales su capacidad de fagocitar el material extraño es la más conocida. Esta propiedad fagocítica lleva consigo una serie de propiedades que son necesarias para la realización de las mismas como: la adherencia a endotelio vascular y/o superficies tisulares, la unión del material que va a ser fagocitado, la ingesta del mismo y la destrucción de dicho material ingerido.

A continuación pasaremos a describir la metodología utilizada en la evaluación de la capacidad fagocítica en los heterófilos procedentes de la tórtola turca (Figura XX), que ha sido adaptada de otros estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio para mamíferos y peces.

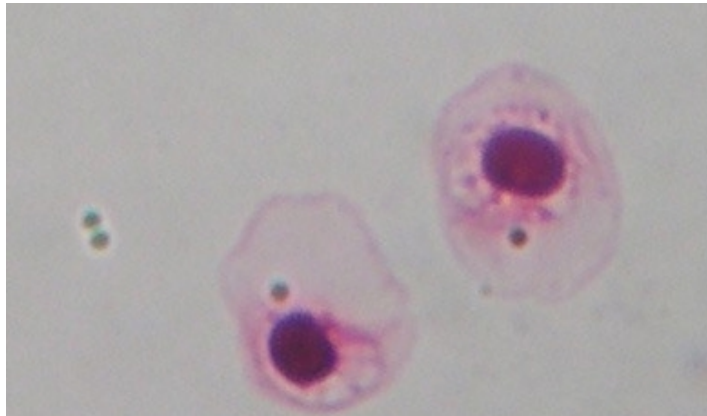


Figura XX. Imagen de microscópica óptica (x 1000 aumentos), de heterófilos de *Streptopelia roseogrisea* con partículas de látex fagocitadas.

3.2.1.6.1 Capacidad de ingestión.

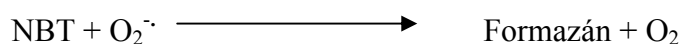
Esta propiedad, también conocida con el nombre genérico de fagocitosis, es la más típica y representativa de las células que estamos considerando, y por la cual reciben el nombre de células fagocíticas. Debido a esta función los fagocitos pueden ingerir materiales de diferente naturaleza orgánica: como células enteras o partes de ellas, grandes moléculas orgánicas e inorgánicas, como sería el caso de partículas de carbón o látex.

Para realizar este estudio se siguió el método descrito por Rodríguez y colaboradores (1994). Alícuotas de 200 μ l de la suspensión de células fagocíticas fueron puestas en pocillos de placas de plástico tipo MIF (Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos) y tras 30 minutos de incubación a 37°C en estufa con atmósfera al 5% de CO₂, la monocapa adherida fue lavada con PBS a 37°C. Se añadieron a continuación 20 μ l de bolas de látex (SIGMA, 1.09 μ m, diluido al 1% en PBS) y 200 μ l de PBS dejándose incubar en estufa durante 30 minutos en las mismas condiciones anteriores. Se procedió finalmente a la fijación y tinción con Diff-Quick que contiene metanol (5 minutos), eosina (5 pases) y hematoxilina (5 pases). Por último las placas son lavadas con agua y secadas procediéndose al recuento en el microscopio de contraste de fases x

100 con aceite de inmersión. Los resultados se expresaron como número de bolas de látex ingeridas por 100 heterófilos (Índice de fagocitosis), como porcentaje de los heterófilos que han fagocitado al menos una bola de látex (Porcentaje de fagocitosis o Porcentaje fagocítico), y como el número medio de bolas de látex fagocitadas por cada heterófilo que ha fagocitado al menos una bola de látex (Índice de fagocitosis / Porcentaje fagocítico = Eficiencia de fagocitosis o Eficiencia fagocítica).

3.2.1.6.2 Test de reducción del nitroazul de Tetrazolio (NBT).

Se utilizó el método descrito por Rodríguez y Lea (1994), con pequeñas modificaciones. Dicho método está basado en la reacción siguiente:



Se utilizaron alícuotas de 250 μl de la suspensión celular (5×10^5 cels/ml) en PBS a las que se añaden igual volumen de NBT (1 mg/ml). Se tienen dos grupos diferentes de muestras, unas muestras estimuladas a las que se le añaden 50 μl de látex preparado al 1% en PBS y otras las no estimuladas que llevan 50 μl de PBS. Una vez los tubos están preparados se incuban durante 30 minutos a 37°C en baño maría con agitación constante.

En todos los casos después de la incubación la reacción fue parada con 2,5 ml de ácido clorhídrico 0,5 N. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm 30 minutos a 4°C , despreciándose el sobrenadante y golpeando los tubos a continuación de modo repetido para despegar el fondo, tras lo cual se realizó la extracción del NBT reducido (formazán azul) del botón celular con la adición de 1 ml de dioxan para romper las membranas celulares (centrifugar a 3000 rpm 30 minutos a 4°C). Tras esto, se determinó la absorbancia del sobrenadante en un espectofotómetro a 525 nm usando como blanco una muestra que sólo contenía dioxan. El porcentaje de estimulación de la reducción del NBT fue entonces determinado, siendo el valor dado a la absorbancia obtenido en las muestras no estimuladas (sin bolas de látex).

$$\% \text{ estimulación de NBT} = \frac{\text{Muestras estimuladas (E)}}{\text{Muestras no estimuladas (NE)}} \times 100$$

3.2.1.7 Obtención de parámetros fisiológicos.

Se procedió a la toma del peso corporal mediante balanza de precisión. La temperatura fue tomada de la región de la cloaca de las aves y se llevó a cabo mediante termómetro clínico, tanto la medición del peso como la temperatura de los animales se realizaron a las 10:00 h.

3.2.1.8 Determinación de los niveles de melatonina en plasma sanguíneo.

Los niveles de melatonina de los animales objeto de estudio se determinaron utilizando un “kit” comercial de radioinmunoensayo (IBL) que consiste en:

Componentes	Cantidad	N° de viales	Especificaciones
Solución tampón	5 ml	1	Lista para usar
Enzima	-	2	Liofilizada
Tampón enzimático	6 ml	1	Lista para usar
Estándares A – F para plasma	-	6	Liofilizados
Controles 1 + 2	-	2	Liofilizados
Trazador ¹²⁵ I	-	1	Liofilizado
Antisuero	-	2	Liofilizados

Se reconstituyó cada uno de los componentes siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial y se procedió según la siguiente tabla:

Tubo	Estándar / Control	Problema	Solución enzimática
NSB	200 (Estándar A)	-	50
B ₀	200 (Estándar A)	-	50
Estándar B	200 (Estándar B)	-	50
Estándar C	200 (Estándar C)	-	50
Estándar D	200 (Estándar D)	-	50
Estándar E	200 (Estándar E)	-	50
Estándar F	200 (Estándar F)	-	50
Control 1	200 (Control 1)	-	50
Control 2	200 (Control 2)	-	50
Problema	-	200	50

Todos los volúmenes están expresados en µl y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. NSB = unión no específica; B₀ = estándar 0 (fijación del 100%); estándar A = 0 pg / ml; estándar B = 2,0 pg / ml; estándar C = 8,5 pg / ml; estándar D = 30 pg / ml; estándar E = 100 pg / ml; estándar F = 300 pg / ml.

Tras las correspondientes adiciones, se centrifugaron todos los tubos durante un minuto a 1700 rpm y se dejaron incubar durante tres horas a temperatura ambiente, tras lo cual, se procedió como sigue:

Tubo	Solución tampón	Trazador ^{125}I (≤ 140 kBq)	Solución enzimática
NSB	50	50	-
B ₀	50	50	50
Estándar B	50	50	50
Estándar C	50	50	50
Estándar D	50	50	50
Estándar E	50	50	50
Estándar F	50	50	50
Control 1	50	50	50
Control 2	50	50	50
Problema	50	50	50

Todos los volúmenes están expresados en μl . Los tubos se centrifugaron durante un minuto a 500 rpm., preparándose a parte dos tubos con 50 μl de trazador cada uno, para la medición de la actividad total (TC). Todos los tubos se cubrieron con papel de aluminio y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 36 a 48 horas. Pasado dicho periodo, se añadieron 0,5 ml de antisuero precipitante (que contenía antisuero anti-melatonina procedente de conejo) a todos los tubos excepto a los TC. Se agitaron e incubaron durante quince minutos, pasados los cuales, se centrifugaron durante 15 minutos a 2500 rpm. a temperatura ambiente. Se aspiró cuidadosamente el contenido de todos los tubos, excepto el de los TC, midiéndose la actividad del precipitado en un contador gamma (γ).

Los resultados fueron calculados a partir de la siguiente expresión:

$$\%B / B_0 = \frac{\text{cuentas de la muestra}}{\text{cuentas del estándar cero}} \times 100$$

Finalmente, los valores obtenidos en la relación $\% B / B_0$ en cada estándar se representaron frente al logaritmo de la concentración de melatonina de cada muestra estándar (expresadas en pg / ml) obteniéndose una recta patrón (Figura XXI), a partir de cuya ecuación pudo calcularse la concentración de melatonina de las muestras problema.

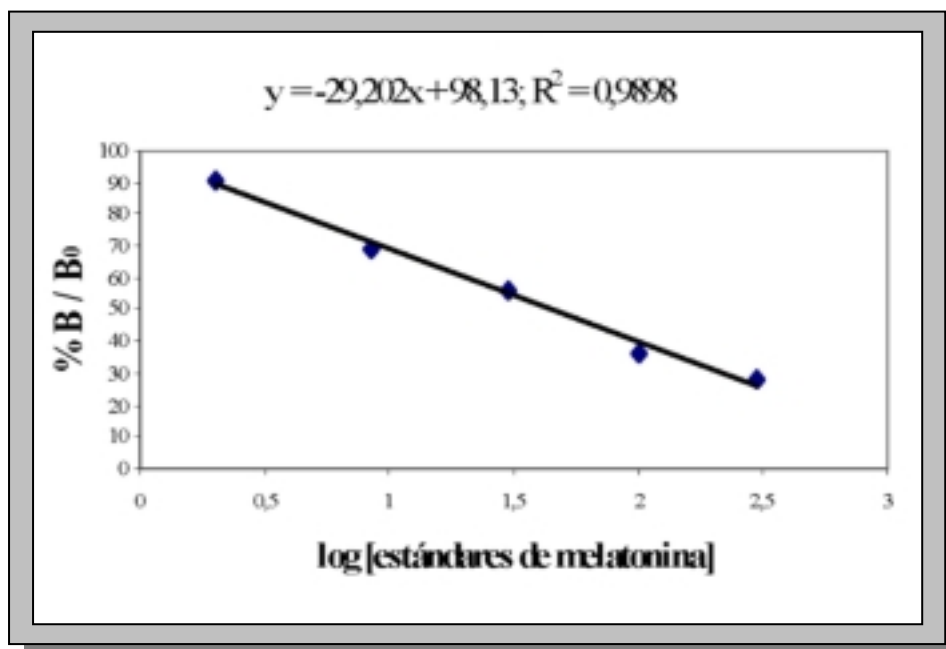


Figura XXI. Recta de regresión obtenida al representar $\%B / B_0$ frente al logaritmo de las concentraciones de los estándares de melatonina.

3.2.2 MÉTODOS EN LOS ENSAYOS CON HUMANOS.

3.2.2.1 Dispositivos empleados para la detección de actividad en niños lactantes.

El registro de actividad es muy útil ya que proporciona medios a los clínicos e investigadores para obtener datos diagnósticos, con los que se pueden valorar diferentes problemas médicos, y puede proporcionar respuestas a muchas preguntas. Los niveles de actividad se relacionan con los patrones de sueño / vigilia, el nivel del dolor, el humor, gastos energéticos y otros parámetros cuantificables.

El Actiwatch es un piezoacelerómetro muy ligero ($\pm 4,7$ g) que se acopla en la muñeca o tobillo, mide y registra los movimientos físicos, no resultando en ningún momento un método invasivo. Los datos pueden ser transferidos a un ordenador y analizados por el software de *Cambrige Neurotechnology*. El sistema monitorizado de registro d actividad Actiwatch posee tres partes:

- Actiwatch
- *Reader*/ lector conectado a un PC
- El software: Cambridge Nuerotechnology Ltd

La actividad se mide mediante un acelerómetro que registra la intensidad, la cantidad y duración del movimiento en todas las direcciones. El correspondiente voltaje que se produce es convertido y almacenado como medida de actividad en la unidad de memoria del actiwatch. La frecuencia máxima que se puede registrar es de unos 32 Hz. El Actiwatch registra todos los movimientos sobre los 0.05 g. Tras finalizar el experimento se vuelca sobre el ordenador personal, la actividad adquirida por el Actiwatch y se analiza con el correspondiente software.

Funcionamiento del programa.

En primer lugar el actímetro se conecta con el ordenador, para recibir ciertos parámetros del sujeto experimental al que se le va a realizar el registro. La información recogida será leída por el programa para su posterior análisis.

En activimetría es necesario contemplar toda una serie de parámetros: nombre, sexo, edad, fecha, intervalo de registro, acerca de las características intrínsecas de cada individuo, siendo éste el modo de que toda la información quede recogida en el archivo.

En esta primera pantalla se pueden leer otros datos que pueden ser considerados o no, como el número de serie o la memoria libre del Actiwatch. En cualquier momento se puede volver a esta pantalla inicial y modificar cualquiera de estos parámetros.

Se llevará a cabo el registro de la actividad del sujeto experimental durante el tiempo que se estime conveniente para el estudio.

3.2.2.2 Análisis del sueño.

Este análisis permite el cálculo de los parámetros sueño-vigilia de los datos registrados por el Actiwatch. En la pantalla se debe seleccionar *Sleep análisis* y aparece una pantalla similar a la siguiente (Figura XXII).

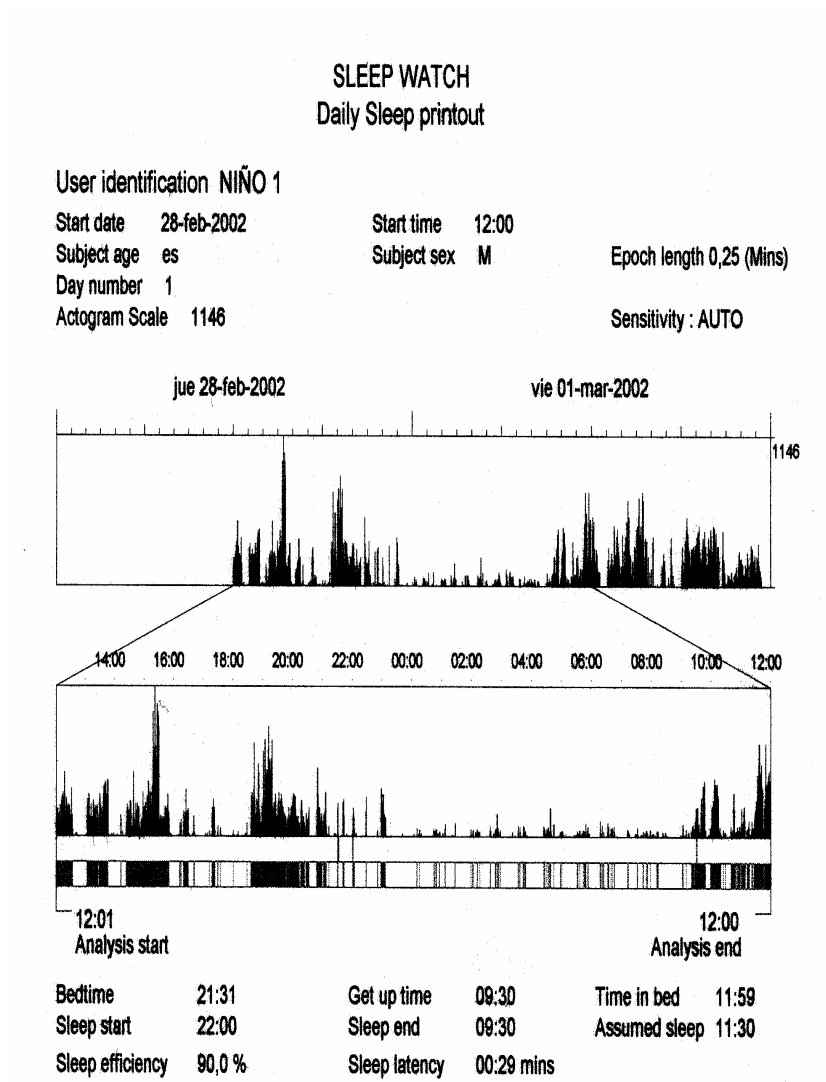


Figura XXII. Pantalla del análisis del sueño (Cambridge Neurotechnology Ltd).

Esta pantalla ofrece muchas opciones y tiene múltiples pantallas asociadas:

- ⇒ Barra menú: Contiene diversas funciones y controles.
- ⇒ Información de archivo: muestra los detalles de los datos.
- ⇒ Activity data plot: muestra los valores de actividad durante un periodo de dos días. La zona azul es la ventana de análisis (de forma automática de 23 a 8 horas)
- ⇒ Expanded análisis window: permite obtener detalles sobre la visualización de los datos.
- ⇒ Sleep-wake Parametres: permite obtener detalles estadísticos del análisis del sueño.

Análisis del sueño.

Los datos adquisición de actividad/inactividad pueden ser almacenados en intervalos de 15 segundos (0.25 minutos), 30 segundos (0.5 minutos), 1 ó 2 minutos, aunque se recomienda emplear intervalos de 1 minuto como mínimo.

Finalizando el periodo de tomas de datos, los resultados se descargan seleccionando la fecha para el análisis usando la barra deslizadora de día. El valor máximo de la gráfica se puede ajustar empleando el control Scale (el mínimo valor es 50, el máximo será el máximo valor de los datos registrados). En la parte superior se puede observar la actividad de los dos días resaltada sobre los datos a analizar. La gráfica inferior muestra una visión expandida del análisis y también se pueden marcar los sucesos con líneas azules.

La ventana de análisis posee dos barras debajo del gráfico, la primera muestra los tiempos de sueño y de vigilia (líneas azules), así como la hora de irse a dormir y de levantarse (líneas rosas). La segunda barra representa los periodos de sueño en color blanco y la de vigilia en rojo.

Ventana de análisis.

Una vez seleccionado el tiempo de inicio de análisis y de finalización, la ventana de análisis puede trabajar en intervalos de 1 a 24 horas. Aunque esta debe tener la suficiente duración como para incluir cualquier tipo de periodo de sueño.

Tiempo de dormir y de despertar.

Estos tiempos se debe seleccionar con el operador y se indican mediante una línea azul oscura en el análisis expandido. Estos tiempos se pueden cambiar usando el botón izquierdo del ratón, o bien las barras deslizadoras para obtener un ajuste más fino. El tiempo correspondiente al de la cama aparece en un pequeño recuadro a la derecha.

Inicio y final del sueño.

Estos tiempos deben ser seleccionados y quedan marcadas con unas líneas de color rosa bajo el análisis expandido, señales que pueden modificarse usando el botón derecho o las barras deslizadoras para un ajuste más fino. Como alternativa, los tiempos de inicio y final del sueño pueden ser marcados de forma automática con la acción auto que permite de forma algorítmica realizar un cálculo exacto.

Ejecución del análisis de sueño.

Se procede a la ejecución de los datos mediante la activación del programa el cual ofrece una serie de algoritmos que proporcionan datos sobre el movimiento, el sueño y vigilia para el periodo comprendido entre el comienzo y el final del sueño. Los resultados aparecerán en la parte baja de la pantalla. Los resultados aparecerán expresados en términos de 24 horas y por debajo de los mismos, en términos de horas, minutos y segundos.

Resultados del análisis.

En la siguiente lista se muestra una descripción de los parámetros a evaluar en el análisis del sueño:

- ⇒ Hora de irse a la cama.
- ⇒ Hora en la que se levanta el sujeto experimental.
- ⇒ Tiempo de permanencia en la cama: es la diferencia entre las dos horas anteriores.
- ⇒ Inicio del sueño: Debe ser seleccionado por el operador.
- ⇒ Final del sueño.
- ⇒ Tiempo asumido como sueño: la diferencia entre el final y el principio del sueño.
- ⇒ Tiempo real del sueño: determinado por algoritmos y es equivalente al tiempo de sueño asumido menos el tiempo de vigilia.
- ⇒ Tiempo de vigilia: determinado por algoritmos.
- ⇒ Porcentajes de tiempo de sueño y de vigilia.
- ⇒ Eficiencia de sueño. Porcentaje de tiempo de sueño mientras el sujeto permanece en la cama.
- ⇒ Latencia de sueño: Tiempo que transcurren antes del inicio del sueño.
- ⇒ Número de períodos de sueño: Muestra el número de episodios de sueño.
- ⇒ Número de períodos de vigilia: Muestra el número de episodios de vigilia.
- ⇒ Tiempo de inmovilidad: Número total de minutos en los que el sujeto tiene una movilidad cero, que se asume como tiempo de sueño.
- ⇒ Tiempo de movilidad: Número total de minutos en los que el sujeto tiene movilidad durante los períodos presumiblemente de sueño.
- ⇒ Porcentaje de tiempo de movilidad/inmovilidad: Tiempo con o sin movimiento en el período asumido como sueño.
- ⇒ Número de fases de inmovilidad: Número de períodos con cero movimientos registrados de una forma consecutiva.
- ⇒ Número de fases de inmovilidad de 1 minuto: Número de fases de inmovilidad de duración un minuto.

- ⇒ Porcentaje de fases de movilidad de 1 minuto: Porcentaje de fases de inmovilidad de 1 minuto como proporción del número total de fases de inmovilidad.
- ⇒ Índices de movimiento y fragmentación: Es el resultado de sumar el tiempo de movilidad y el porcentaje e fases de inmovilidad de 1 minuto. Es un indicador de la calidad del descanso.
- ⇒ Actividad total: Número total de actividad durante l sueño.
- ⇒ Media de la activad: Valor promedio de la actividad en cada uno de los intervalos de sueño.
- ⇒ Promedio de los movimientos en vigilia: Promedio de la actividad registrada antes de iniciarse el sueño.

Una vez calculados todos estos parámetros para una noche, el procedimiento debe repetirse para cada día registrado, siendo siempre útil el realizar un diario de sueño para facilitar la comprensión de los resultados.

Sensibilidad.

La sensibilidad (alta, media, baja, auto) está directamente relacionada con los valores predeterminados del programa que permiten realizare algoritmos para diferenciar sueño y vigilia. Seleccionando baja sensibilidad el programa doblará el contaje de movimientos para considerar un período de tiempo como vigilia. La alta sensibilidad, por el contrario reduce a la mitad los contajes de actividad necesarios para considerar que el sujeto de experimentación está despierto.

La sensibilidad auto relaciona directamente los niveles de actividad de los sujetos con el límite necesario para considerar que el sujeto está en estado de vigilia.

Algoritmos para sueño- vigilia.

La determinación del sueño vigilia por este software requiere del uso de algoritmos que usan los datos registrados por el activímetro de muñeca para realizar una serie de cálculos seriados. Estos algoritmos revisa cada punto registrado y de cada intervalo y

realiza los cálculos necesarios. Por ejemplo, los registros de actividad de 1 minuto se reducen por un factor de 5 en comparación con el periodo registrado y este valor se suma al valor inicial, mientras que un registro de actividad de 2 minutos son reducidos por un factor de 25.

Usando una sensibilidad media para un intervalo de 1 minuto un total de 40 movimientos es suficiente para designar el periodo como vigilia. Para la determinación automática del inicio del sueño el algoritmo detecta los periodos de 10 minutos de inmovilidad consecutiva con no más de 1 periodo de movimiento. El tiempo de latencia se determina por la diferencia existente entre el tiempo de irse a la cama y el inicio de la fase de sueño, para el final del sueño el algoritmo detecta periodos de 10 minutos consecutivos de inactividad alrededor de la hora de levantarse.

3.2.2.3 Determinación de 6-sulfatoximelatonina en orinas de lactante y de su progenitora.

Para la determinación de dicho metabolito de excreción en orina se utilizó un Analizador Automático de Inmunodiagnóstico (LABOTECH) y la técnica desarrollada fue la de inmunoanálisis de ELISA mediante el “Kit” comercial: BULLMANN 6-SMT siendo un ELISA competitivo, usando la técnica de anticuerpo captador. Con anticuerpo específico policlonal para anticuerpo de conejo, se ha revestido los pocillos de la placa de titulación incluida en el kit. Durante las tres primeras horas de incubación, la 6-SMT presente en los ejemplos prediluidos de orina, Controles, y los Standards respectivamente, compiten con 6-SMT BIOTIN para unirse al anticuerpo anti-6-SMT, a su vez el complejo 6-SMT BIOTIN-ANTICUERPO es capturado por el segundo anticuerpo adherido inicialmente a los pocillos. Después del lavado de la placa de titulación y la adición en la misma de una enzima peroxidasa y tras 30 minutos de incubación y un segundo lavado, sólo nos queda el complejo 6-SMT-Biotin-anticuerpo unido a la correspondiente enzima, añadimos el sustrato enzimático TMB e incubamos 15 minutos, el color que se forma es proporcionalmente inverso al de 6-SMT existente inicialmente en las muestras. Dicho color vira de azul a amarillo después de la adición de una Solución de parada pudiendo ser medido a 450 nm.

Los niveles de 6-Sulfatoximelatonina en las muestras de orina objeto de estudio se determinaron utilizando un “kit” comercial de ELISA (BUHLMANN) que contenía los siguientes componentes:

Componente	Cantidad	Envases	Especificaciones
Placa de microtitulación de 98 pocillos revestido con anticuerpo de carnero anti-conejo	1 de 12 x 8 pocillos	1	Lavar 2 veces antes de usar
Buffer de lavado	100 ml	1	Diluir en 900 ml de agua destilada
M6S-Biotin	5,5 ml	1	Listo para usar
Estándares A – F	0,5 ml	5	Listo para usar
Controles 1 + 2	0,5 ml	2	Listo para usar
Anticuerpo de conejo anti-6SMT	5,5 ml	1	Listo para usar
Enzima (peroxida)	11 ml	1	Listo para usar
Solución para sustrato	11 ml	1	Listo para usar
Solución Stop	11 ml	1	Listo para usar

Se reconstituyó cada uno de los componentes siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial y se procedió según la siguiente tabla:

Tubo	Estándar / Control	M6S-Biotin	Anticuerpo	Enzima
NSB	100 (Estándar A)	-	-	100
B ₀	50 (Estándar A)	-	50	100
Estándar B	50 (Estándar B)	-	50	100
Estándar C	50 (Estándar C)	-	50	100
Estándar D	50 (Estándar D)	-	50	100
Estándar E	50 (Estándar E)	-	50	100
Estándar F	50 (Estándar F)	-	50	100
Control 1	50 (Control 1)	-	50	100
Control 2	50 (Control 2)	-	50	100
Orina diluida	50	50	50	100

Todos los volúmenes están expresados en μl y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. NSB = unión no específica; B₀ = estándar 0 (fijación del 100%); estándar A = 0 pg / ml; estándar B = 0,8 pg / ml; estándar C = 2 pg / ml; estándar D = 5 pg / ml; estándar E = 12,5 pg / ml; estándar F = 40 pg / ml.

Tras la adición del antisuero (anticuerpo de conejo) e incubar 3 horas a 2-8 °C y lavar cuatro veces, se añadió 100 μl de enzima, se volvió a incubar 30 minutos a 18-28 °C y al finalizar se añadió el sustrato TMB incubándose por tercera vez durante quince minutos entre 18-28 °C, transcurrido ese tiempo se añadió 100 μl de Solución de parado. Los resultados se alcanzaron tras medir en espectrofotómetro la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm.

Los resultados fueron calculados a partir de la siguiente expresión:

$$\%B / B_0 = \frac{\text{cuentas de la muestra}}{\text{cuentas del estándar cero}} \times 100$$

3.2.2.4 Determinación de triptófano en leche materna.

El método de análisis usado fue cromatografía de intercambio iónico, utilizando para ello el analizador de alta resolución de aminoácidos Sistema Beckman 6300/7300 (Beckman. Palo Alto. California. USA). Los fundamentos técnicos-analíticos se basan en la reacción de la amina primaria (-NH₂) con ninhydrina, la cual es detectable a una longitud de onda (λ) de 570. Dicho sistema consiste en una columna cromatográfica de litio de 10 cm de longitud, en la cual se utilizan tres soluciones tampón de litio. Los datos son adquiridos y analizados con los parámetros operativos de análisis de datos del Modelo Beckman 7000 e integrados por el Modelo Hewlett-Packard 3390 A y 3392 A (Agilent Technologies California. USA). A través de los estándares (STD) de aminoácidos suministrado por Beckman se determinó los tiempos de retención y se estableció los factores de calibración utilizándose una concentración de 2,5 μ moles / ml.

Condiciones analíticas.

La presión requerida en la bomba de flujo debe ser de 20 ml/h psig, y la t^a de 60 °C. La técnica analítica fue optimizada usando 28 muestras hidrolizada de la leche en estudio.

Hidrólisis y Análisis.

Las muestras a analizar fueron recogidas durante 24 horas y almacenadas en tubos de poliestireno.

Se tomó como referencia la técnica de Alegría y colaboradores (1996 y 1999), la cual fue modificada de forma proporcional al volumen menor que existían en nuestras muestras. Se usó un mililitro de cada muestra de leche, primeramente eliminando la porción grasa que existe en los mismo, para ello se añadió un mililitro de eter etílico y posteriormente centrifugado durante 5 minutos a 1.700 rpm, se elimina la grasa que se encuentra como sobrenadante. El resto de la muestra sigue el siguiente protocolo de hidrólisis: se añaden 0,75 g de Hidroxido de Bario pentahidratado y 1,5 ml de agua a 100 °C, la mezcla se agita en agitador de balanceo, posteriormente se burbujea en gas de N₂ con el objetivo de eliminar el O₂. Se hidroliza durante 8 horas a 120 °C, pasadas las cuales el hidrolizado resultante se ajusta al pH: 3, se centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante es filtrado mediante filtro Millex (Millipore) de 0,22 µm y el filtrado resultante fue congelado a -20 °C en tubos Eppendorf (Deltalab) hasta su posterior análisis.

El contenido de aminoácidos de cada muestra fue determinado en el analizador cromatográfico descrito anteriormente, usando un volumen para el inyectado de 50 µl de muestra junto 50 µl de medio tampón, los valores determinados por la cromatografía fueron multiplicados por el factor de dilución 2,8 (Figura XXIII).

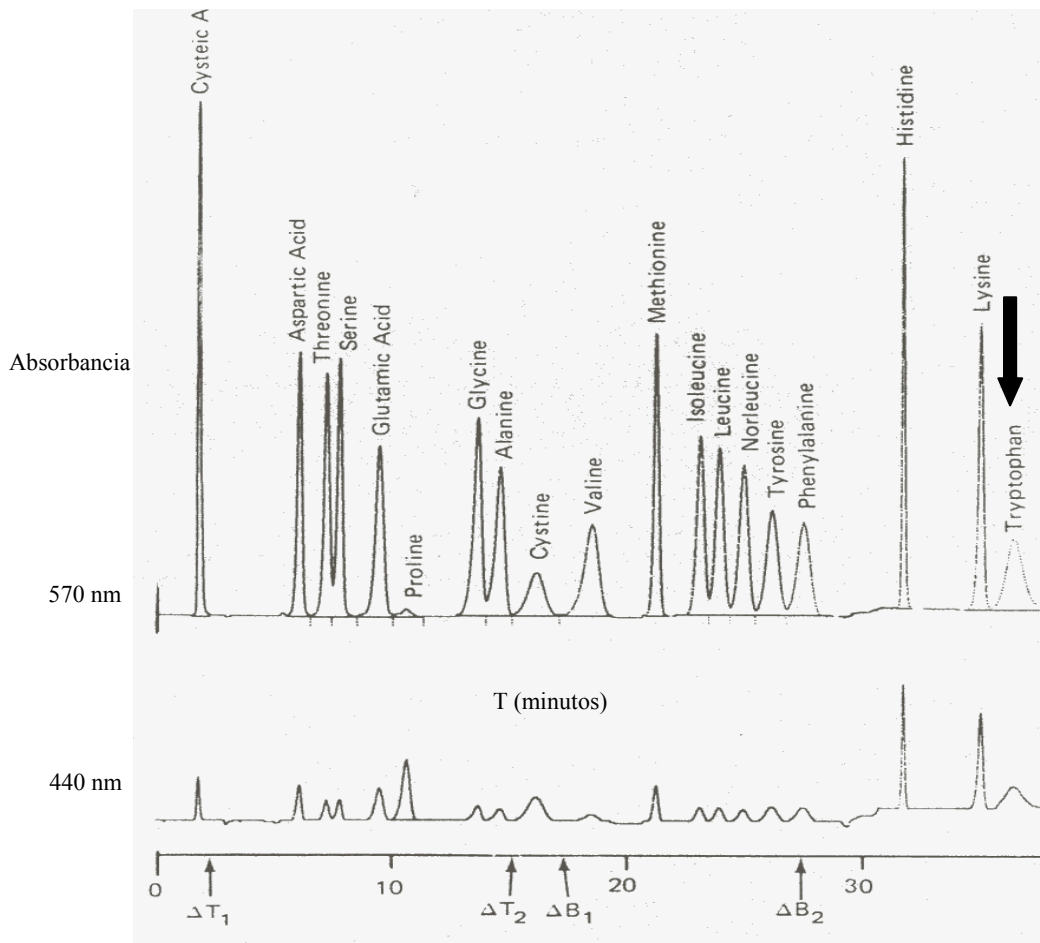


Figura XXIII. Cromatograma de análisis de aminoácidos en “Sistema Beckman”: el primer pico por la derecha corresponde al aminoácido triptófano.

3.2.3 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN SENOIDAL.

Para la determinación de la función senoidal (1) de los resultados obtenidos, necesaria en el estudio de cronobiología de las variables analíticas: hormona melatonina en animales en condiciones basales, triptófano en leche materna, 6-sulfatoximelatonina en orina de niños lactantes y en sus progenitoras.

$$(1) y(t) = m + A \text{ sen}(w t + D)$$

$$(m = y_0; A = \text{amplitud}; w = \text{frecuencia}; D = \text{desfase})$$

Se utilizó el software: *IGOR PRO* Versión 4.0. 1988-2000. WaveMetrics, Inc Late Oswego, Oregon, USA.

3.2.4 MÉTODOS DE CÁLCULO ESTADÍSTICO.

Para la resolución estadística de los datos obtenidos se utilizó el software: SPSS 11.5 para entorno Windows.

En relación con la metodología estadística se llevaron a cabo dos tipos de estudios:

1.- Descriptivo, calculando como valores representativos, la media aritmética $(\bar{X}) \pm$ desviación estándar (D.S.) según las fórmulas habituales para el número de datos manejados. Todos los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar del número de ensayos. Grupo triptófano (trp) $n=10$ y grupo control $n=10$.

2.- Test de hipótesis, fiable para comprobar la normalidad de las variables de estudio, dado el tamaño muestral disponible, resultando una población no normal por el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para decidir si los valores obtenidos pueden ser considerados o no una misma población, hemos hecho uso de diferentes técnicas estadísticas según las características de los datos y el estudio que sobre ellos pretendíamos realizar. Los resultados se analizaron utilizando el test de Kruskal-Wallis, (“U de Mann-Whitney” aplicando la Corrección de Bonferrony), para las comparaciones múltiples. Se consideró que no había significación cuando el valor de la probabilidad de la significación (p) fue mayor que 0,016. Se dio el valor de “significativo” a $p < 0,016$. Para los análisis de resultados por parejas se utilizó el test de “U de Mann-Whitney”. Se consideró que no había significación cuando el valor de la probabilidad de la significación (p) fue mayor que 0,05. Se dio el valor de “significativo” a $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A continuación exponemos los resultados obtenidos agrupados en dos bloques según sea su pertenencia al estudio realizado en animales o en humanos.

BLOQUE 1: RESULTADOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

1.1 Parámetros fisiológicos tras la administración oral de L-triptófano.

1.2 Variaciones circadianas de melatonina en animales de experimentación bajo condiciones basales.

1.3 Función fagocítica de heterófilos:

1.3.1 Tras la administración oral de L-triptófano a las 19:00 h.

1.3.2 Tras la administración oral de L-triptófano a las 09:00 h.

1.4 Test de reducción del nitroazul de tetrazolio de heterófilos (NBT):

1.4.1 Tras la administración oral de L-triptófano a las 19:00 h.

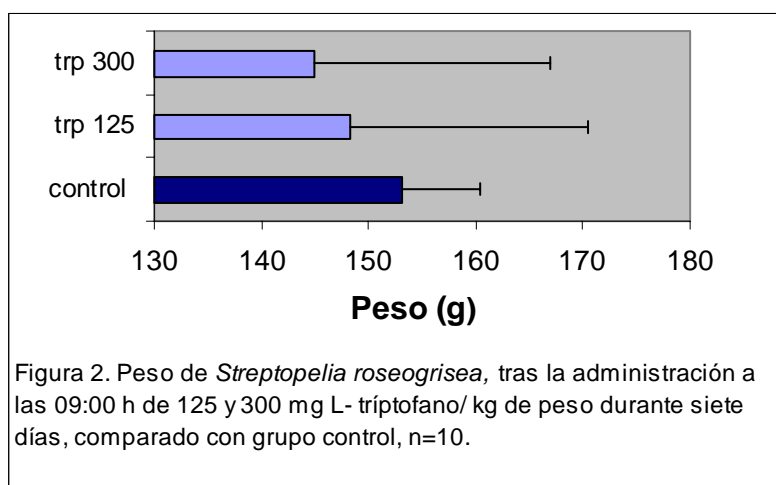
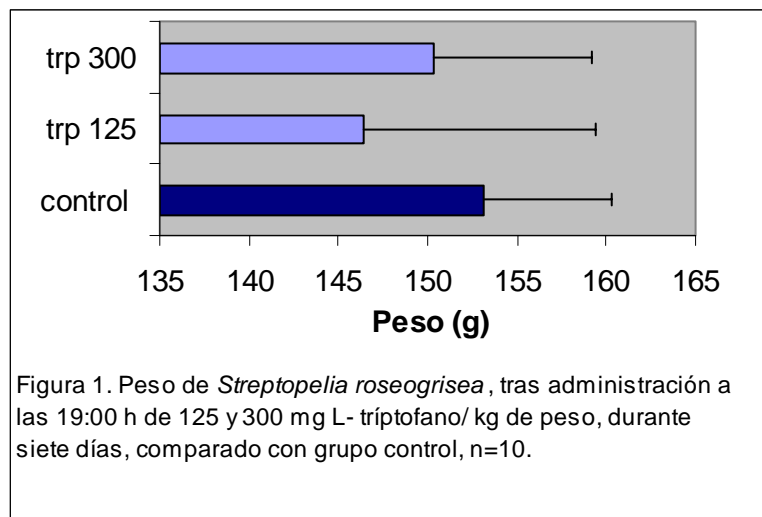
1.4.2 Tras la administración oral de L-triptófano a las 09:00 h.

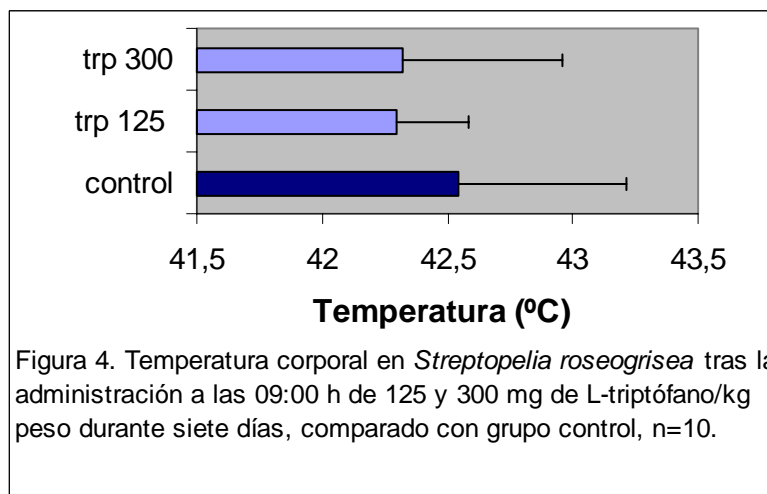
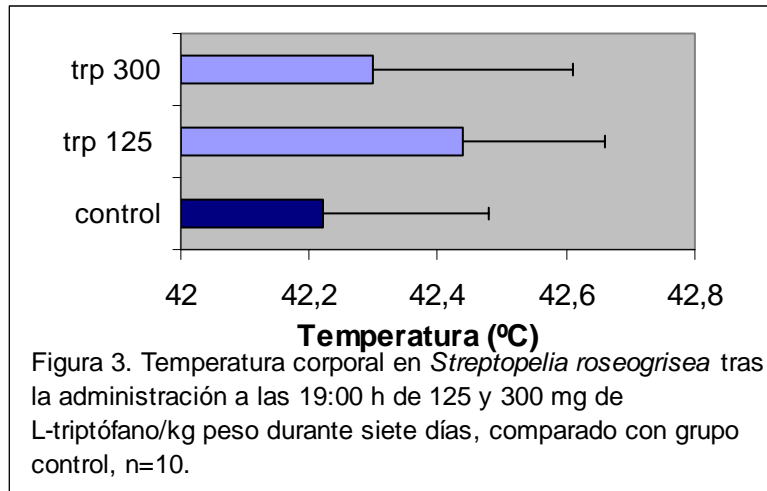
1.5 Variaciones nocturnas de melatonina plasmática en animales controles y en animales bajo tratamiento oral de L-triptófano.

1.6 Determinación del ritmo de actividad / inactividad en *Streptopelia roseogrisea* tras la administración oral de L-triptófano.

1.1 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE L-TRIPTÓFANO A *Streptopelia roseogrisea*.

Antes de disponernos a realizar los estudios pertinentes nos dispusimos a cerciorar que la administración de L-triptófano a las dos concentraciones ensayadas (125 y 300 mg de L-triptófano/kg de peso) no suponía ningún riesgo para los animales en cuestión. Para ello se les realizó a las 10:00 h, un seguimiento de peso y temperatura tras el tratamiento, comparado con un grupo control (animales que recibieron el excipiente, metilcelulosa). Los resultados, no mostraron variación significativa, pudiéndose observar en las Figura 1, 2, 3, 4.





1.2 VARIACIONES CIRCADIANAS DE MELATONINA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN BAJO CONDICIONES BASALES.

Tras adaptar a *Streptopelia roseogrisea* al fotoperiodo constante de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y comprobar que se encontraban encarrilados en ritmos de actividad / reposo con periodos de 24 horas (1440 min), nos dispusimos a medir las concentraciones en plasma de la hormona pineal bajo las condiciones fotoperiódicas mencionadas anteriormente. Las variaciones circadianas de melatonina se estudiaron en intervalos de dos horas en periodos comprendidos entre 21:00 h y 04:00 h y de tres horas entre las 04:00 h y las 21:00 h.

Se representa la ecuación general de una función senoidal (1) y la ecuación de la función senoidal para el ritmo circadiano de melatonina (2). ($m = y_0$; $A =$ amplitud; $w =$ frecuencia; $D =$ desfase).

$$(1) y(t) = m + A \text{ sen}(w t + D)$$

$$(2) y(t) = 46,75 + 62,91 \text{ sen}(0,312t - 0,10)$$

Tal como se indica con la figura 5, se observó que la mayor concentración en plasma, es decir la acrofase, se encuentra entorno a las 02:00 h con una concentración de 137,8 pg/ml y el nadir, momento de ritmo en que la concentración es mínima, es entorno, a las 16:00 h con una concentración de 3,38 pg/ml. El mesor (valor medio del parámetro fisiológico estudiado en el ritmo) fue de 46,75 pg/ml.

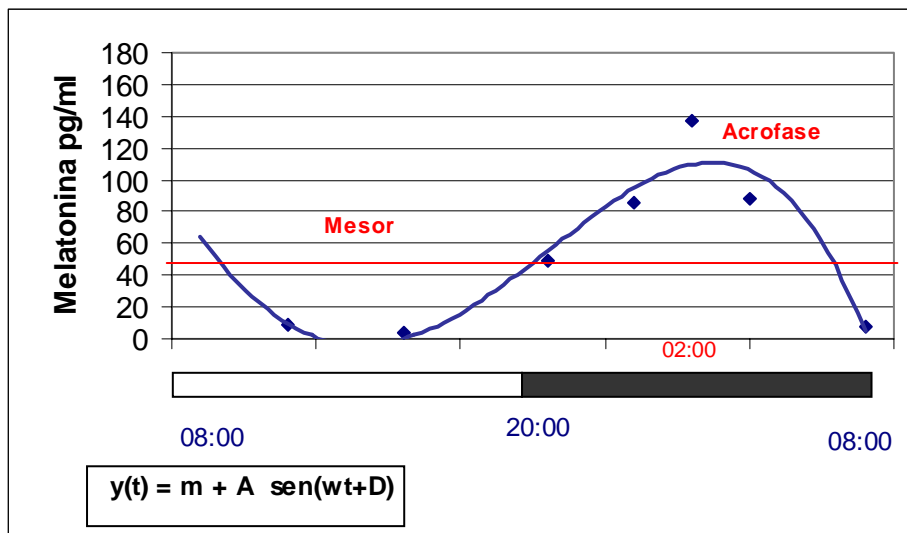


Figura 5. Representación gráfica de la función senoidal de secreción de melatonina plasmática en *Streptopelia roseogrisea*, bajo un fotoperíodo constante de doce horas alternado con doce horas de oscuridad, n=10.

1.3 FUNCIÓN FAGOCÍTICA DE HETERÓFILOS.

Los valores que se muestran a continuación son relativos (%) resultando de considerar para todos los factores estudiados que la media del control es 100. Con esto se normaliza los datos y se eliminan las diferencias interindividuales.

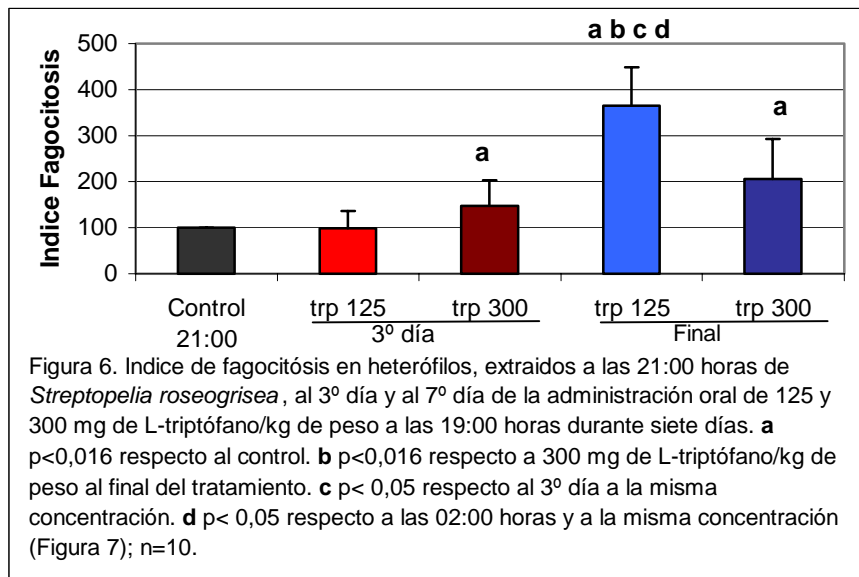
Dicho estudio sobre la función fagocítica se realizó durante la administración oral de L-triptófano a las 19:00 h y las 09:00 h.

1.3.1 Función fagocítica de heterófilos tras la administración oral de L-triptofano a las 19:00 h.

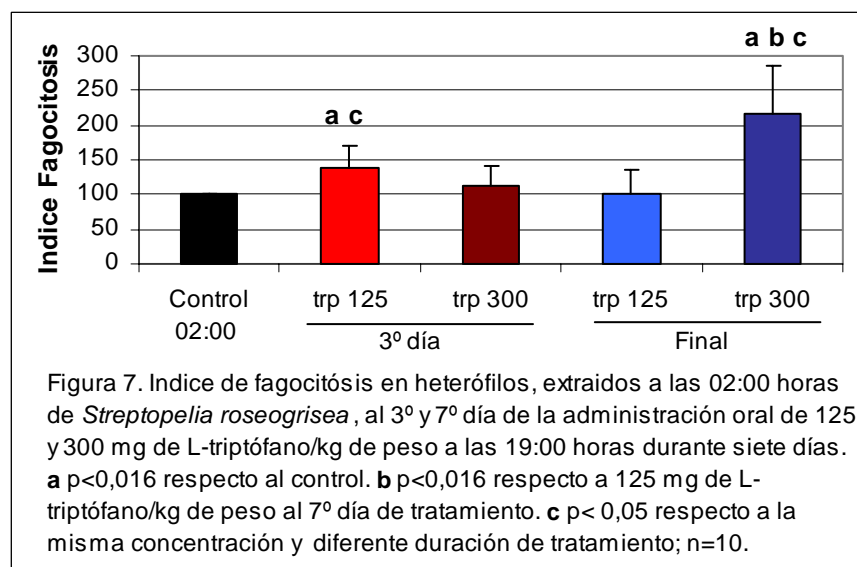
1.3.1.1 Índice de fagocitosis.

La capacidad de los heterófilos de *Streptopelia roseogrisea* de ingerir bolas de látex se cuantificó a través del Índice de fagocitosis que representa el nº de bolas de látex fagocitadas por 100 heterófilos. Los resultados se expresaron en relación al control (animales sin tratamiento de triptófano, sólo recibían el excipiente metil -celulosa).

En la figura 6, se muestra el Índice de fagocitosis de heterófilos extraídos a las 21:00 h tanto a la mitad (tercer día) como al final (séptimo día) del tratamiento procedente de animales que se encontraban bajo la administración de 125 y 300 mg de L-triptófano/ kg de peso a las 19:00 h. Tras el análisis estadístico se encontró un incremento significativo ($p < 0,016$) de la fagocitosis cuando los heterófilos provenían de animales que habían sido tratados a las 19:00 h con 300 mg de L-triptófano/kg de peso tanto a la mitad como al final de tratamiento con respecto al control. Tras la administración de 125 mg de L-triptófano/kg de peso se observó aumentos significativos ($p < 0,016$) respecto al control y a 300 mg de L-triptófano/kg de peso al final del tratamiento, además con 125 mg de L-triptófano/kg de peso también se observa al final del tratamiento aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a los heterófilos de animales tratados con esta misma concentración pero extraídos al tercer día del tratamiento y con los extraídos a las 02:00 h (Figura 7).

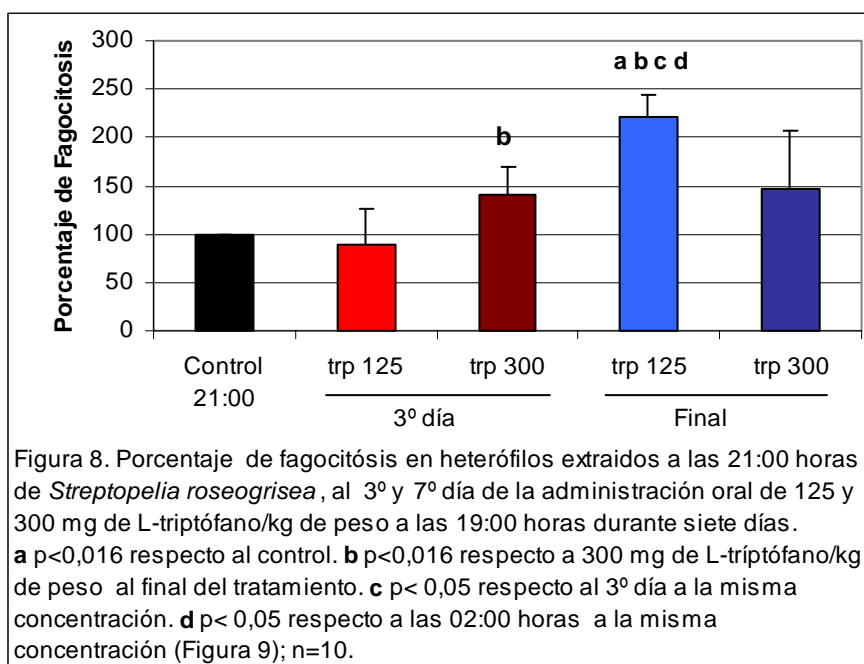


En la figura 7 se representa gráficamente el Índice de fagocitosis de los heterófilos extraídos a las 02:00 h tanto a la mitad como al final del tratamiento con 125 y 300 mg de L-triptófano/kg de peso a las 19:00 h. Se aprecia un aumento significativo ($p < 0,016$) a mitad de tratamiento con 125 mg de L-triptófano/ kg de peso respecto a su control y un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a los resultados obtenidos en esa misma concentración pero de heterófilos extraídos a la 21:00 h (figura 6). Al final del tratamiento se observa un aumento significativo ($p < 0,016$) tras la administración de 300 mg de L-triptófano/ kg de peso frente a su correspondiente control y respecto a la concentración de 125 mg de L-triptófano junto a un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a los resultados obtenidos con esa misma concentración a la mitad del tratamiento.



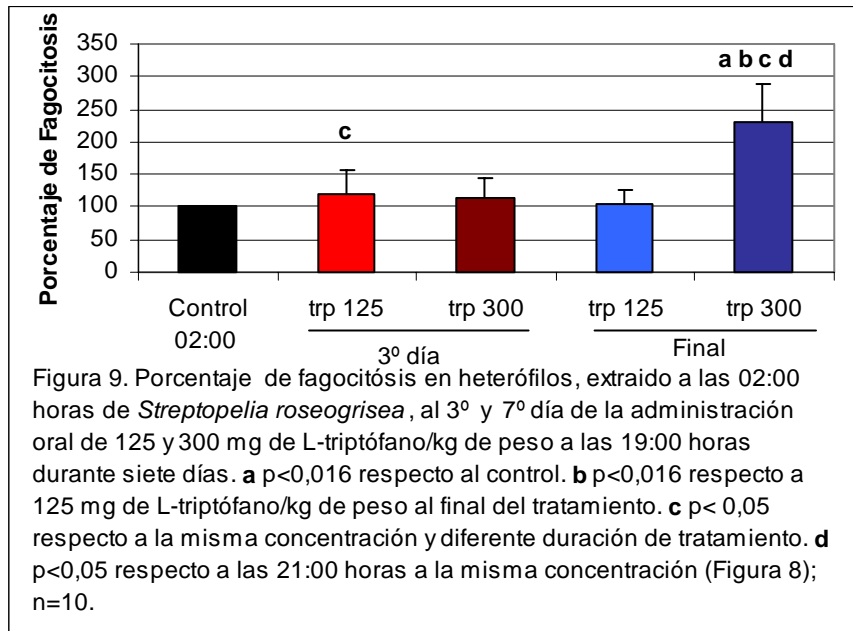
1.3.1.2 Porcentaje de fagocitosis.

El Porcentaje de fagocitosis representa el % de heterófilos que han fagocitado al menos una bola de látex. Las figuras 8 y 9 representan los resultados obtenidos a las 21:00 h y 02.00 h respectivamente al tercer y séptimo día de tratamiento con 125 y 300 mg de L-triptófano/kg de peso administrado a las 19:00 h. En la gráfica 8 se observan las variaciones significativas ($p < 0,016$) en los heterófilos extraídos a las 21:00 h a mitad del tratamiento con 300 mg de L-triptófano/kg de peso respecto a 125 mg de L-triptófano/kg de peso. Al final del tratamiento se observa un aumento significativo ($p < 0,016$) del grupo de 125 mg de L-triptófano respecto a su correspondiente grupo control y al grupo de animales tratados con 300 mg L-triptófano / kg de peso. Además de un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a los de la mitad del tratamiento con esta misma concentración de 125 mg de L-triptófano/kg de peso y un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a los extraídos a las 02:00 h (Figura 9).



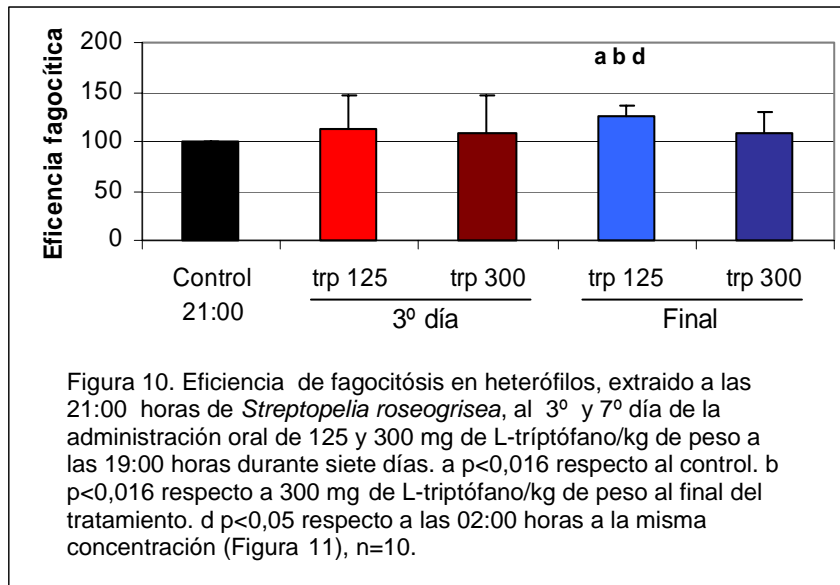
En la figura 9 se representa gráficamente el Porcentaje de fagocitosis de los heterófilos extraídos a las 02:00 h, a mitad y final de la administración de diferentes concentraciones de L-triptófano. A la mitad de tratamiento, se ha observado un aumento significativo ($p < 0,05$) con la concentración de 125 mg L-triptófano/kg de peso, con respecto a los heterófilos extraídos, a mitad de tratamiento y a las 21:00 h (figura 8).

Al final del tratamiento se observa con la concentración de 300 L-triptófano/ kg de peso, un aumento significativo ($p < 0,05$) frente a todas las variaciones de pauta ensayadas así como respecto al control y 125 mg de L-triptófano ($p < 0,016$).



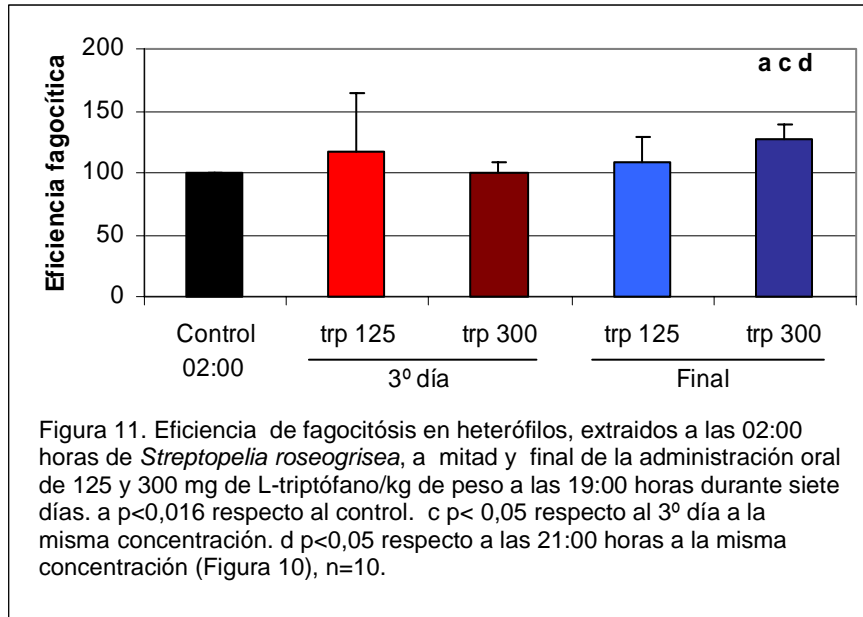
1.3.1.3 Eficiencia de fagocitosis.

La Eficiencia de la fagocitosis, representa el cociente entre el Índice de fagocitosis y el Porcentaje de fagocitosis. En las figuras 10 y 11 se representa cuando las extracciones de los heterófilos fueron realizadas a las 21:00 h y 02:00 h respectivamente. En la figura 10 se observa que los heterófilos extraídos a las 21:00 h al final del tratamiento de 125 mg de L-triptófano/kg de peso, presentan un aumento significativo ($p < 0,016$) respecto a la otra concentración ensayada y respecto a su grupo control. Además con 125 mg de L-triptófano/kg de peso al final del tratamiento se aprecia un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a los extraídos a las 02:00 h con la misma concentración y duración del tratamiento (Figura 10).



En la figura 11 se representa gráficamente la Eficiencia de fagocitosis de los heterófilos extraídos a las 02:00 h, a mitad y final de la administración de diferentes concentraciones de L-triptófano. A la mitad de tratamiento no se observa variación significativa con ninguna de las concentraciones ensayadas de L-triptófano.

Sin embargo, al final del tratamiento se observa con la administración de 300 mg de L-triptófano un ascenso significativo ($p < 0,05$) respecto a la mitad del tratamiento así como respecto a su correspondiente grupo de las 21:00 h bajo administración de 300 mg (Figura 10). Además, se aprecia un aumento significativo ($p < 0,016$) con 300 mg respecto a su control.



1.3.2 Función fagocítica tras la administración oral de L-triptófano a las 09:00 h.

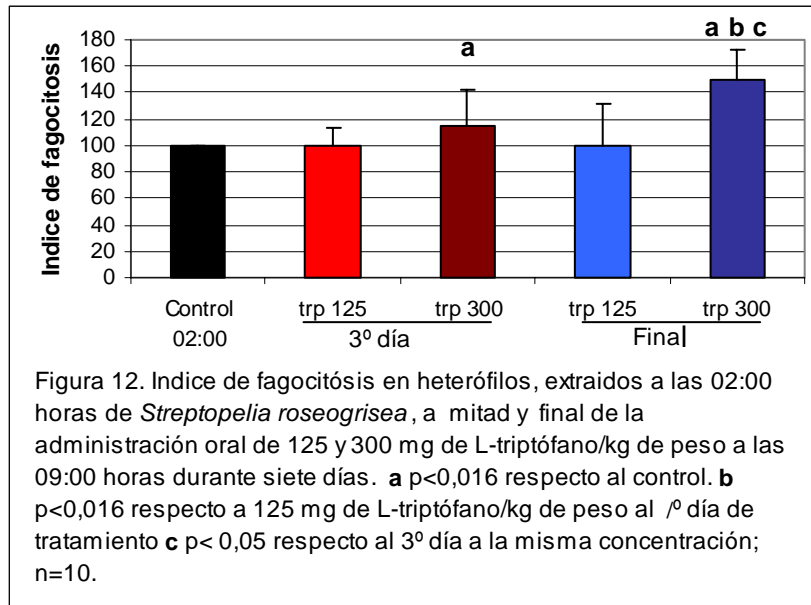
Los valores que se muestran son relativos (%) resultando de considerar para todos los factores estudiados que la media del control es 100. Con esto se normaliza los datos y se eliminan las diferencias interindividuales.

1.3.2.1 Índice de fagocitosis.

La figura 12 representa el Índice de fagocitosis tras la administración a las 09:00 h de 125 y 300 mg L-triptófano / kg de peso, a mitad y final del tratamiento. El análisis estadístico de los datos revela a mitad de tratamiento un claro aumento significativo ($p < 0,016$) en los heterófilos de los animales que recibieron 300 mg de L-triptófano/kg de peso respecto al grupo control.

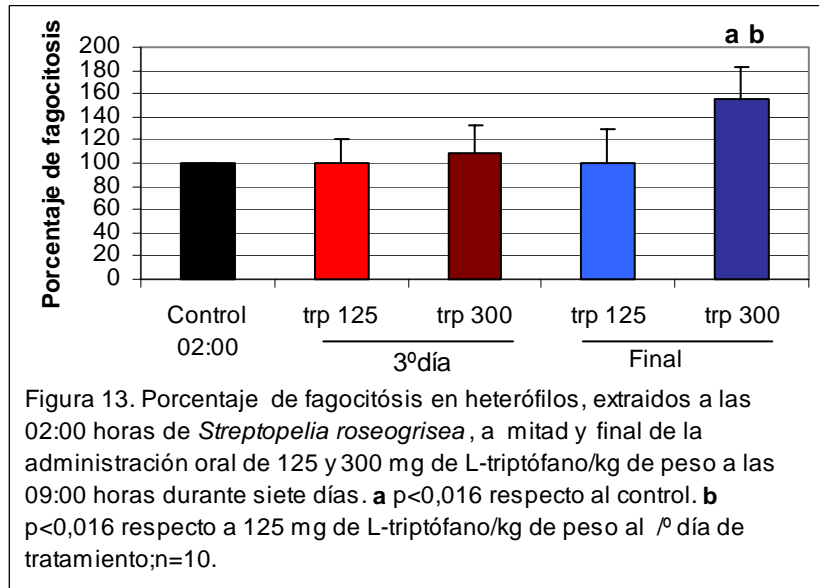
Con respecto al final del tratamiento se observa un aumento significativo ($p < 0,016$) tras la administración de 300 mg respecto a su correspondiente control así como respecto a la concentración de 125 mg ($p < 0,016$).

Además se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) con la administración de 300 mg del aminoácido/kg de peso, cuando se compara con su correspondiente grupo a mitad de tratamiento.



1.3.2.2 Porcentaje de fagocitosis.

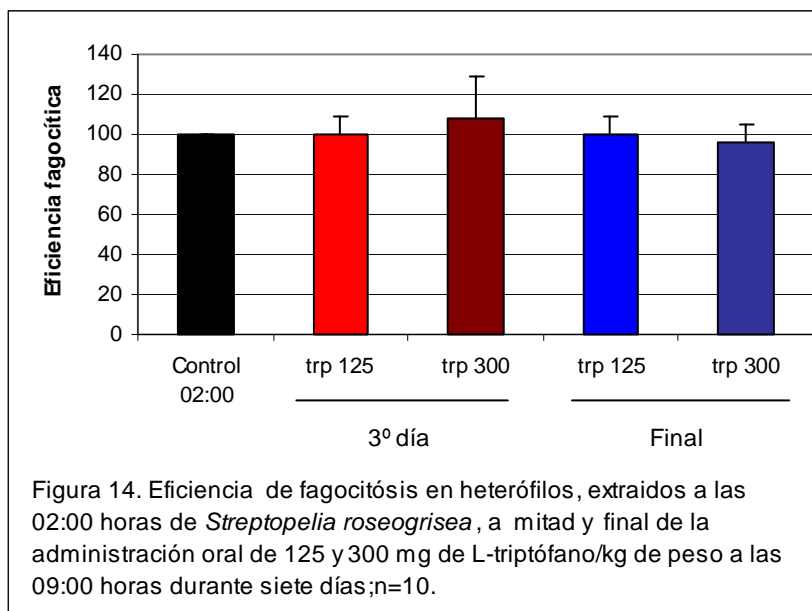
Tras la administración a las 09:00 h de 125 y 300 mg de L-triptófano/kg de peso a mitad y final del tratamiento, en la Figura 13 podemos observar al final del tratamiento de 300 mg de L-triptófano/ kg de peso un aumento significativo ($p < 0,016$) respecto a su correspondiente control y respecto a la otra concentración administrada, al final del tratamiento.



1.3.2.3 Eficiencia fagocítica.

Definida como el cociente de Índice de fagocitosis/ Porcentaje de fagocitosis.

Los resultados de la eficiencia fagocítica se representa en la figura 14 tanto a la mitad como al final de tratamiento las dos concentraciones ensayadas en heterófilos de *Streptopelia roseogrisea*. No se observa ninguna variación estadísticamente significativa.

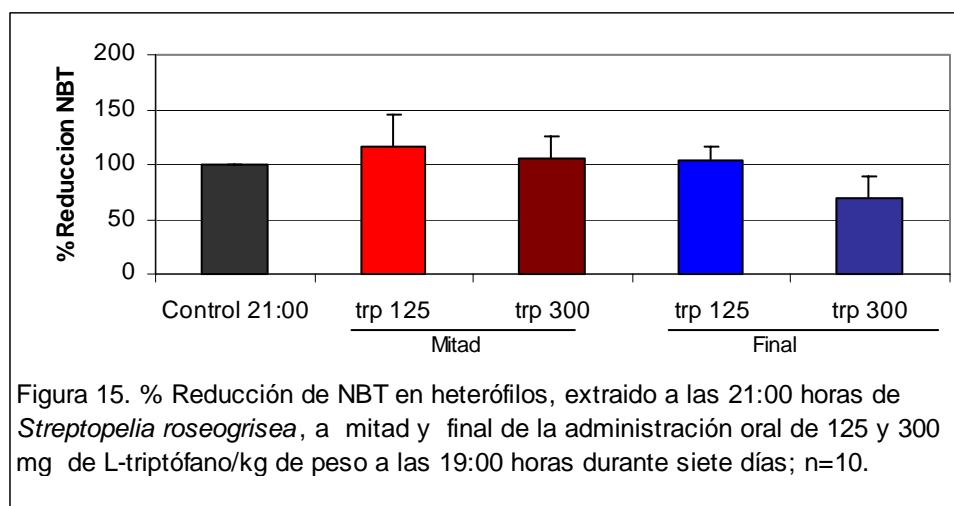


1.4 TEST DE REDUCCIÓN DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO.

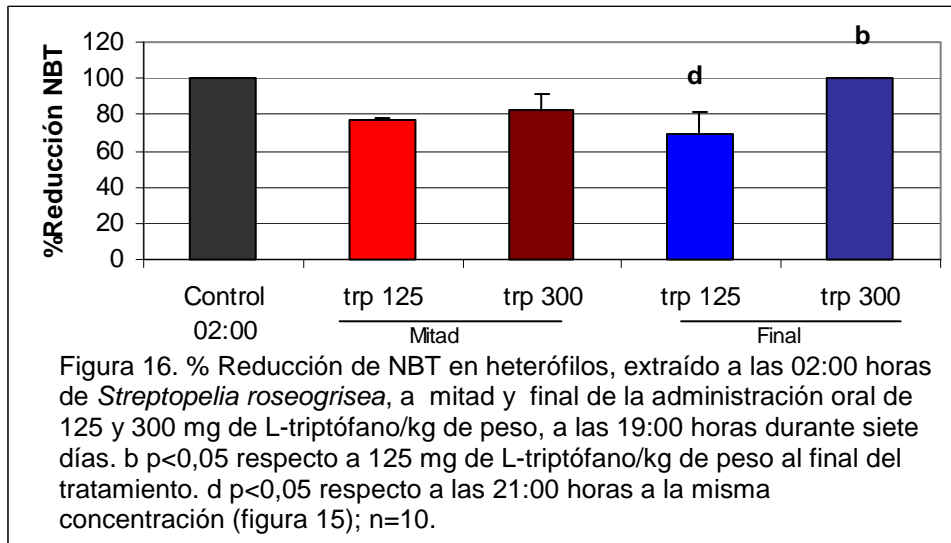
Para el estudio de los niveles de anión superóxido (primer radical libre formado durante el estallido respiratorio que acompaña a la fagocitosis) se analizó el Tést de reducción del NBT, durante la administración de L-triptófano a las 19:00 h y 09:00 h.

1.4.1 Test de reducción de nitroazul de tetrazolio tras la administración oral de L-triptófano a las 19:00 h.

Como muestra la figura 15 los niveles de anión superóxido en heterófilos extraídos a las 21:00 h a animales a mitad y final de la administración oral de 125 y 300 mg de L-triptófano/kg de peso a las 19:00 h, no se observó ninguna variación significativa con ninguna concentración, ni a lo largo del tratamiento.

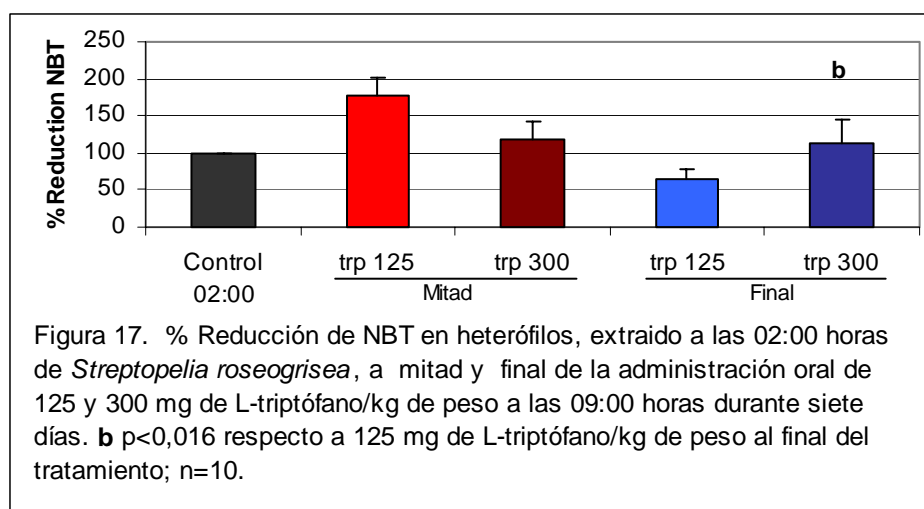


A su vez, en la figura 16 se representan los niveles de anión superóxido en heterófilos extraídos a las 02:00 h en animales que recibieron de forma oral ambas concentraciones. Se observó al final del tratamiento, un aumento significativo ($p < 0,016$) con la concentración de 300 mg de L-triptófano / kg de peso respecto a 125 mg de L-triptófano / kg de peso. Además también, se observa en los heterófilos extraídos al final del tratamiento de 125 mg de L-triptófano/kg de peso un descenso significativo ($p < 0,05$) respecto a los heterófilos extraídos a las 21:00 h, recogidos en la figura anterior (figura 15) a animales con la misma administración.



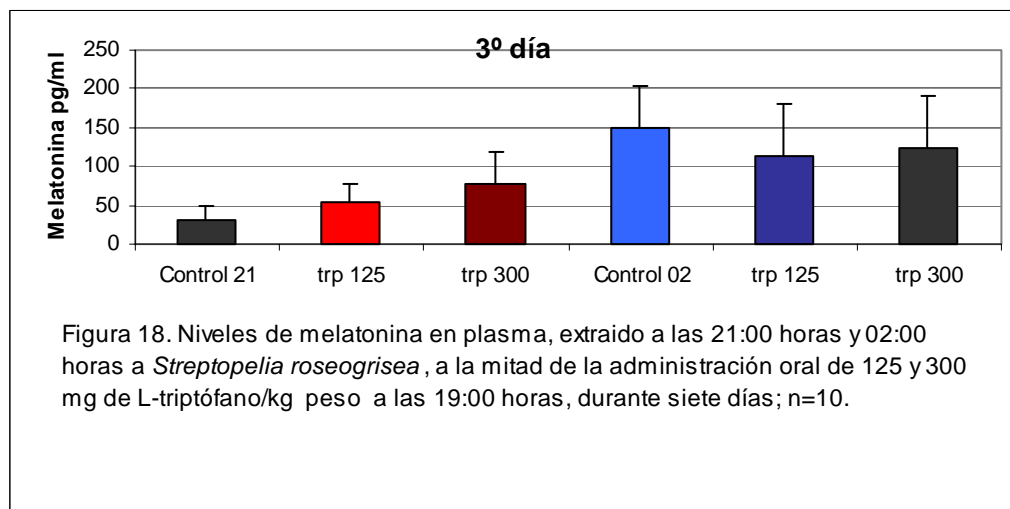
1.4.2 Test de reducción de nitroazul de tetrazolio tras la administración oral de L-triptófano a las 09:00 h.

Para finalizar los resultados de NBT en la figura 17 se representan los niveles de anión superóxido en heterófilos extraídos a las 02:00 h a la mitad y al final de la administración oral a las 09:00 h de las dos dosis de L-triptófano. Se observó al final del tratamiento con 300 mg de L-triptófano/ kg de peso un aumento significativo ($p < 0,016$) respecto a los heterófilos extraídos a los animales que se había administrado 125 mg de L-triptófano/ kg de peso.



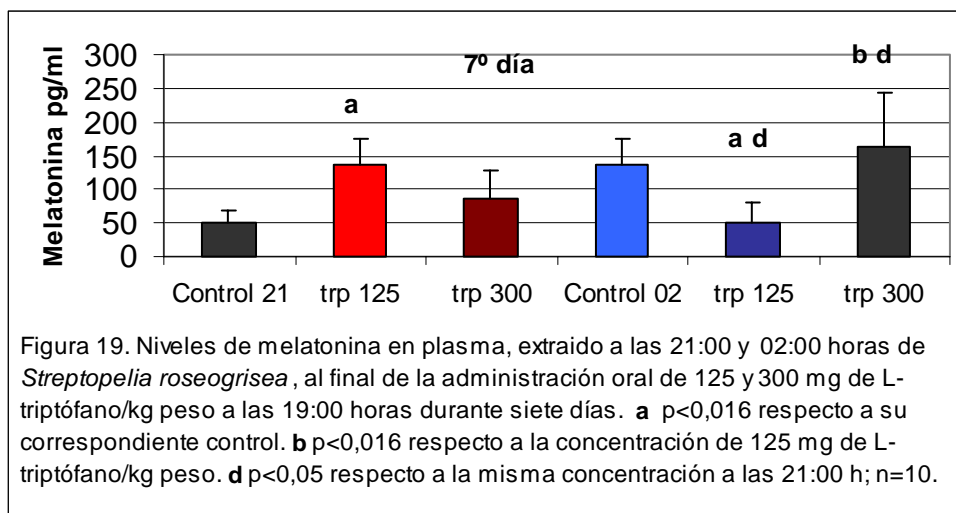
1.5 VARIACIONES NOCTURNAS DE MELATONINA PLASMÁTICA EN ANIMALES CONTROLES Y EN ANIMALES BAJO TRATAMIENTO DE TRIPTÓFANO.

Las variaciones nocturnas de los niveles plasmáticos de melatonina se estudiaron tras la administración durante siete días de 125 y 300 mg de L-triptófano/ kg de peso administradas a las 19:00 h, una hora antes de interrumpirse el periodo de luz. La extracción del plasma se realizó al tercer día y al séptimo día de tratamiento, a las 21:00 h (una hora tras la interrupción de la luz) y a las 02:00 h coincidiendo con la acrofase de melatonina en los niveles plasmáticos de *Streptopelia roseogrisea* en condiciones basales. La figura 18 representa los diferentes valores de melatonina tras el tratamiento con las dos concentraciones ensayadas al tercer día del mismo. Se puede observar como los valores se mantienen uniformes desde el punto de vista estadístico, sin observar variaciones significativas, entre las condiciones basales y las del tratamiento.

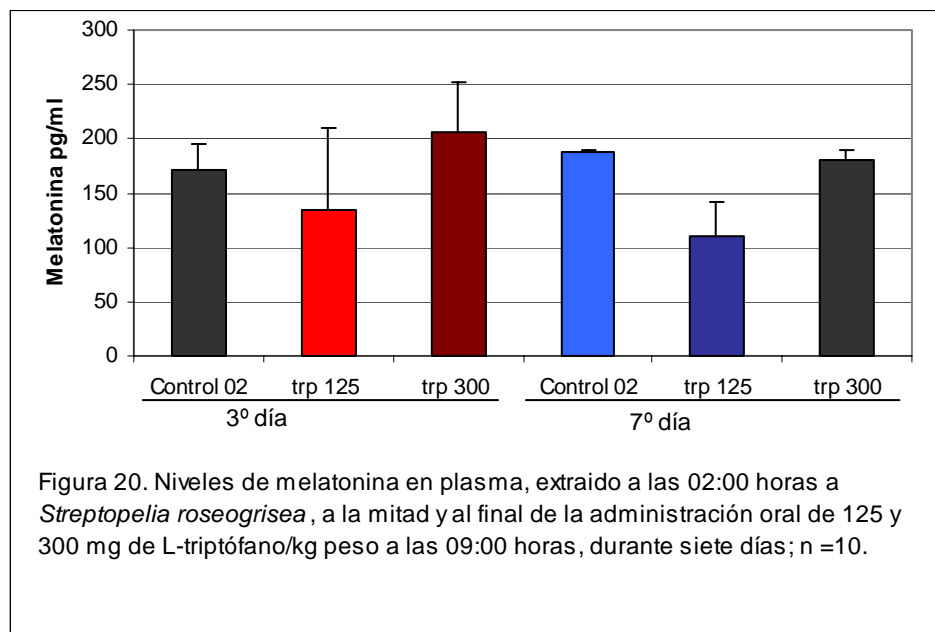


En la figura 19 se representa las concentraciones en plasma de melatonina en animales controles y en los tratados con las dos concentraciones de melatonina de L-triptófano, pero extrayéndose dicho plasma al séptimo día, es decir al final del tratamiento. En el grupo de animales bajo la administración de 125 mg de L-triptófano/kg de peso, a los cuales se les extrajo el plasma a las 21:00 h, se observó un aumento significativo ($p < 0,016$) respecto a su control. A su vez, en los animales sometidos al tratamiento de 300 mg de L-triptófano/kg de peso y extraídos a las 02:00 h

se observó un aumento significativo ($p < 0,016$) respecto al grupo donde la administración de triptófano fue de 125 mg/kg de peso, observándose también con dicha dosis de 300 mg de L-triptófano/kg de peso, un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a los valores extraídos a las 21:00 h con el mismo tratamiento. Respecto a los niveles de melatonina de animales bajo administración de 125 mg de L-triptófano/kg de peso, podemos observar un descenso significativo ($p < 0,016$) respecto al grupo control y respecto a los niveles extraídos a las 21:00 h con el mismo tratamiento ($p < 0,05$).



En la figura 20 se representan las variaciones nocturnas de la hormona pineal tras la administración a las 09:00 h (una hora después de iniciarse el periodo de luz) de 125 y 300 mg de L-triptófano/kg de peso, realizándose la extracción del plasma al 3º día y 7º día de tratamiento, a las 02:00 h (es decir en la acrofase en condiciones basales). Se observa que los valores de melatonina no presentan cambios significativos en los animales con administración de L-triptófano tanto con 125 como con 300 mg de aminoácido / kg de peso respecto al control.



1.6 DETERMINACIÓN DEL RITMO DE ACTIVIDAD-INACTIVIDAD EN *Streptopelia roseogrisea*.

Tras el ajuste y las correcciones pertinentes en el método en condiciones basales, nos dispusimos a estudiar el efecto del aminoácido triptófano en los ritmos de actividad / reposo en dicho modelo animal. Para ello tras consultar la correspondiente bibliografía y resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio, se decidió comenzar con la administración del aminoácido al final del periodo luminoso (19:00 h). La concentración utilizada inicialmente fue de 125 mg de L-triptófano / kg de peso en *Streptopelia roseogrisea*, y el tiempo del estudio se estableció en siete días.

En la figura 21 representamos la actividad acumulada durante 24 horas (20:00 h - 20:00 h), tras la administración oral a las 19:00 h de 125 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días comparado con un grupo control al cual se le administró metilcelulosa.

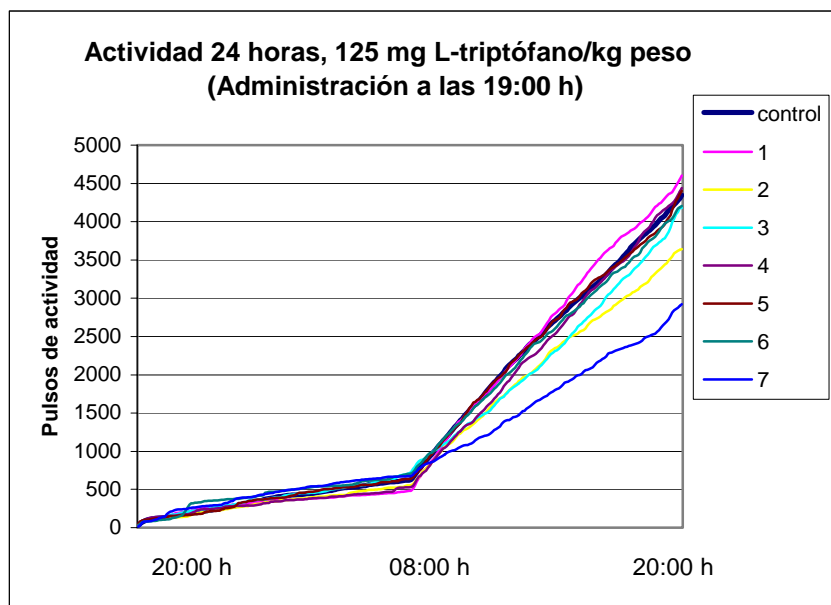


Figura 21. Representación de la actividad acumulada durante 24 horas, tras la administración oral a las 19:00 h de 125 mg de L-triptófano/kg de peso en *Streptopelia roseogrisea* durante 7 días comparado con grupo control, n=10.

Para hacer más inteligible los resultados, analizamos de forma porcentual, la actividad acumulada de cada día de tratamiento y la media total de la actividad acumulada de los siete días, representando de forma separada el periodo de oscuridad (20:00 h -08:00 h) del periodo de luminosidad (08:00 h - 20:00 h).

Los valores que se muestran a continuación son relativos (%) resultando de considerar para todos los factores estudiados que la media del control es 100. Con esto se normaliza los datos y se eliminan las diferencias interindividuales.

En la figura 22, se representa el porcentaje de actividad acumulada en el periodo de oscuridad, apareciendo un descenso significativo ($p < 0,05$) en el primer, segundo, cuarto día de administración y un aumento significativo de actividad ($p < 0,05$) en el sexto día respecto al control, tras la administración oral a las 19:00 h de 125 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días. La actividad media total de los siete días, en el periodo nocturno no indicó ninguna variación significativa respecto al control.

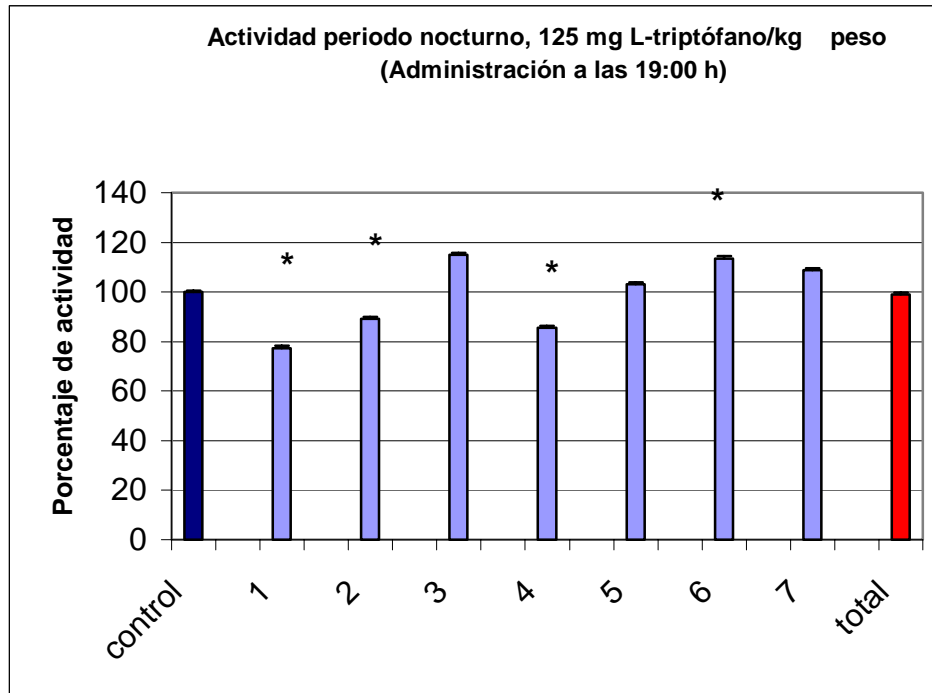


Figura 22. Representación del porcentaje de actividad acumulada, durante el periodo de oscuridad tras siete días de administración oral de 125 mg de L-triptófano/kg de peso a las 19:00 h en *Streptopelia roseogrisea* comparado con grupo control.

* $p < 0,05$ respecto su control, $n=10$.

En la figura 23 se representa la actividad acumulada del periodo diurno (08:00 h - 20:00 h) tras la administración de 125 mg de L-triptófano /kg de peso a las 19:00 h, observando un ascenso de actividad significativa ($p < 0,05$) en el primer día de tratamiento respecto al control y un descenso significativo ($p < 0,05$) en el segundo, tercero, sexto y séptimo día respecto al control. A su vez la actividad media total de los siete días de tratamiento, en el periodo diurno indica un descenso significativo ($p < 0,05$) respecto al control.

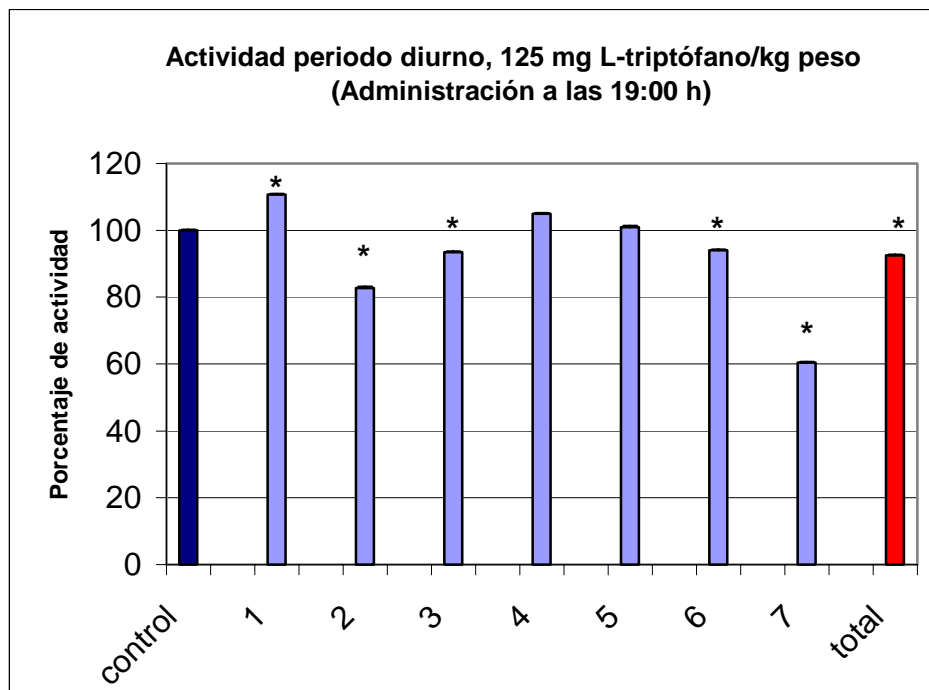


Figura 23. Representación del porcentaje de actividad acumulada, durante el periodo de luz tras siete días de administración oral de 125 mg de L-triptófano/kg de peso a las 19:00 h en *Streptopelia roseogrisea* comparado con grupo control.

* $p < 0,05$ respecto su control.

En la figura 24 representamos la actividad acumulada durante 24 horas (20:00 h - 20:00 h), tras la administración oral a las 19:00 h de 300 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días comparado con un grupo control al cual se le administró metilcelulosa.

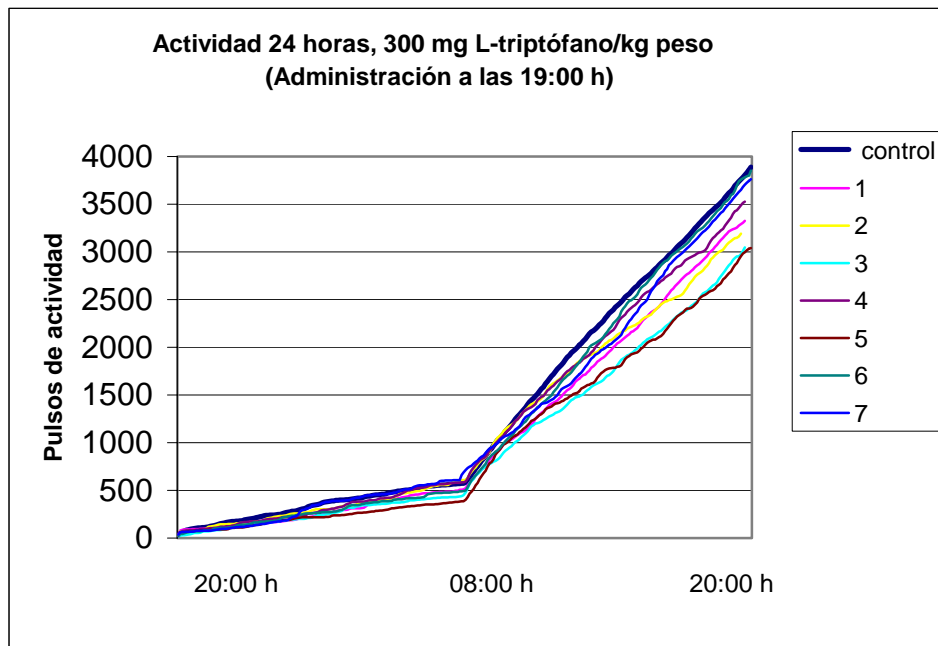


Figura 24. Representación del actividad acumulada durante 24 horas, tras la administración oral a las 19:00 h de 300 mg de L-triptófano/kg de peso en *Streptopelia roseogrisea* durante 7 días, comparado con grupo control, n=10.

Para hacer más inteligible los resultados, analizamos de forma porcentual, la actividad acumulada de cada día de tratamiento y la media total de la actividad acumulada de los siete días, representando de forma separada el periodo de oscuridad (20:00 h - 08:00 h) del periodo de luminosidad (08:00 h - 20:00 h).

Los valores que se muestran a continuación son relativos (%) resultando de considerar para todos los factores estudiados que la media del control es 100. Con esto se normaliza los datos y se eliminan las diferencias interindividuales.

Tras administrar la concentración de triptófano, los resultados obtenidos durante el periodo nocturno se recogen en la figura 25. Se aprecia un descenso significativo ($p < 0,05$) en el primer, tercer, quinto y sexto día de administración y un aumento significativo de actividad ($p < 0,05$) en el séptimo día respecto al control en ese periodo de oscuridad, tras la administración oral a las 19:00 h de 300 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días. La actividad media total de los siete días, en el periodo nocturno no indicó ninguna variación significativa respecto al control.

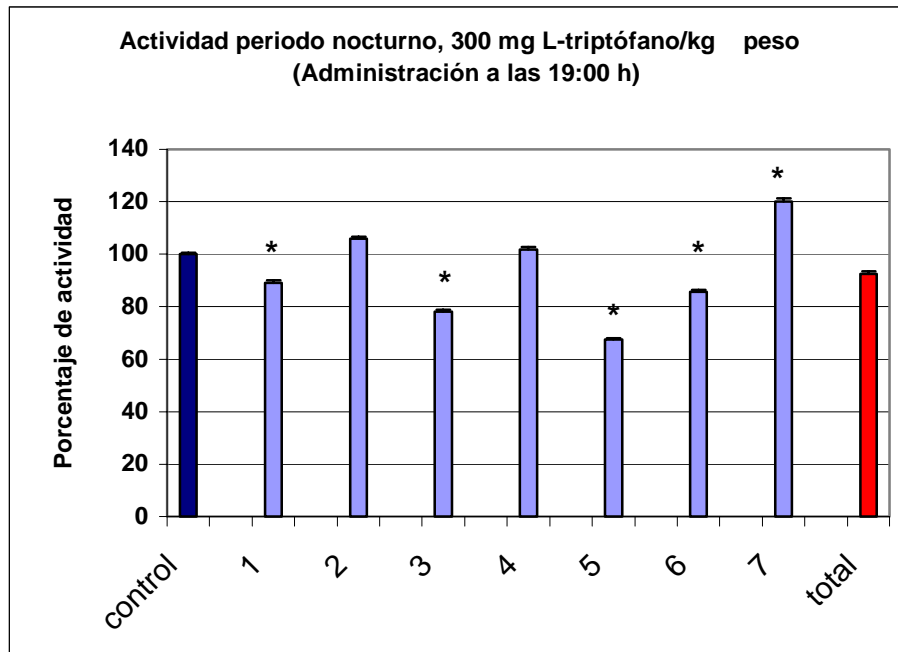


Figura 25. Representación del porcentaje de actividad acumulada, durante el periodo de oscuridad tras siete días de administración oral de 300 mg de L-triptófano/kg de peso a las 19:00 h en *Streptopelia roseogrisea* comparado con grupo control.

* $p < 0,05$ respecto su control, $n = 10$.

En la figura 26 se representa la actividad del periodo diurno (08:00 h - 20:00 h) tras la administración de 300 mg de L-triptófano / kg de peso a las 19:00 h, observando un descenso significativo ($p < 0,05$) en todos días del tratamiento respecto al control a excepción del sexto. A su vez la actividad media total de los siete días de tratamiento en el periodo diurno indica un descenso significativo ($p < 0,05$) respecto al control.

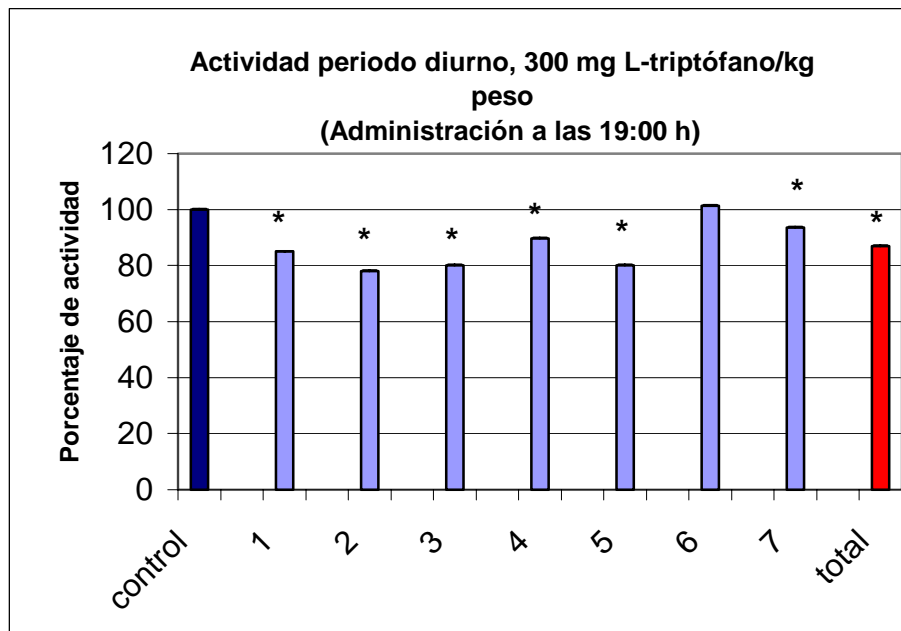


Figura 26. Representación del porcentaje de actividad acumulada, durante el periodo de luz tras siete días de administración oral de 300 mg de L-triptófano / kg de peso a las 19:00 h en *Streptopelia roseogrisea*. * $p < 0,05$ respecto su control, $n=10$.

Finalmente, nos centramos en este estudio en evaluar los cambios de actividad / inactividad cuando la administración de L-triptófano se realizó a las 09:00 h, (una hora después del inicio del periodo de luz).

En la figura 27 representamos la actividad acumulada durante 24 horas (08:00 h - 08:00 h), tras la administración oral a las 09:00 h de 125 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días, comparado con un grupo control al cual se le administró metilcelulosa.

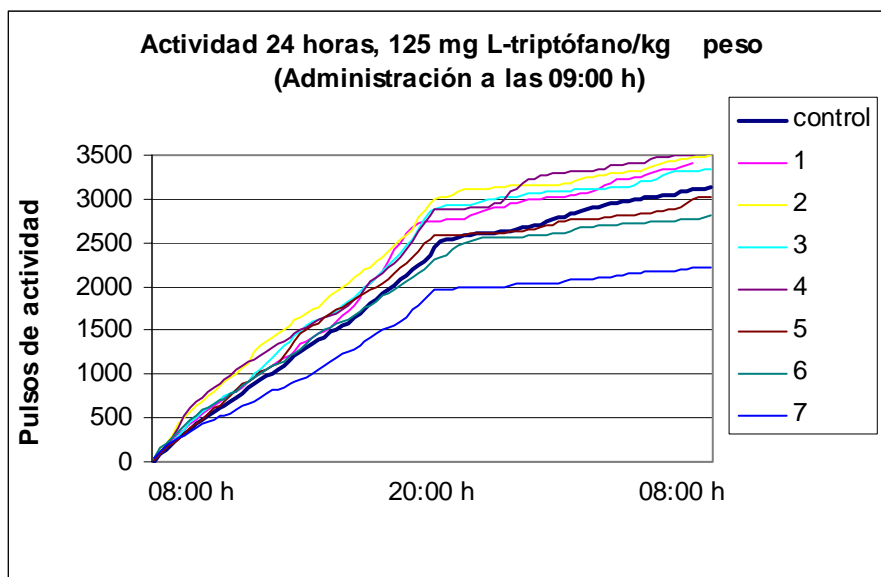


Figura 27. Representación de la actividad acumulada durante 24 horas, tras la administración oral a las 09:00 h de 125 mg de L-triptófano/kg de peso en *Streptopelia roseogrisea* durante 7 días comparado con grupo control, n=10.

Para hacer más inteligible los resultados, analizamos de forma porcentual, la actividad acumulada de cada día de tratamiento y la media total de la actividad acumulada de los siete días, representando de forma separada el periodo de luminosidad (08:00 h - 20:00 h) y el periodo de oscuridad (20:00 h -08:00 h).

Los valores que se muestran a continuación son relativos (%) resultando de considerar para todos los factores estudiados que la media del control es 100. Con esto se normaliza los datos y se eliminan las diferencias interindividuales.

Observando la actividad adquirida sólo en el periodo diurno (08:00 h – 20:00 h), en la figura 28 apreciamos un ascenso significativo ($p < 0,05$) en el tercer día de administración respecto al control y un descenso significativo ($p < 0,05$) en el sexto y séptimo día, tras la administración oral a las 09:00 h de 125 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días. La actividad media total de los siete días, en el periodo nocturno no indicó ninguna variación significativa respecto al control.

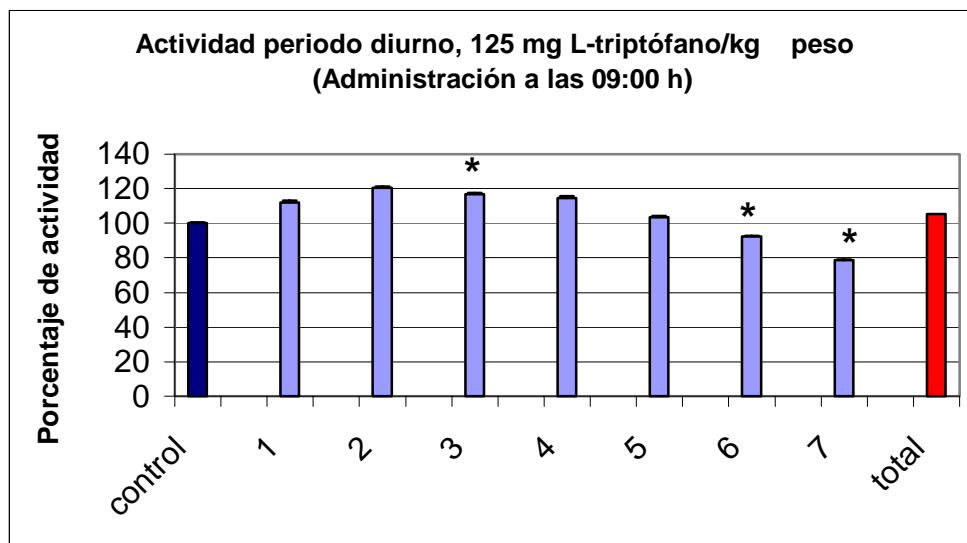


Figura 28. Representación del porcentaje de actividad acumulada, durante el periodo de luz, tras siete días de administración oral de 125 mg de L-triptófano/kg de peso a las 09:00 h horas en *Streptopelia roseogrisea* comparado con grupo control.

* $p < 0,05$ respecto su control, $n=10$.

En la figura 29 se representa la actividad del periodo nocturno (20:00 h - 08:00 h) tras la administración de 125 mg de L-triptófano /kg de peso a las 09:00 h observándose un ascenso de actividad significativa ($p < 0,05$) en el cuarto día de tratamiento respecto al control y un descenso significativo ($p < 0,05$) en el segundo, tercero, quinto, sexto y séptimo día respecto a la actividad del control. La actividad media total de los siete días, en el periodo nocturno no indicó ninguna variación significativa respecto al control.

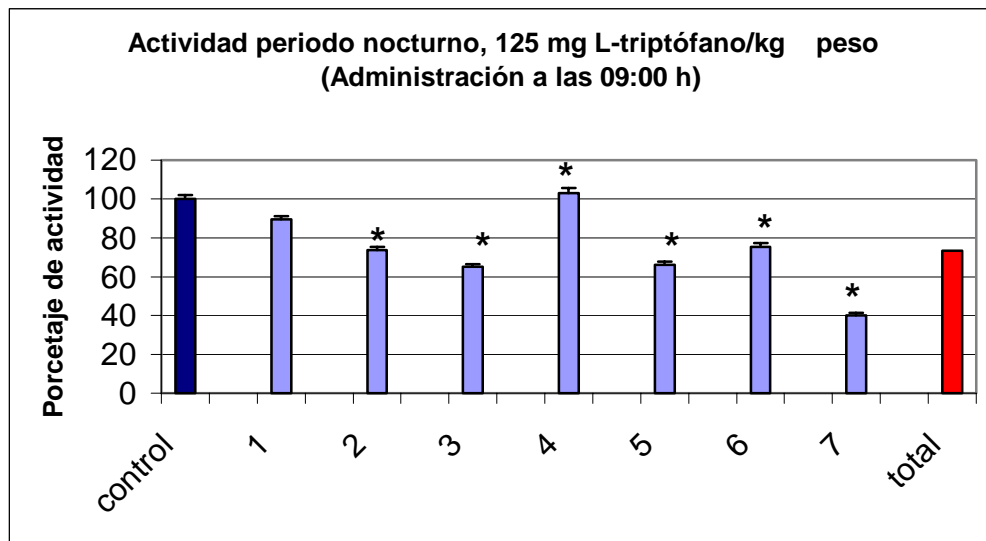


Figura 29. Representación del porcentaje de actividad acumulada, durante el periodo de oscuridad tras siete días de administración oral de 125 mg de L-triptófano/kg de peso a las 09:00 h horas en *Streptopelia roseogrisea*. * $p < 0,05$ respecto su control, $n=10$.

En la figura 30 representamos la actividad acumulada durante 24 horas (08:00 h – 08:00 h), tras la administración oral a las 09:00 h de 300 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días comparado con un grupo control al cual se le administró metilcelulosa.

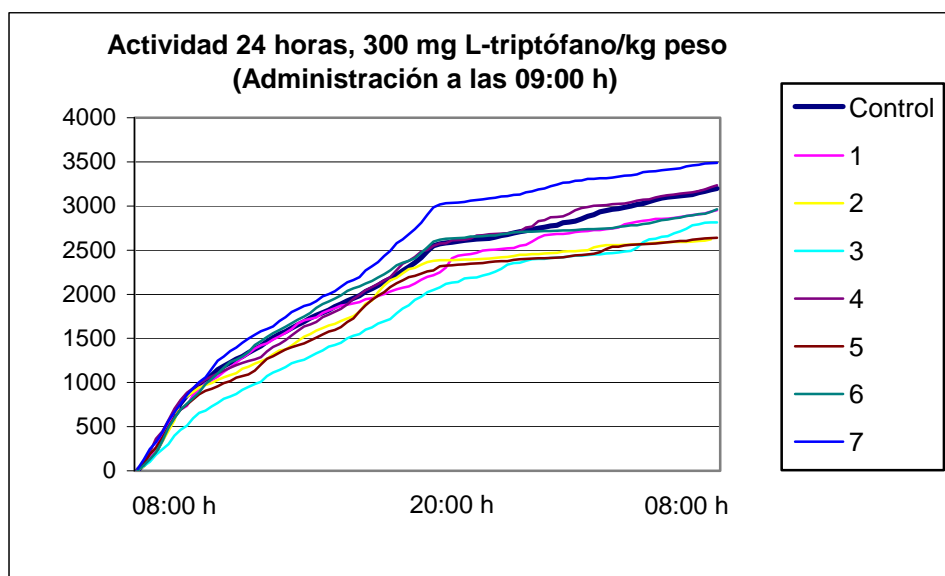


Figura 30. Representación de la actividad acumulada durante 24 horas, tras la administración oral a las 09:00 h de 300 mg de L-triptófano/kg de peso en *Streptopelia roseogrisea* durante 7 días comparado con grupo control, n=10.

Igual que en los resultados anteriores, para distinguir los datos analizados de la actividad acumulada de cada día de tratamiento y la media total de actividad acumulada de los siete días, representamos de forma separada el periodo de luminosidad (08:00 h - 20:00 h) del periodo de oscuridad (20:00 h -08:00 h).

Los valores que se muestran a continuación son relativos (%) resultando de considerar para todos los factores estudiados que la media del control es 100. Con esto se normaliza los datos y se eliminan las diferencias interindividuales.

En la figura 31 se representa la actividad del periodo diurno (08:00 h -20:00 h) tras la administración de 300 mg de L-triptófano / kg de peso a las 09:00 h observando de forma única un ascenso de actividad significativa ($p < 0,05$) en el último día es decir en el séptimo de tratamiento, respecto al control. La actividad media total de los siete días, en el periodo diurno no indicó ninguna variación significativa respecto al control.

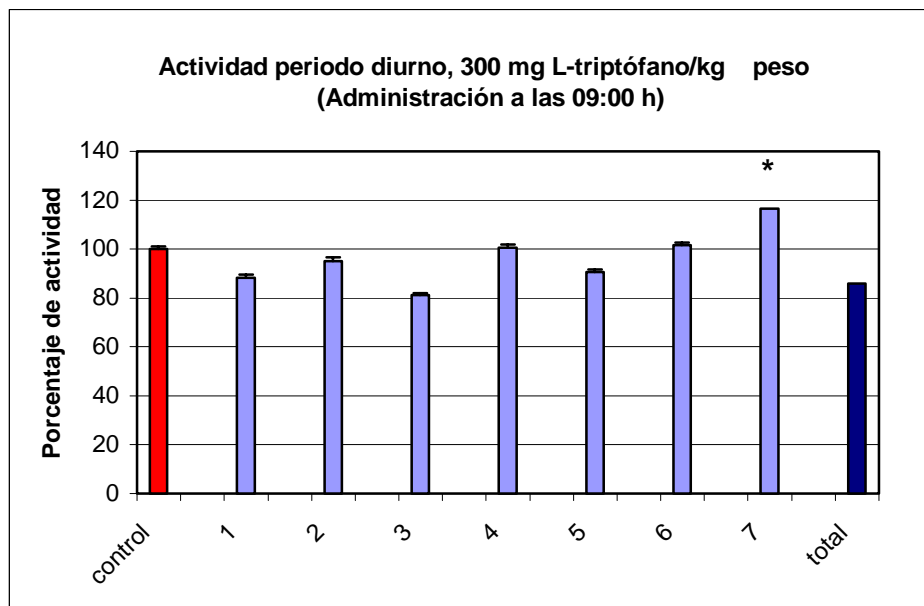


Figura 31. Representación del porcentaje de actividad acumulada, durante el periodo de luz tras siete días de administración oral de 300 mg de L-triptófano/kg de peso a las 09:00 h en *Streptopelia roseogrisea*. * $p < 0,05$ respecto su control, $n=10$.

En la figura 32 se representa la actividad del periodo nocturno (20:00 h - 08:00 h) tras la administración de 300 mg de L-triptófano /kg de peso a las 09:00 h observando un descenso significativo ($p < 0,05$) en el segundo, quinto, sexto y séptimo día, tras la administración oral a las 09:00 h de 300 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días. A su vez, la actividad media total en el periodo nocturno de los siete días de tratamiento indica un descenso significativo ($p < 0,05$) respecto al control.

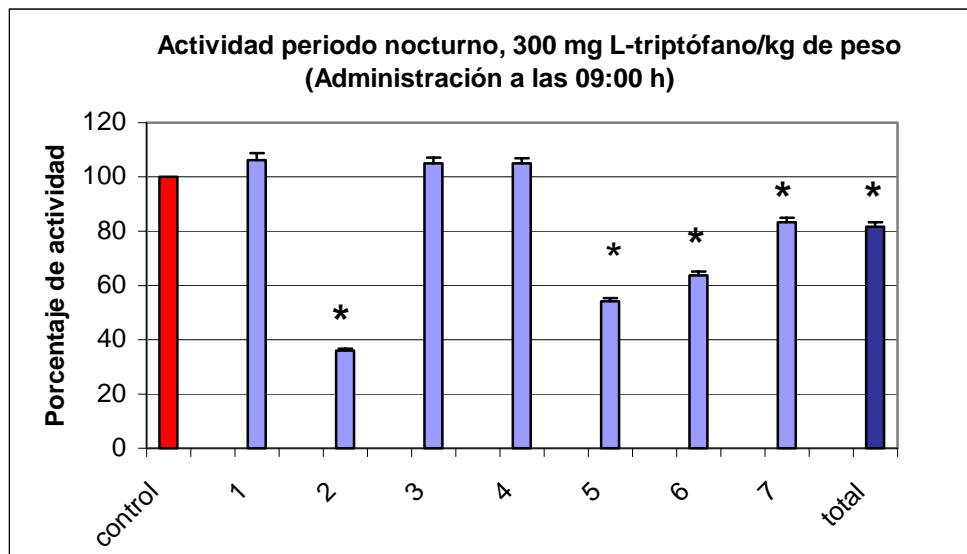


Figura 32. Representación del porcentaje de actividad acumulada, durante el periodo de oscuridad, tras siete días de administración oral de 300 mg de L-triptófano/kg de peso a las 09:00 h en *Streptopelia roseogrisea* comparado con grupo control.

* $p < 0,05$ respecto su control, $n=10$.

BLOQUE 2: RESULTADOS EN HUMANOS.

2.1 Ritmos en orina de los niveles de 6-sulfatoximelatonina en niños lactantes y de sus progenitoras junto con el ritmo de triptófano en leche materna.

2.2 Análisis de parámetros de sueño en niños con lactancia materna.

2.1 RITMOS EN ORINA DE LOS NIVELES DE 6-SULFATOXIMELATONINA EN NIÑOS LACTANTES Y SUS PROGENITORAS, JUNTO CON TRIPTÓFANO EN LECHE MATERNA.

Se realiza el estudio del ritmo a través de la representación de la función senoidal (1) con un periodo de 24 horas, de la excreción del metabolito 6-sulfatoximelatonina procedente del catabolismo hepático de la hormona melatonina y recogido en orina durante el periodo de 24 horas, ($m = y_0$; $A =$ amplitud; $w =$ frecuencia; $D =$ desfase):

$$(1) y(t) = y_0 + A \text{ sen}(wt + D)$$

Observando en nuestro estudio que los niños alimentados exclusivamente con leche materna, tienen un ritmo circadiano con función senoidal (3) representado en la figura 33, a su vez se representa la función senoidal de los niveles del mismo metabolito en orina de sus progenitoras recogidas igualmente durante el periodo de 24 horas (4).

$$(3) y(t) = 11,44 + 8,97 \text{ sen}(0,26t + 6,27)$$

$$(4) y(t) = 9,72 + 16,44 \text{ sen}(0,26t + 4,84)$$

Solapando a las funciones senoidales de 6-sulfatoximelatonina de orina, se representa la función senoidal de los niveles de triptófano en leche materna también recogidos durante el periodo de 24 horas (5).

$$(5) y(t) = 67,95 + 13,12 \text{ sen}(0,26t + 0,78)$$

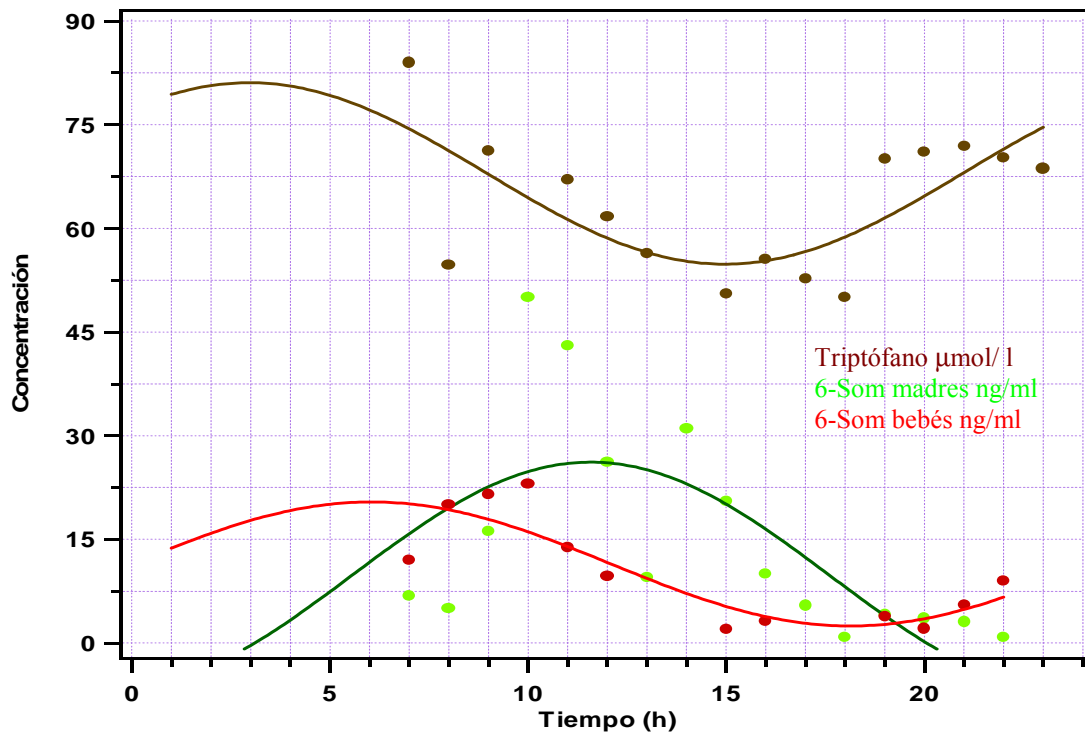


Figura 33. Ritmo de los niveles de 6-sulfatoximelatonina (ng/ml) en orina procedentes de lactantes y de sus madre, junto con los niveles de triptófano ($\mu\text{mol/l}$) en leche materna; n=10.

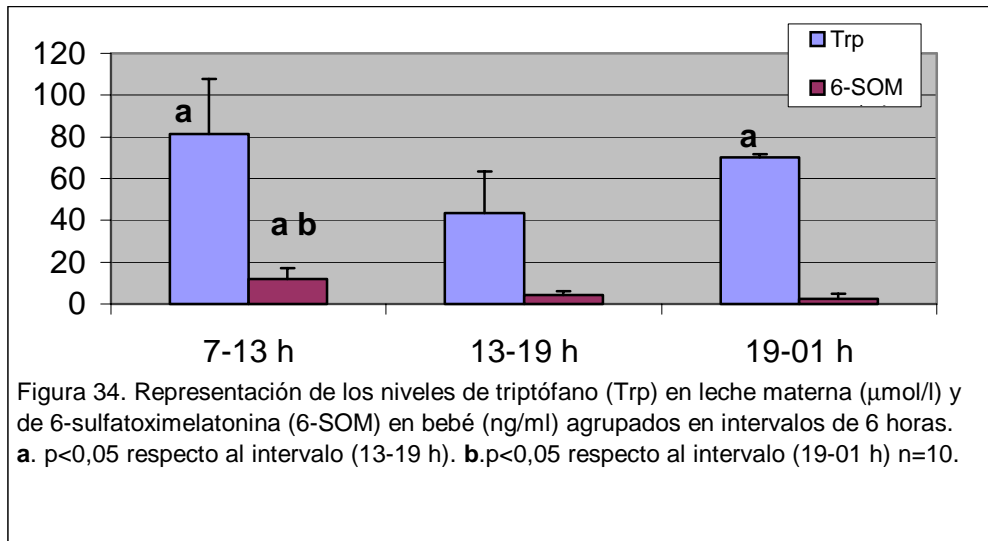
A partir de gráfica 33 podemos observar que las acrofases de 6-sulfatoximelatonina en orina del lactante y la de triptófano en leche materna se encuentran entorno a las 05:00 h, pudiendo indicar en lactantes a través de su ritmo de 6 sulfatoximelatonina su dependencia circadiana, del precursor de la hormona melatonina, es decir el aminoácido triptófano que se encuentra en la leche. Por último podemos reseñar que el ritmo de 6-sulfatoximelatonina en las madres se encuentra desfasado, acrofase entorno a las 12:00 h, respecto al ritmo de 6-sulfatoximelatonina de bebe y a triptófano en leche materna. Los parámetros cronobiológicos quedan recogidos en la tabla I.

Tabla I. Parámetros cronobiológicos de 6-sulfatoximelatonina en orina de bebe y de su progenitora junto con los de triptófano en leche materna; n=10.

Parámetros	Mesor	Acrofase	Nadir
6-Sulfatoximelatonina (Bebé) ng/ml	11,45 ng/ml	06:00 h	18:00 h
6-Sulfatoximelatonina (Madre) ng/ml	9,72 ng/ml	12:00 h	20:00 h
Triptófano (leche materna) μ mol/l	67,95 μ mol/l	03:00 h	15:00 h

En la figura 34 podemos observar los niveles de triptófano en leche materna (μ mol/l) y de 6-sulfatoximelatonina (ng/ml) agrupados en intervalos de 6 horas. Observando un aumento significativo ($p < 0,05$) en los valores de triptófano dentro del intervalo entre 07:00 h - 13:00 h horas respecto al intervalo entre 13:00 h - 19:00 h, además en el intervalo entre las 19:00 h - 01:00 h, se repetía también un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto al intervalo entre las 13:00 h - 19:00 h.

Respecto a la 6-Sulfatoximelatonina en orina de bebé, se podía apreciar en el intervalo entre las 07:00 h - 13:00 h un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto a los otros dos intervalos estudiados, el de las 13:00 h - 19:00 h y el de las 19:00 h - 01:00 h.



2.2 ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE SUEÑO EN NIÑOS CON LACTANCIA MATERNA.

Tras adquirir la actividad durante una semana mediante Actiwatch se dispuso a estudiar los siguientes parámetros de sueño:

-Sueño asumido: Periodo de tiempo que transcurre desde que se inicia el sueño, primera disminución radical de actividad, hasta detectar un nuevo incremento de la misma coincidiendo con el despertar.

-Tiempo de sueño real: Periodo de sueño en que la actividad está por debajo de un umbral denominado sensibilidad, descrito para cada individuo.

-Eficiencia de sueño: Porcentaje de tiempo que permanece dormido, entre el periodo de tiempo que permanece en la cuna.

-Latencia de sueño: El tiempo que transcurre desde que se introduce el bebé en la cuna para dormir hasta que este alcanza el sueño.

Los resultados de los análisis de sueño de los catorce niños analizados se recogen en la tabla II.

Tabla II. Parámetros de sueño de niños con lactancia natural (n=14).

PARÁMETROS DEL SUEÑO	X ± D.S.
Sueño asumido	9 h 36 min ± 43 min
Sueño real	8 h 30 min ± 1 h 1,5 min
Periodo nocturno en la cuna	10 h 30 min ± 49 min
Eficiencia de sueño <u>Sueño real/tiempo en cuna</u>	81,4 ± 5,68 %
Latencia de sueño	30 min ± 17,39 min

5. DISCUSIÓN.

Las funciones vitales en la especie humana se encuentran fuertemente controladas por periodicidad circadiana. De hecho, todas las funciones fisiológicas se encuentran en mayor o menor medida bajo control circadiano pero se pueden señalar dos especialmente importantes. La primera es el ritmo de sueño-vigilia; la segunda el ritmo en las funciones del sistema inmunológico. Es sabido que ambas funciones están profundamente relacionadas (Moldofsky, 1997). El desarrollo de la ritmicidad en humanos ya se puede apreciar en el feto durante el embarazo en: el ritmo día / noche, el ritmo respiratorio o en la génesis de esteroides en la adrenal, aunque estos ritmos son dirigidos por la madre. Sin embargo en los recién nacidos los ritmos de actividad / reposo no son apreciados, empezándose a considerarse entre el primer y tercer mes de vida. Así, a las 6 semanas de vida los bebés aumentan la actividad durante el periodo de luz y disminuye respecto al periodo de oscuridad y a las 12 semanas la duración del sueño diurno se encuentra disminuido en comparación con la duración del sueño nocturno. Pero la consolidación no aparece hasta haber transcurrido de 1 a 2 meses de vida (Scott, 2003). Todo ello está íntimamente sincronizado con la consolidación de la secreción hormonal, en especial la de la hormona melatonina la cual como indica Ardura y colaboradores (2003) aparece al final del periodo neonatal, con el consiguiente patrón de secreción de altos valores por la noche y bajos valores durante el día, apareciendo el patrón rítmico de melatonina a partir de la semana decimosegunda de vida (Kennawey y cols., 1992).

1.Experimentación en modelo aviar con hábitos diurnos (“Tórtola turca”, *Streptopelia roseogrisea*).

La funcionalidad del sistema inmune y los ritmos actividad / reposo, al igual que otras funciones corporales, experimentan cambios circadianos y su sincronización reciproca es primordial para la homeostasis.

El sistema inmune se ha estudiado en muchos modelos animales, siendo el modelo aviar excelente para el estudio de la relación entre la glándula pineal y el sistema inmune, ya que se encuentra muy superficial en el encéfalo ocupando un espacio abierto en el cráneo motivo por el cual la pinealectomía es más facil de realizar (Skwarlo-Sonta, 1996, 1999, 2002). En 1994, Rodríguez y Lea estudiaron el efecto en

aves (*Streptopelia roseogrisea*) de la pinealectomía sobre la respuesta inmune inespecífica (proceso fagocítico) y niveles plasmáticos de diversas hormonas. Los resultados indicaron que los animales pinealectomizados poseían ciertas alteraciones en el proceso fagocítico de los heterófilos sanguíneos en comparación con los animales no pinealectomizados. Además, el metabolismo oxidativo de los heterófilos (niveles de anión superóxido), medido a través de la reducción de NBT, mostró un absceso en las aves pinealectomizadas en comparación con los animales con glándula pineal intacta (Rodríguez y cols., 1999).

En nuestro estudio en esta especie aviar, nos hemos centrado en el efecto de la pineal sobre el sistema inmune, además de la repercusión de la hormona pineal sobre los ritmos de actividad / inactividad teniendo en cuenta la posibilidad de comprender mejor los ritmos sueño / vigilia en humanos. Por ello nuestro modelo de experimentación animal debe de poseer, al igual que en nosotros, hábitos diurnos. Como se ha indicado anteriormente en la epífisis se sintetiza la melatonina, siguiendo un ritmo circadiano a partir de su precursor el aminoácido triptófano. Se han realizado diferentes estudios sobre la relación entre el sistema inmune y la melatonina en ratas de laboratorio, pero debido a que este animal tiene hábitos nocturnos, pensamos que no es el modelo más adecuado en el estudio de los ritmos de actividad / reposo, y por ello elegimos el modelo aviar de hábitos similar a humanos con el ciclo de reposo durante la noche.

Centrando nuestra atención en las investigaciones realizadas hasta el momento sobre la conexión: melatonina-sistema inmune, reseñar los trabajos realizados por Reiter y colaboradores (2000), los cuales muestran que la melatonina es un buen secuestrador de radicales libres y un excelente antioxidante endógeno, además de modulador de ritmos circadianos.

Respecto al segundo objetivo planteado al inicio, sobre los ritmos de actividad/inactividad en animales de experimentación queda comprobado en investigaciones anteriores que tras la administración del triptófano precursor de la hormona melatonina, se aumentaban los niveles de esta hormona en el organismo, interviniendo en el ciclo actividad / reposo y en la consolidación de los ritmos circadianos. Estos resultados han sido observados por diversos autores: con 150 o 300

mg de L-triptófano/kg de peso en pollos y ratas (Huether y cols., 1992; Herichova I. y cols., 1998) o de 50, 100 o 250 mg de L-triptófano/kg de peso en ratas (Jaworek, 2003) o en los abundantes ensayos en humanos (Demisch K. y cols., 1987; Hajak y cols., 1991; Brzozowski y cols., 1997) con dosis de administración entre 1 y 5 g de triptófano.

Basándonos en estos antecedentes, nos planteamos las siguientes cuestiones a realizar en *Streptopelia roseogrisea*, en etapas iniciales de desarrollo:

- ¿Sería capaz el aminoácido triptófano de incrementar la actividad fagocítica en heterófilos bien directamente o a través de la hormona melatonina circulante?
- ¿Cómo afecta la administración oral de aa triptófano sobre los radicales libres producidos en el “estallido respiratorio” tras la fagocitosis en estas células inmunes?
- ¿Cómo afecta este aminoácido, en las etapas iniciales del desarrollo de estas aves, a los niveles fisiológicos de la hormona melatonina circulante?
- Y finalmente ¿se podría a través de la ingesta de triptófano influir en el ritmo de actividad / reposo en nuestro modelo animal?

1.1 Función fagocítica, metabolismo oxidativo y niveles de melatonina circulante.

Por tanto y para desarrollar la primera cuestión que nos planteamos en este estudio, nos propusimos conocer el efecto *in vivo* de las concentraciones farmacológicas de 125 y 300 mg de L-triptófano/kg de peso en *Streptopelia roseogrisea* sobre la respuesta inmune inespecífica centrándonos en la principal célula fagocítica sanguínea, que en las aves son los granulocitos heterófilos. Así mismo quisimos valorar los efectos que se alcanzarían tras la administración de triptófano en el estrés oxidativo colateral generado por dichas células fagocíticas en la defensa ante partículas extrañas.

Las concentraciones ensayadas del aminoácido triptófano en este estudio (125 y 300 mg/kg de peso) han sido elegidas en base a las previamente ensayadas por Huether y colaboradores (1992) y Herichova y colaboradores (1998) en pollos: En los trabajos desarrollados por estos investigadores se han observado, además, que dependiendo de la hora de administración del triptófano, el efecto que ejerce este aminoácido sobre su producto final, la melatonina, es diferente si la elevación de los niveles de esta hormona

se producen antes de iniciarse el periodo de luz, con la consiguiente actuación de la función “sincronizadora” sobre el ritmo circadiano, como si la elevación de la misma se produce dentro del periodo nocturno, momento en que se pone de manifiesto la función “hipnótica” de la melatonina, resultados estos últimos estar también en concordancia con los obtenidos por Valsecia y Magor (1998). En nuestro estudio las horas elegidas para la administración de L-triptófano fueron las 09:00 h (una hora después de iniciar el foto periodo de luz) y las 19:00 h (una hora antes de iniciarse el periodo de oscuridad).

Tras observar que no se aparecían cambios significativos en la temperatura corporal en los animales de experimentación tras la administración de triptófano con ninguna de las concentraciones ensayadas, pasamos a valorar las posibles cambios de peso de los animales. No fue detectando ningún cambio drástico, aunque si fue observado una ligera tendencia al descenso de peso, tras finalizar los siete días de administración con cualquiera de las dos concentraciones ensayadas de triptófano. Finalmente valoramos las posibles variaciones que el aminoácido pudiera tener sobre la función inmune inespecífica, es decir la que realizan las células fagocíticas (heterófilos en nuestro caso) valorando para ello la capacidad que presentan las mismas en ingerir y destruir antígenos.

- Administración de 125 mg de L-triptófano / kg de peso, durante 7 días, a las 19:00 h.

Los resultados obtenidos en este estudio indican un claro incremento en la capacidad de ingerir bolas de látex (Índice de fagocitosis) cuando las células eran extraídas a las 21:00 h en el grupo de animales que fue administrado con la dosis de 125 mg de L-triptófano/kg de peso a las 19:00 h durante 7 días con respecto a animales libres de tratamiento. Con la misma pauta y dosis de administración y a esa hora de obtención de heterófilos, se observa también tanto un incremento en el número de heterófilos activos como en presentar una mayor capacidad en ingerir antígenos, datos que son obtenidos a través del porcentaje y eficiencia fagocítica respectivamente. Sin embargo, cuando se analizan los resultados obtenidos con la misma concentración e igual tiempo de tratamiento en la producción de anión superóxido (primera especie reactiva de oxígeno que aparece en el estallido metabólico en estas células tras la

ingestión del antígeno) no se observan variaciones. Es decir, que la administración oral del triptófano siguiendo esta pauta ha sido capaz de provocar una inmunoestimulación sin aumentar los niveles de radicales libres en estas células fagocíticas.

A la vista de todo lo expuesto podríamos suponer que la no subida de anión superóxido (medido a través de la reducción de NBT) se podría deber a la acción “scavenger” de la hormona melatonina. Es decir la ingesta de triptófano a las 19:00 h al ser capaz de elevar los niveles circulantes de melatonina, sería la causa de la inmunoestimulación y de que no aumentaran los niveles de radicales libres gracias a la propiedad antioxidante que presenta esta hormona (Terrón y cols., 2004). Además los valores observados de hormona melatonina en plasma, tras el tratamiento, son más elevados a las 21:00 h que a las 02:00 h (acrofase en condiciones basales) cabría pensar que el triptófano administrado durante siete días es capaz de cambiar el ritmo circadiano de la hormona melatonina, adelantando la acrofase en los niveles nocturnos. Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos en ratas por (Sánchez y cols., 2004), ya que en estos animales se ha observado que tras 21 días de administración de triptófano se producen cambios en el ritmo diario de melatonina. Es decir, que independientemente de si el animal posee hábitos diurnos o nocturnos, a través del aminoácido triptófano en su dieta se puede alterar el ritmo circadiano de la hormona melatonina.

Cuando se obtuvieron datos a mitad del tratamiento con esta misma concentración de aa (es decir al tercer día de su administración a las tórtolas), los resultados más patentes, indican un incremento del Índice fagocítico, cuando el triptófano fue suministrado a los animales a las 19:00 h y los heterófilos aislados a las 02:00 h aunque los valores de melatonina circulante a esta misma hora no se encuentran aumentados. Es decir y al igual que se ha comentado anteriormente, el triptófano ha provocado un cambio en el ritmo de producción de melatonina al igual que sugiere (Huether y cols., 1992). Y como sugiere Barriga y colaboradores (2002) la hormona sólo realizará su función cuando coincida con el número idóneo de receptores para ello en las células inmunes. Esto podría ser la causa de que sólo en un determinado espacio de tiempo encontremos una inmunoestimulación.

Para concluir, indicar que el análisis de hormona melatonina plasmática, se pone de manifiesto que tras la elevación de los niveles hormonales a las 21:00 h los niveles quedan descompensados más tarde es decir a las 02:00 h, cambiando el ritmo de hormona circulante en cuanto a su acrofase y manteniendo su nivel sanguíneo a modo de “vasos comunicantes” sin alterar la homeostasis endocrina.

-Administración de 125 mg L-triptófano / kg de peso, durante 7 días, a las 09:00 h.

Cuando se profundiza en los resultados obtenidos a esta misma concentración de triptófano (125 mg/kg de peso) durante siete días de tratamiento pero a distinta hora de administración del aa, es decir a las 09:00 h, se observa que no aparecen cambios ni en la capacidad de ingerir antígenos, ni en la producción de anión superóxido así como la concentración de melatonina circulante con respecto a los animales libres de tratamiento cuando la administración coincide con el inicio del periodo luminoso. Es decir, es probable que el momento de la administración del aminoácido durante un periodo de tiempo prolongado sea fundamental no sólo para actuar sobre la respuesta inmune sino también para influir en los pinealocitos en la producción de melatonina.

-Administración de 300 mg de L-triptófano/kg de peso, durante 7 días, a las 19:00 h y 09:00 h.

Cuando nos centramos en los resultados obtenidos en la capacidad fagocítica de los heterófilos que han sido aislados de animales a los que se les ha administrado tanto a 09:00 h como a las 19:00 h, 300 mg de L-triptófano / kg de peso durante siete días de tratamiento, se observa una estimulación en el índice de fagocitosis de estas células a todas las hora del día en que se llevaron a cabo las extracciones, aunque hay que señalar que la máxima estimulación se apreció en los heterófilos aislados a las 02:00 h en los que se observan como “handicap” un aumento de los niveles de anión superóxido tras la fagocitosis (% de reducción del NBT), acarreado el posible estrés oxidativo en tejidos adyacentes.

Es decir, la melatonina a las 02:00 ha conseguido estimular a los fagocitos, pero no consigue una acción defensiva de secuestro sobre el exceso de radicales libres. Por tanto quedaría descoordinada la acción antioxidante frente la inmunestimulante.

A mitad del tratamiento a la concentración de 300 mg/kg de peso, se observan en los heterófilos obtenido a las 21:00 h, mayor capacidad fagocítica que los que presentan los fagocitos del grupo control, aunque en menor proporción que los del final del tratamiento con esta dosis, observándose además que no aparecen cambios ni en los niveles circulantes de melatonina, ni en la producción de anión superóxido tras la ingesta cuando se comparan con los animales libres de tratamiento.

A la vista de todo lo expuesto podemos indicar que la mayor concentración estudiada de L-triptófano (300 mg / kg de peso), provoca un mayor incremento en la fagocitosis llevada a cabo por los heterófilos procedentes de *Streptopelia roseogrisea*, cuando la administración es al menos durante siete días pudiendo insinuar que este hecho podría deberse a un efecto dosis-dependiente, siendo el efecto más patente cuando depende de la variable tiempo. Además en concordancia con esta conclusión se encuentran los resultados obtenidos *in vitro* por Terrón y colaboradores (2002) en heterófilos incubados con melatonina a la concentración fisiológica de 300 pg / ml y 50 pg / ml así como la farmacológica de 23×10^6 pg / ml, ya que dichos investigadores observaron una estimulación de la capacidad fagocítica, la cual iba aumentando su efectividad al incrementarse el tiempo de incubación.

Por tanto de forma general, como ya habían indicando con anterioridad otros autores (Maestroni y cols., 1987. Conti y Maestroni 1994) se podría indicar que los efectos ejercidos por el aa triptófano, sobre diferentes aspectos inmunes, depende del protocolo experimental, de la dosis, del momento y vía de administración, sin olvidar el modelo animal en el cual se realiza el estudio.

1.2 Ritmos de sueño/vigilia.

Tras dilucidar en *Streptopelia roseogrisea* el efecto que ejerce L-triptófano sobre la actividad de las células fagocíticas, la producción de radicales libres asociado al metabolismo oxidativo de los fagocitos y los niveles hormonales de melatonina en plasma, pasamos a discutir los resultados más determinantes sobre el efecto que la administración oral de este aminoácido ejerce sobre el ritmo sueño / vigilia en estas aves. Se observa que cuando el aminoácido fue suministrado a las 19:00 h, tanto a la concentración de 125 como de 300 mg / kg de peso, se produce en algunos de los siete días de tratamiento el descenso de actividad durante el periodo de reposo nocturno. Pero lo más importante de reseñar es que los animales de experimentación mostraron un descenso más patente de actividad transcurrido dicho periodo nocturno, es decir durante el periodo luminoso que continuaba al periodo de oscuridad finalizado tras la administración, tendencia que queda recogida en el descenso significativo de la actividad media total de estos siete periodos de luminosidad durante el tratamiento. Por ello, podemos indicar que en este modelo animal de hábitos diurnos, el triptófano, administrado oralmente momentos antes de iniciarse el periodo de oscuridad durante siete días, provoca un efecto sobre el ritmo de sueño/vigilia, que se manifiesta transcurrido este periodo de oscuridad es decir, durante el periodo de luminosidad siguiente. Todo ello podría explicarse en base a que las dosis de administración utilizadas son farmacológicas (Huether y cols., 1994.; Herichova y col., 1998), y por tanto, muy superiores a los niveles de recomendación diaria de administración, (recordemos que en niños lactantes la R.D.A. es de 17 mg / kg peso y día de este aminoácido), añadido a la desincronización existente en el metabolismo de los indoles, como queda comprobado al adelantarse la acrofase de la hormona melatonina cinco horas tras el tratamiento con la dosis de 125 mg/kg de peso, quedarían por lo tanto los niveles de dichas indolaminas desencarrilados y con ello el ritmo de actividad /reposo. Por lo tanto dichas dosis del aminoácido triptófano antes del inicio del ciclo de inactividad durante un periodo prolongado no son aptos para el descenso de actividad en el periodo nocturno de *Streptopelia roseogrisea*, menor de un año.

Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos en humanos por Arnulf y colaboradores (2002) los cuales observan una disminución sobre la fase REM en el sueño nocturno, tras la administración oral de infusiones proteicas ausente de L-triptófano a media mañana, es decir el estudio inverso al diseñado en esta investigación. Podemos afirmar que el efecto que ejerce la ausencia de este aminoácido y de su metabolismo durante el periodo de actividad es totalmente determinante para alterar las fases del sueño durante el periodo nocturno. Debido al cambio de acrofase en las indolaminas como es el caso de la melatonina, tras el tratamiento con triptófano, anteriormente reseñado.

A la vista de estos resultados sobre el ciclo de actividad/inactividad, se modificó el momento de administración de L-triptófano, cambiándose la pauta a las 09:00 h, es decir al inicio del periodo de luz, y volviendo a ensayar las dos concentraciones anteriormente mencionadas. Los resultados revelan que con la administración oral de la dosis menor estudiada (125 mg de L-triptófano/kg de peso) se aprecia descenso en la actividad nocturna a lo largo de los siete días de tratamiento, pero además con la dosis mayor (300 mg de L-triptófano/kg de peso) aparece un descenso más patente de la actividad en el reposo durante el periodo nocturno, sin alterar además la actividad diurna a lo largo de siete días de tratamiento. Cuando se observa los niveles de melatonina circulante, apreciamos que la acrofase de esta hormona no se encuentra modifica. Estos resultados satisfactorios sobre la potenciación del descanso nocturno, se podrían deber a niveles elevados de triptófano durante el periodo de luz, y su metabolismo hacia indolaminas, como es el caso del neurotransmisor serotonina, asegurando un nivel óptimo de este neurotransmisor durante este ciclo de actividad. Este neurotransmisor descendería sus niveles, durante el periodo nocturno, coincidiendo con el cese de la actividad motora, permitiendo así el reposo y el perfecto descanso (Lechin y cols., 2004), regulando dichos ritmos la hormona melatonina.

En resumen podemos indicar que el triptófano, administrado a la concentración de 300 mg/kg de peso de forma oral en nuestro modelo animal (*Streptopelia roseogrisea*) de menos de un año de edad, puede actuar sobre los ritmos circadianos, consolidando el reposo nocturno cuando dicha administración se realizada al inicio del

periodo de luz, al igual que nos encontramos al analizar el efecto del triptófano sobre la función inmune innata. Indicar finalmente el efecto desincronizador en el ritmo de actividad /reposo de las dosis administradas antes de iniciar el periodo de oscuridad, al producir cambios en la acrofase de la melatonina. Es decir es necesario tener altos niveles de serotonina durante el día y altos de melatonina durante la noche sin modificar en absoluto la acrofase de esta hormona, para que la misma se pueda unir a los receptores en el momento idóneo, permitiendo una perfecta sincronización del ritmo sueño / vigilia.

Se demuestra así en esta especie aviar diurna lo que se había puesto de manifiesto en mamíferos que el aminoácido triptófano puede actuar como un modulador del ciclo de actividad y reposo nocturno.

2. Experimentación en humanos.

Es ampliamente reconocido que la lactancia natural ofrece numerosas ventajas frente a la artificial, debidas, entre otras propiedades, a sutiles diferencias en su composición e incluso en componentes relativamente simples como por ejemplo, el contenido de triptófano de la leche materna, que es más abundante en ella que en las leches comerciales para lactantes.

2.1 Triptófano y lactancia.

Los fabricantes de alimentos infantiles se han preocupado de conseguir fórmulas que alcancen la mayor similitud posible con leche materna. Sin embargo, la igualdad completa es imposible, debido, entre otras causas, a que simplemente las proteínas o los elementos celulares de la leche de cada especie animal son esencialmente diferentes. Pero además, se han documentado diferencias en los componentes relativamente simples: ejemplos significativos son el alto contenido en uridina o en triptófano en la leche materna, que hasta ahora no se han reflejado en las fórmulas comerciales de leche artificial.

Pero por otra parte, existen acusadas variaciones circadianas en la composición de la leche humana y cabe suponer que estos cambios también deben tener una importancia funcional no desdeñable. Y sin embargo, hasta el momento no se han desarrollado en absoluto fórmulas para alimentos infantiles que tengan en cuenta estos aspectos, pese a que la información sobre la variabilidad circadiana de la leche esté disponible ya desde hace bastante tiempo. Por ejemplo, existen numerosas referencias que demuestran valores de acrofase y nadir diferente según el componente en cuestión. Así, existen valores máximos al atardecer para el péptido inductor del sueño (Graf y cols., 1984), el cortisol, sodio y potasio (Keenan y cols., 1983), folatos y lípidos (Hurgoiu y cols., 1985, Stafford y cols., 1994); en cambio, el máximo de organelos citoplasmáticos dispersos en la leche ocurre después de anochecer, mientras que hay concentraciones máximas matutinas de cobre, zinc y hierro (Picciano y Githrie, 1976, Feeley y cols., 1983, Karra y Kirksey, 1988) y lactosa, estando esta última correlacionada de forma inversa con otro oligosacáridos (Viverge y cols. 1986). Por su parte, los aminoácidos aspártico, alanina, glutamina, treonina y glutamato alcanzan el máximo al principio de la tarde (Shubat y cols., 1989).

Por todo lo expuesto y una vez finalizadas las primeras cuestiones que nos planteamos en nuestros animales de experimentación en los primeros meses de vida en los que hemos observado que la administración de triptófano modifica tanto la respuesta inmune innata como los ciclos de actividad/reposo, seguimos nuestras investigaciones en humanos y en concreto en niños lactantes en los que nos planteamos la siguiente cuestión: ¿La leche humana presenta o carece de oscilaciones circadianas en la concentración de triptófano? y continuando en esta línea, nos planteamos también analizar como sería el ritmo circadiano del ritmo sueño / vigilia en los niños alimentados con lactancia materna.

2.2 Sueño/vigilia en lactantes.

A la hora de comprender el probable efecto de las modificaciones en la leche materna descritas en el párrafo anterior, es conveniente atender a las funciones que en la especie humana se encuentra fuertemente controladas por periodicidad circadiana. En mayor medida bajo control circadiano se puede señalar el ritmo de sueño-vigilia y el

sistema inmunológico. Como sabido que ambas funciones están profundamente relacionadas (Moldofsky, 1997).

Las perturbaciones del sueño están recibiendo una atención creciente por parte de los profesionales de la salud, dada la importancia que presentan en relación con estado general de la salud, y sobre todo por las repercusiones del buen o mal dormir en vigilia. De hecho, es conocido que cerca de un 50% de la población presenta algún trastorno del sueño que en la mayoría de los casos se traduce en somnolencia diurna.

Uno de los colectivos que presenta dichas perturbaciones es la de las personas con niños de corta edad. Es sabido que los ciclos de sueño/actividad en el recién nacido no se acomodan al ritmo normal de 24 horas determinado por luz/oscuridad y ello causa trastornos similares en las personas encargadas de su cuidado. Las estadísticas de la incidencia de los trastornos en los ciclos de los padres de lactantes y niños de corta edad han sido poco estudiadas, pero es indudable que existe un mercado potencial importante, que indudablemente respondería de forma muy positiva a la presentación comercial de una dieta que ayudase a consolidar los ciclos en el recién nacido y en lactantes.

En la dirección apuntada en los párrafos anteriores, es sabido que la administración exógena de triptófano incrementa los niveles de serotonina en el cerebro y siendo su precursor, también debe suponer que influye sobre la síntesis de melatonina. Ambas sustancias, serotonina y melatonina ejercen importantes acciones sobre el sueño, ya que la serotonina potencia la cantidad de sueño de onda lenta y la melatonina marca el ritmo sueño / vigilia (Lavie y Luboshitzky, 1997).

Con estos antecedentes se ha intentado mejorar la cantidad del sueño administrando suplementos dietario de triptófano, siendo hoy su uso seguro y con menos efectos secundarios que otros muchos fármacos usados en el tratamiento de depresión y alteraciones del sueño (Riemann y Vorderholzer, 1998).

En la misma dirección, es sabido que la leche materna presenta una cantidad de triptófano superior a la de la leche de otros animales y se ha sugerido suplementar con dicho aminoácido las leches artificiales hasta alcanzar los niveles iguales a los referidos en la leche humana (Yogman y Zeisel, 1983, Sarwar y Botting, 1999). Por otra parte hay datos en los recién nacidos alimentados con biberón presentan mayor inquietud e intervalos de actividad-inactividad más irregulares (Lucas y St James-Robert, 1998), cabe imaginar que la relación entre ambos factores puede ser de importancia. En resumen, se podría pensar que añadir pequeñas cantidades de triptófano (hasta igualar los valores conocidos en la leche humana) a los alimentos infantiles puede mejorar en muchos aspectos la adaptación de los ritmos del lactante al ciclo luz-oscuridad de 24 horas, que tiene que traducirse en una mejoría en los patrones de sueño y en general en el estado de salud del niño.

Para llegar a este fin, es necesario en primer lugar conocer los valores de triptófano en la leche materna, así como conocer sus variables cronobiológicas. Tras analizar nuestros resultados del contenido de triptófano en la leche materna durante un periodo de 24 horas. Los valores durante ese periodo no fueron constantes, presentando un ritmo circadiano. Los mayores valores definidos por la acrofase se encuentran entorno a las 03:00 h y el mesor (su valor medio) es de 67,95 $\mu\text{mol/l}$.

El análisis de 6-sulfatoximelatonina, metabolito catabólico de la hormona melatonina excretado por vía urinaria, indica tanto en lactantes como en sus progenitoras, valores diferentes a lo largo del periodo diario. Ambos presentan un ritmo circadiano pero con parámetros de cronobiología diferentes, corroborando nuestros resultados los obtenidos en niños de Ardura y colaboradores (2003) que indican la aparición del ritmo circadiano de melatonina al final de periodo neonatal.

La acrofase del ritmo en las madres se encuentra a las 12:00 h con un mesor de 9,72 ng/ml. En cambio los bebés del estudio con tres meses de vida y alimentados exclusivamente con lactancia materna, al presentar en su ritmo una amplitud diferente a la de las madres, la acrofase se encuentra a las 06:00 h y su mesor es de 11,45 ng/ml. A su vez estos niños, recordemos alimentados exclusivamente con leche materna,

presentan ya un ritmo de actividad / reposo totalmente instaurado con un sueño real, durante la noche, de 8 horas y 30 minutos \pm 1 hora y 1,5 minutos

Tras estos resultados se puede exponer que el ritmo de 6-sulfatoximelatonina en lactantes bajo las características anteriormente mencionadas de tiempo de vida y de alimentación, se encuentra encarrilado, además dicho ritmo del lactante se encuentra atrasado con un desfase de 3 horas y 12 minutos con respecto al ritmo de triptófano en la leche materna.

Este retraso estaría causado por los siguientes procesos metabólicos:

a) La formación de melatonina a partir del triptófano ingerido, con un tiempo estimado de 60 minutos (Hajak y cols., 1991; Penev y cols., 1997).

b) Más el catabolismo de la hormona melatonina hacia 6-sulfatoximelatonina y posteriormente su excreción; con una vida media de eliminación de entre 30 y 50 minutos (Penev y cols., 1997; Valsecia y cols., 1998).

Descubriendo que en las etapas iniciales de la vida, el ritmo de dicho aminoácido repercute íntimamente en el anabolismo de la hormona melatonina y en la consolidación del reposo durante el ciclo nocturno.

Por todo lo expuesto y junto con nuestros resultados, se apoya la idea de la aparición de alimentos infantiles, regulados de forma rítmica, con el aminoácido triptófano, para consolidar el ciclo sueño / vigilia en lactantes.

6. CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en el estudio “Triptófano, melatonina y ritmos de actividad/ inactividad en animales diurnos y niños lactantes. Fagocitosis y metabolismo oxidativo” podemos concluir:

1. -El aminoácido L-triptófano administrado a la concentración de 125 mg / Kg de peso al final del periodo luminoso (19:00 h) a *Streptopelia roseogrisea*, menor de un año, de forma oral, incrementa la capacidad fagocítica en heterófilos sanguíneos extraídos a las 21:00 h, coincidiendo a esta hora con un aumento de melatonina circulante.

2. -Cuando la administración se realiza en *Streptopelia roseogrisea*, menor de un año, al inicio del periodo luminoso (09:00 h) o al final del periodo luminoso (19:00 h), con la concentración de 300 mg / Kg de peso, el mayor incremento en la capacidad fagocítica se provoca en los heterófilos extraídos a las 02:00 h, efecto que se observa al aumentar el tiempo de administración.

3. -La acrofase de los niveles circulantes de melatonina se adelanta a las 21:00 h con la administración antes de iniciarse el periodo de oscuridad (a las 19:00 h) de 125 mg de L-triptófano/kg de peso en *Streptopelia roseogrisea*, menor de un año, efecto que se aprecia al aumentar el tiempo de administración.

4. -Cuando la administración oral de L-triptófano en *Streptopelia roseogrisea*, menor de un año, a la concentración de 125 y 300 mg / kg de peso, se realiza antes de iniciarse el periodo de oscuridad, se observa un descenso en la actividad diurna de estos animales.

5. -La administración oral de L-triptófano al inicio del periodo de luminosidad a la concentración de 300 mg / kg de peso, en *Streptopelia roseogrisea*, menor de un año, provoca una disminución de la actividad y por tanto efecto somnolítico en el periodo nocturno.

6. -El triptófano posee un ritmo circadiano en las leches maternas con una acrofase que corresponde a las 03:00 h y un nadir a las 15:00 h.

7. -La orina de las madres presenta el ritmo circadiano de excreción de 6-sulfatoximelatonina, metabolito de excreción de la hormona melatonina, con la acrofase a las 12:00 h, el nadir a las 20:00 h y un mesor de 9,72 ng / ml.

8. -En la orina de los niños con tres meses de vida y alimentados exclusivamente con leche materna, se encuentra instaurado un ritmo circadiano de 6-sulfatoximelatonina; su acrofase se presenta a la 06:00 h, el nadir a las 17:00 h y pose un mesor de 11,45 ng / ml.

9. -En los ritmos circadianos de triptófano en leche materna y 6-sulfatoximelatonina en orina del lactante, sus acrofases se encuentran próximas, percibiendo en ello influencia temporal del ritmo de triptófano en leche materna sobre el ritmo circadiano de melatonina.

10. -Los niños alimentados exclusivamente con leche materna, presentan claramente un ritmos circadiano sueño / vigilia, con un periodo de sueño real durante el descanso nocturno de 8 horas y 30 minutos.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Ammon M.D. Melatonin in humans. *The New England Journal of Medicine*. 123. pp : 186-195 (1997).

Anders T.F., Keener M. Developmental course of nighttime sleep-wake patterns in full-term and premature infants during the first year of life. *Sleep*. 8. p:173-92 (1985).

Araki M., Fukada Y. , Shichida Y., Yoshiwaza T. and Tokunaga, F. Differentiation of both rod and cone types of photoreceptors in the *in vivo* and *in vitro* developing pineal glands of the quail. *Dev. Brain Res.* 65. pp: 85-92 (1992).

Ardura J., Gutierrez R., Andrés J., Agapito T. Emergence and evolution of the circadian rhythm of melatonin in children. *Horm. Res.* 59 (2). pp:66-72 (2003).

Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. *Chapman Hall* (Ed.) (1995).

Arnulf I., Quintin P., Alvarez J.C., Vigil L., Toutou Y., Lebre A.S., Bellenger A., Varaguaux O., Derenne J.P., Allilaire J.F., Benkelfat Ch., y Leboyer M. Mid-morning tryptophan depletion delay REM sleep onset in healthy subjects. *Neuropsychopharmacology*. 27:5 (2002).

Aviram M., Cogan U. y Mokaky S. Excessive dietary tryptophan enhances plasma lipid peroxidation in rats. *Atherosclerosis* . 88 (1):29-34 (1991).

Awadhiya R.P., Vegad J.L. and Kolte G.N. Eosinophil leukocytic response in dinitrochlorobenzene skin hypersensitivity reaction in the chicken. *Avian Pathology*.11. pp: 187-94 (1982).

Axelrod J., Quay W.B., and Baker P.C. Enzymatic synthesis of the skin-lightening agent, melatonin, in amphibians. *Nature*. 208(8). pp: 386 (1965).

Babior B.M. Oxigen-dependent microbial killing by phagocytes (Two Parts). *N. Eng. J. Med.* 298. pp: 659-668; 721-725 (1978).

Babior B.M. Oxidants from phagocytes; agents of defence and destruction. *Blood* .64. pp: 959-966 (1984).

Babior B.M. y Knipes R.S. Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement. *Blood* .50. pp: 517-524 (1977).

Barret R.K. and Underwood H. The superior cervical ganglia are not necessary for entrainment of persistence of the chick pineal melatonin rhythm in Japanese quail. *Brain Res.* 569. pp: 249-254 (1992).

Barret P. and Takahashi J.S. Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock. *J. Neurosci.* 15. pp: 5681-5692. (1995).

Barriga C., Nogales G., Marchena J. M. and Rodríguez A.B. Myeloperoxidase activity in ring dove heterophils after latex bead ingestion. Effect of melatonin. *Journal of Physiology.* 509.pp : 95. (1998).

Barriga C.; Madrid J.A.; Terrón M.P.; Rial R.V.; Cubero J.; Paredes S.D.; Sánchez S y Rodríguez A.B. The pineal gland: Functional connection between melatonin and immune system in birds. *Biogenic Amines.* 18: 147-176. 2004.

Bastianelli E. and Pochet R. Calbindin-D28k, calretinin, and recoverin immunoreactivities in developing chick pineal gland. *J. Pineal Res.* 17. pp: 103-111. (1994).

Bégay V., Coon S.L., Falcon J., Klein D.C. Expresión of melatonin systesis genes is controlled by a circadian clock in the pike pineal organ but not in the trout. In: *Biollogical cell.* 5 pp.: 399-405. (1998).

Bégay V., Bois P., Collin J.P. Lenfant J. and Falcón, J. Calcium and melatonin production in dissociated trout pineal photoreceptor cells in culture. *Cell Calcium.* 16. pp: 37-46. (1994a).

Bellavite P., Serra M.C., Dusi S., Bretón G. and Chilosi M. The free radical forming system of granulocytes and macrophages: further studies. In : *The biology of phagocytes in heart h and disease*. Ed. C. Mauri, S.C. Rizzo y G. Ricevuti, pp.161-173, Pergamon Press, Oxford, N. York (1987).

Bendich A. Antioxidant vitamins and Immune Response. In : *Nutrition and Immunology*. (Ed.) R. Alan. pp: 125-147, liss. Inc. New Yersey (1988).

Bernard M., Iuvone P.M., Cassone V.M., Roseboom P.H., Coon S.L. and Klein, D.C. Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland retina. *J. Neurochem.* 68. pp: 213-224 (1997b).

Binkley S. and Geller, E.B.: Pineal N-acetyltransferase in chickens: rhythms persists in constant darkness. *J. Comp. Physiol.* 99. pp: 67-70. (1975).

Binkley S. Riebman, J.B. and Reilly, K.B. Timekeeping by the pineal gland. *Science.* 197. pp: 1181-1183 (1977).

Binkley S.A., Riebman, J.B. and Reilly, K.B. The pineal gland: a biological clock *in vitro*. *Science.* 202. pp: 1198-1200. (1978).

Binkley S. A timekeeping enzyme in the pineal gland. *Sci. Am.* 240. pp: 66-71 (1979a).

Binkley S A. Pineal rhythms in vivo and vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A: 201-206. (1979b).

Binkley S., Muller G. and Hernández T. Circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase activity: phase shifting by light pulses (I) *J. Neurochem.* 37. pp: 798-800 (1981).

Binkley S.A. Circadian rhythm of pineal function in rats. *Endocrine Rev.* 43. pp: 255-270 (1983).

Binkley S.A. Circadian rhythms in the pineal and retina. In: *Pineal and Retinal Relationships*. Eds. P. J. O'Brien and D.C. Klein. Academic Press, New York pp: 185-196. (1986).

Binkley S. *The Pineal, Endocrine and Neuroendocrine Function*. Prentice Hall, New Jersey. pp: 1-305 (1988).

Bischoff M.B : Photoreceptor secretory structures in the avian pineal organ. *J. Ultrastruct. Res.* 28. pp: 16-26 (1969).

Blalock J.E. The immune system as a sensory organ. *J. Immunol.* 132: 1067-1070. (1984).

Bolliet V., Bégay V., Ravault J.P., Ali M.A., Collin J.P. and Falcón J. Multiple circadian oscillators in the photosensitive pike pineal gland: a study using organ and cell culture. *J. Pineal Res.* 16. pp: 77-84 (1994).

Bolliet V., Falcón J. and Ali, M.A.,. Regulation of melatonin secretion by light in the isolated pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*). *J. Neuroendocrinol.* 7. pp: 77-84 (1995).

Bolliet V., Bégay V., Taragnat C., Ravault J.P., Collin J.P. and Falcón J. Photoreceptor cells of the pike pineal organ as cellular circadian oscillators. *Eur. J. Neurosci.* 9. pp:643-653 (1997).

Borjigin J., Wang M.M. and Snyder S.H. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature.* 21-28. 378 (6559). pp: 783-5 (1995).

Bousvaros A, Zurakowski D, Duggan C y cols. Vitamins A and E serum levels in children and young adults with inflammatory bowel disease; Effect of disease activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr;* (26) pp :129-35 (1998).

Boya J. and Calvo J. Post-hatching evolution of the pineal gland of the chicken. *Acta Anat* (Basel).101(1). pp: 1-9. (1978).

Brozoswski T., Konturek PCh., Konturek S.J., Pajdo R., Bielanski W., Brozoswska I., Stachura J., Hahn EG. The role of melatonin and L-tryptophan in prevention of acute gastric lesions induced by stress, ethanol, ischemia, and aspirin. *J. Pineal Res.* (23) pp:79-89. (1997).

Bruce K. and Spiztnagel J.K. Peroxidaseless chicken leukocytes: isolation and characterization of antibacterial granules. *J. Infect. Dis.* 127. pp: 84-94 (1973).

Calvo J. R., Rafii-el-Idrissi M. and Guerrero J. M. Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J. Pineal Res.* 18. pp: 119-126. (1995).

Carlson H.C. and Allen J.R. The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian Dis.*, 14. pp: 817-33 (1969).

Cassone V.M. y Menaker M. Sympathetic regulation of chicken pineal rhythms. *Brain Res.* 272(2). pp: 311-7 (1983).

Cassone V.M., Takahashi J.S., Blaha C.D., Lane R.F. and Menaker M. Dynamics of noradrenergic circadian input to the chicken pineal gland. *Brain Res.* 384(2). pp: 334-41 (1986).

Cassone V.M. y Natesan A. K. Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J. Biol. Rhythms.* 12: 489-497 (1997).

Cassone V.M., Forsyth A.M. and Woodlee G.L. Hypothalamic regulation of circadian noradrenergic input to the chicken pineal gland. *J. Comp. Physiol.* [A] 167. pp: 187-192 (1990).

Chand N. and Eyre P. Immunological release of histamine and SRS in domestic fowl. *Can. J. Comp. Med.* 42 . pp: 519-24 (1978).

Chakravarti B. Studies on phagocytosis of unopsonized rabbit erythrocytes by human monocytes. *Cell. Immunol.* 123. pp : 251-260 (1980).

Chiaurugi A., Calvini M., Meli E., Traggiai E. And Morani F. Synthesis and release of neurotoxic Kynurenine metabolites by human monocyte derived macrophages. *Journal of Neuroimmunology* 120(1-2):190-8 (2001).

Clabough J.W. Cytological aspects of pineal development in rats and hamsters. *Am J Anat.* 137(2). pp: 215-29. (1973).

Claustrat B., Brun J. and Chazot G. Melatonin in humans, neuroendocrinological and pharmacological aspect. *Nucl Med Biol.* 27. pp:265-32 (1990).

Cline M.J. Metabolism of the circulating leukocyte. *Physiol. Rev.* 45: pp. 647-720 (1965).

Cockrem J.F. and Follett B.K. Circadian rhythm of melatonin in the pineal gland of the Japanese quail (*Coturnix coturnixjaponica*). *J Endocrinol.* 107(3). pp: 317-24 (1985).

Cogburn L.A. and Glick B. Functional lymphocytes in the chicken pineal gland. *J. Immunol.* 130. pp: 2109 (1983).

Cogburn L.A., Wilson-Placentra S., Letcher L.R. Influence of pinealectomy on plasma and extrapineal melatonin rhythms in young chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol.*; 68(3). pp:343-56 (1987).

Cohen H.J., Newberg P.E. and Chovaniec H.E. NADP(H)-dependent superoxide production by phagocytic vesicles from guinea-pig and human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 225. pp: 65-84 (1980).

Collin J.P. Contribution à l'étude de l'organe pineal. De l'épiphyse sensorielle à la glande pinéale: modalités de transformation et implications fonctionelles. *Ann. Start. Biol. Besse-en-Chandesse.* Suppl. 1. pp : 1-357 (1969).

Collin J.P. Differentiation and regression of the cells of the sensory line in the epiphys cerebri. En Wolsthenhome, G.E.W., Knight, J. (eds.): *The pineal gland*, Edimburg and London, Churchill Livingstone. pp : 79-125 (1971).

Collin J.P., Calas A., Juillard, M.T. The avian pineal organ. Distribution of exogenous indoleamines: a qualitative study of the rudimentary photoreceptor cells by electron microscopic radioautography. *Exp. Brain Res.*, 25. pp : 15-33 (1976).

Collin J.P. and Juillard M.T. Membranous sites of oxidative deamination: a comparison between ultracytochemical and radioautographic studies in the pineal organ of the wall lizard and the parakeet. *Biol. Cell.* 36. pp:29-35 (1979).

Collin J.P., Briasson P., Falcón J., and Voisin P. Multiple cell types in the pineal: functional aspects. In: *Pineal and Retinal Relationships*. Eds. P.J. O' Brien and D.C. Klein. Academic Press, Orlando. pp: 15-32 (1986a).

Collin J.P., Mirshahi M., Brisson P., Falcón J., Guerlotté J. and Faure J.P. Pineal retinal molecular relationships : distribution of S-antigen in the pineal complex. *Neuroscience*. 19. pp: 657-666 (1986b).

Collin J.P., Voisin P., Falcón J., Brisson P., and Defaye J.R. Pineal transducers in the course of evolution: molecular organisation, rhythmic metabolic activity and role. *Arch. Histol. Cytol.* 52. pp: 441-449 (1989).

Conti A., Conconi S., Reteñís E., Skwarlo-Sonta K., Markowska M. y Maestroni J.M. Evidence for melatonin síntesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* 28. pp: 193-202. (2000).

Cosci B., Longoni B. and Marchiafava P.L. Melatonin induces membrane conductance changes in isolated retinal rod receptor cells. *Life Sci.* 60(21).pp :1885-9 (1997).

Coon S.L., Roseboom P.H., Baler R., Weller J.L., Namboodiri M.A., Koonin E.V. and Klein, D.C. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science*. 8.270(5242). pp: 1681-3 (1995).

Cooper J.R., Bloom F.E. y Roth R.H. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, 6ª ed. Pp: 338-80. Oxford University Press (1991).

Daimon T. y Caxton-Martins A. Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leukocytes. *J.Anat.*, 123. pp: 161-167 (1977).

Dawson D., and Encel N. Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res.* 15 .pp:1-12 (1993).

David A.T., Estensen R. and Quie P.G. Cytochalasin B III. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137. pp: 161-167 (1971).

De la Iglesia H.O., Cambras T., Schwartz W.J., Diez-Noguera A. Forced desynchronization of dual circadian oscillator with the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr Biology* 14 pp:796-800. (2004).

De Chatelet L.M., Cooper M.R. and Mc Call C.E. Stimulation of leukocyte hexose monophosphate shunt by ascorbic acid. *Clin. Res.* 19. pp: 47-51 (1971).

De Chatelet L.M., Cooper M.R. and Mc Call C.E. Stimulation of the hexose monophosphate shunt in human neutrophils by ascorbic acid: Mechanism of action. Antimicrobial agents. *Chemoter.* 4. pp : 12-16 (1972).

Deguchi T. A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature*. 282. pp: 94-96 (1979).

Delgado P.L., Charney D.S., Price L.H., Aghajanian G.K., Landis H. y Heninger G.R. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action: Reversal of antidepressant induced remission by rapid depletion on plasma tryptophan. *Arch Gen Psychiatry*. 47:411-8 (1990).

Delgado P.L., Price L.H., Milleer H.L., Salomon R.M., Aghajanian G.K., Heninger G.R. Serotonin and the neurobiology of depression: Effects of tryptophan depletion in drug-free depressed patients. *Arch Gen Psychiatry*. 51: 865-74 (1994).

Demas G.E. y Nelson R.J. Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms* 11: 95-103. (1996).

Dinges D.F., Douglas S.D., Zaugg L. y Campbell D.E. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J. Clin. Invest.* 93:1930–8 (1994).

Demisch K., Bauer J., Georgi K. Treatment of severe chronic insomnia with L-tryptophan and varying sleeping times. *Pharmacopsychiatry* 20 (6) pp: 245-8. (1987).

Densen P. and Mandell G.L. Gonococcal interactions with polymorphonuclear neutrophils. Importance of the phagosome for bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 62. pp : 1161-1171 (1978).

Depres-Brummer P. Bourin P. Pages N. Metzger G. y Levi F. Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats. *Am. J. Physio.* 273: R1899-R1997. (1997).

Dhingra L.D., Parrish W.B. and Venzke W.G. Electron microscopy of granular leukocytes of chicken. *Am. J. Vet. Res.* 30: 637 (1969).

Diez-Noguera A., de la Iglesia H.O., Cambras T., Schwartz W.J. Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol.* May 4;14(9):796-800. (2004).

Di Stefano A. and Paulesu L. Inhibitory effect of melatonin production on INF gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J. Pineal Res.* 17. 164-169. (1994).

Dougherty R.W. and Niedel J.E. Cytosolic calcium regulates phorbol diester binding affinity in intact phagocytes. *J. Biol. Chem.* 261. pp: 4097-4100 (1968).

Dryer S.E. and Henderson D. A cyclic GMP-activated channel in dissociated cells of the chick pineal gland. *Nature.* 353. pp: 756-758 (1991).

Dryer S.E. and Henderson D. Cyclic GMP-activated channels of the chick pineal gland: effects of divalent cations, pH, and cyclic AMP. *J. Comp. Physiol. [A].* 172 (3). pp: 271-279 (1993).

D'Souza T. and Dryer S.E. Effects of phosphodiesterase inhibitors and forskolin on cyclic GMP-activated channels in intact isolated cells of the chick pineal gland. *Neurochem Int.* 27(6). pp:527-33. (1995).

Dubocovich M. L. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 2(12). pp: 2765-73. (1998).

Duffi J. The lessons of Eosinophilia-Myalgia Syndrome. *Hospital Practice.* 30:65-90 (1992).

Ekström P. and Meissl H. Electron microscopic analysis of 5-antigen and serotonin-immunoreactive neural and sensory elements in the photosensory pineal organ of the salmon. *J. Comp. Neurol.* 292. pp: 73-82 (1990).

Englard S. and Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann. Rev. Nutr.* 6. pp: 356-406 (1986).

Espezel H., Jan J., ÖDonell M. and Milner R. The use of melatonin to treat sleep-wake rhythm disorders in children who are visually impaired. *J Vis Imp Blind* .90. pp:43-50 (1996).

Falcón J., Juillard M.T. and Collin J.P. The pineal organ of the pike (*Esox lucius* L.). IV. Endogenous serotonin and monoamine oxidase activity: an histochemical, ultracytochemical and pharmacological study. *Reprod. Nutr. Dev.* 20. pp: 139-154 (1980).

Falcón J., Geffard M., Juillard M.T., Delasgen and Collin J.P. Melatonin-like immunoreactivity in photoreceptor cells: a study in the teleost pineal organ and concept of photoneuroendocrine cells. *Biol. Cell.* 42. pp: 65-68 (1981).

Falcón J., Geffard M., Juillard M.T., Steinbusch H.W., Seguela P. and Collin J.P. Immunocytochemical localization and circadian variations of serotonin and *N-acetylserotonin* in photoreceptor cells. Light and electron microscopic study in the teleost pineal organ. *J. Histochem. Cytochem.* 32. pp: 486-492 (1984).

Falcón J., Guerlotte J.F., Voisin P., Collin J.P. Rhythmic melatonin biosynthesis in a photoreceptive pineal organ: a study in the pike. *Neuroendocrinology.* 45(6). pp: 479-86 (1987).

Falcón J., Brun-Marmillon J., Claustrat B. and Collin J.P. Melatonin production in organ cultured chicken pineal: modulation by adenosine and its analogs. *Pflugers Arch.* 413(1). pp:93-5 (1988).

Falcón J., Thibault C., Martin C., Brun-Marmillon J., Claustrat B. and Collin J.P. Regulation of melatonin production by catecholamines and adenosine in a photoreceptive pineal organ. An in vitro study in the pike and the trout. *J Pineal Res.* 11(3-4). pp:123-34 (1991).

Falcón J., Thibault C., Bégay V., Zachmann A. and Collin J.P. Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. In: *Rhythms in Fishes*. Ed. M.A. Ali. Plenum Press, New York. pp: 167-198 (1992).

Falcón J., Van Camp G. and Collin J.P. Adenosine A2 receptor-mediated stimulation of cyclic AMP in cultured chicken pineal cells. *J Pineal Res.*19(2). pp:72-8 (1995).

Falcón J., Bolliet V., Ravault J.P., Chesneau D., Ali M.A. and Collin J.P. Rhythmic secretion of melatonin by the superfused pike pineal organ: thermo- and photoperiod interaction. *Neuroendocrinology.* 60(5). pp: 535-43 (1994b).

Foà A. and Menaker M. Contribution of the pineal and retinae to the circadian rhythms of circulating melatonin in pigeons. *J. Comp. Physiol.* 164. pp: 25-30. (1988)

Foà A., Janik D. and Minutini L. Circadian rhythms of plasma melatonin in the ruin lizard *Podarcis sicula*: effects of pinealectomy. *J. Pineal Res.* 12. pp: 109-113 (1992).

Fox A.J. and Solomon J.B. Chicken non-lymphoid leukocytes. In *Avian Immunology* (eds.) M.E. Rose, L.N. Payne and M.B. Freeman. Edinburgh, Poultry Science Ltd (1981).

Fukuda K., Ishihara K. Development of human sleep and wakefulness rhythm during the first six months of life: discontinuous changes at the 7th and the 12th week after birth. *Biol Rhythm Res.* 28. pp:94-103 (1997).

Fujie E. Ultrastructure of the pineal body of the domestic chicken, with special reference to the changes induced by altered photoperiods. *Arch. Histol. Jap.* 29. pp: 271-303 (1968).

Fulia F., Gitto E., Cuzzocrea S., Reiter R.J., Dugo L., Gitto P., Barberi S., Cordaro S., Barberi I. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J. Pineal. Res.* 31(4) pp:343-9. (2001).

Gern W.A. y Greenhouse S.S. Examination of *in vitro* melatonin secretion from superfused trout (*Salmo gairdneri*) pineal organs maintained under diel illumination or continuous darkness. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71. pp:163-174 (1988).

Gerrero J. M. y Reiter R. J. Melatonin-Immune system relationships. *Current Topics in Medicals Chemistry.* 2: 167-179. (2002).

Giles G., Collins C., Stone T., Jacob C. Electrochemical and *in vitro* evaluation of redox-properties of kynurenine species. *Biochemical and Biophysical Research Communications;* 3. pp: 719-724 (2003).

Gitto E., Romero C., Reiter R., Impellizzeri P., Pesce S., Basile M., and Zuccarello B. Effect of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res.* 2001. 50 (6). pp: 756-60 . (2001).

Gitto E., Romero C., Reiter R., Impellizzeri P., Pesce S., Basile M., and Zuccarello B. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *Journal of Pediatric Surgency.* vol 39 . (2): 184-189. (2004).

Glick, B. Immunophysiology. In : *Avian Physiology.* Ed. P.D. Sturkie. pp:87-101 (1986).

Godfrey R.W., Manzi R.M., Clark M.A. and Hoffstein. S.T. *J. Cell. Biol.* 104. pp: 925-932 (1987).

Goldschmidt M.C., Masin W.S., Masin W.S., Brown L.R. and Wyde P.R. The effect of ascorbic acid deficiency on leukocyte phagocytosis and killing of *actinomyces viscosus*. *Int. J. Vitamin. Nutz. Res.* 58. pp: 326-334 (1988).

Goldstein I.M., Cerqueira M., Linds S. and Kaplan H.B. Evidence that the superoxide-generating system of human leukocytes is associated with the cells surface. *J. Clin. Invest.* 59. pp: 249 (1977).

González G., García F. Ultraestructura de la glándula pineal de las aves. *Trab. Inst. Cajal Inv. Biol.* 58. pp: 55-67 (1966).

Gomez G. y Llorca R Aminoácidos. *Biopsicología.* 3(4):548-76 (2000).

Goto K., Yamagata K., Miki N., Kondo H. Direct photosensitivity. *Cell. Tissue. Res.* 262. pp: 501-505 (1990).

Guilleminault C., Leger D., Pelayo R., Gould S., Hayes B., Miles L. Development of circadian rhythmicity of temperature in full-term normal infants. *Neurophysiol Clin;* 26(1).pp: 21-9 (1996).

Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica. 9 edición. McGraw-Hill. Interamericana. (1997).

Grady R.K., Jr. Caliguri A., Mefford and I.N. Day/night differences in pineal indoles in the adult pigeon (*Columba livia*). *Comp Biochem Physiol C.* 78(1). pp: 141-3 (1984).

Green C.B., Besharse J.C. and Zatz M. Tryptophan hydroxylase mRNA levels are regulated by the circadian clock, temperature, and cAMP in chick pineal cells. *Brain Res.* 738(1). pp:1-7 (1996).

Grisham M., MacDermott R., Deith E.: Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation* . (14). pp:669-80 (1990).

Gross B., Ronen N., igman S. and Livne E. Tryptophan toxicity. Time and dose response in rats. En: tryptophan, serotonin and melatonin: Basic aspects and applications. Advances in experimental medicine and byology. Huether, Kochen, Simon Steinhart (eds) . pp: 507-16. Board (1999).

Guerlotte J., Falcon J., Voisin P., Collin JP. Indoles in the photoreceptor cells of lamprey pineal complex. *Ann Endocrinol.* 47 (1): 62-4. (1986).

Gutzeit R. *Ein Teratom der Zibeldrüse*. Königsberg (1896).

Gwinner E., Hau M., Heigl S. Melatonin: generation and modulation of avian circadian rhythms. *Brain Res Bull.* 44(4). pp:439-44 (1997).

Hadley M.E. Papel endocrino de la glándula pineal. En: *Endocrinología*. Ed. Prentice Hall. pp: 535-557 (1997).

Hajak G., Huether G., Blanke J., Blomer M., Freyer C., Poeggeler B., Reimer A., Rodenbeck A., Schulz-Varaszegi M., Ruther E. The influence of intravenous L-Tryptophan on plasma melatonin and sep in men. *Pharmacopsychiat.* 24. pp: 17-20 (1991).

Haldar C.; Sing R. y Guchhait P. Relationships between the annual rhythms in melatonin and immune system status in the tropical palm squirrel, *Fananbulus penalti*. *Chronobiol. Int.* 18: 61-69. (2001).

Hartiala K.T., Scott I.G., Viljanen M.K. and Akerman K.E. Lack of correlation between calcium modulation induced by chemotactic factors in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144. pp: 794-800 (1987).

Hartwig J.H. and Stossel, T.P. Isolation and properties of actin, myosin and a new actin-binding protein in rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 250. pp: 5696-5705 (1975).

Haslett C., Savill J.L. and Meagher L. The neutrophil. *Current opinion in Immunology*, 2. pp: 10 (1989).

Heine Willi E. The significance of tryptophan in infant nutrition. En: tryptophan, serotonin and melatonin: Basic aspects and applications. Advances in experimental medicine and biology . Huether, Kochen, Simon Steinhart (eds). pp: 705-70. Board (1999).

Henson P.M. and Oades Z.G. Stimulation of human neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates. Secretion of granulo constituents and increased oxidation of glucose. *J. Clin. Invest.* 56. pp: 1053-1058 (1975).

Herichova I. Zeman M., Vaselovsky J. Effect of Tryptophan Administration on Melatonin concentrations in the pineal gland, plasma and gastrointestinal tract of chickens. *Acta Vet Brno.* 67. pp:89-95.

Heubner O. Tumor der glandula pinealis, tsch. *M. Tsch. Med. Wschr.* 24. pp: 214 (1898).

Heyes M.P., Saito K. y Markey S.P. Human macrophages convert L-tryptophan into neurotoxin quinolinic acid. *Biochem J.* 283: 633-35 (1992).

Huether G., Poeggeler B., Reimer A., George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulations of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Science.* 51. pp:945-953. (1992).

Hirsch J.G. Phagocytin: a bacterial substance from polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 103. pp: 589-611 (1956).

Hoffenberg E., Deutsch J., Smith and cols.: Circulating antioxidant concentrations in children with inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 65): 1482-8. (1997).

Jan J.E., O'donnell ME. Use of melatonin in the treatment of paediatric sleep disorders. *J Pineal Res* 21. pp:193-199 (1996).

Jankovic B. D., Knezevic Z., Koji L. and Nikoli V. Pineal gland and immune system. Immune functions in the chick embryo pinealcomized at 86 hour of incubation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719. pp: 398-409. (1994).

Jensen M.S. and Bainton D.F. Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophils leukocyte. *J. Cell. Bol.* 56. pp: 379-388 (1973).

Jojich L., Pourcho R.G. Glutamate immunoreactivity in the cat retina: a quantitative study. *Vis Neurosci.* 13(1). pp:117-33(1996).

Karnousky M.L. Metabolic basis of phagocytic activity. *Physiol. Rev.* 42. pp: 143-168 (1962).

Karnousky M.L., Lazdino J. and Simmons S.R. Metabolism of activated mononuclear phagocytes at rest and during phagocytosis. In: *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology.* Ed. R. Van Furth. Blackwell Publishing Co. Ltd, Oxford, England. pp: 432-439. (1970).

Karnousky M.L. Simmons S.R., Glass E., Shale A. W. and D'Arcy-Hart P. Metabolism of macrophages. In: *Mononuclear phagocytes.* Ed. Van. Furth. Blackwell Publishing Co. Ltd., Oxford, England. pp: 103-120. (1975).

Kaufmann S.H.E. Immunity to bacteria and fungi. *Current Opinion in Immunology*, 1. pp: 431 (1989).

Kazez A., Demirbag M., Ustundag B., Ozercan I.H., Saglam M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Pediatr. Surg.* 35 (10):1444-8. (2000).

Kennaway D., Stamp G. Development of melatonin production in infant and impact of prematurity. *J Clin Endocrinol Metab.* 75. pp: 376-369. (1992).

Keshavarzian A., Sedghi S., Kanofsky J. and cols.: Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: Analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology.* (103). pp: 177-85. (1992).

Kiely M., Morrissey P., Cogan P. y cols.: Low molecular weight plasma antioxidant and lipid peroxidation in maternal and cord blood. *Eur J Clin Nutr* (53) :861-4 (1999).

Kirby J. D. and Froman D. P. Research note. Evaluation of humoral and delayed hypersensitivity response in cockrels reared under constant light or a twelve hour light: Twelve hour dark photoperiod. *Poult. Sci.* 70. pp: 2375-2378. (1991).

Klebanoff S.J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Inter. Med.* 93. pp: 480-489 (1980).

Klein DC. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp.* 117. pp: 38-56 (1985).

Klein D.C. and Weller J.L. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science.* 169(950). pp:1093-5 (1970).

Klein D.C. and Moore R.Y. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.*;174(2). pp: 245-62 (1979).

Klein D.C., Auerbach D.A., Namboodiri M.A. and Wheler G.H.T. Indole metabolism in the mammalian pineal gland. In: *The Pineal Gland*. Ed. R.J. Reiter. CRC Press. Boca Raton pp: 199-227 (1981).

Klein D.C., Coon S.L., Roseboom P.H., Weller J.L., Bernard M., Gastell J.A., Zatz M., Iuvon, P.M., Rodríguez I.R., Bégay V., Falcón J., Cahill G.M., Cassone V.M. and Baler, R. The melatonin rhythm-generating-enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent. Prog. Horm. Res.* 52. pp: 307-357 (1997).

Kleitman J., Engelman K. Sleep characteristics of infant. *J Appl Physio.* 6. pp: 127-134. (1953).

Kliger C. A., Gehad A. E., Hulet R. M. , Roush W. B., Lillehoj H. S. and Mashaly M. M. Effects of photoperiod and melatonin on lymphocyte activities in male broiler chickens. *Poult Sci.* 79. pp: 18-25. (2000).

Korf H.W., White B.H., Schaad N.C. and Klein D.C. Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res.* 595. pp: 57-66 (1992).

Kuci S., Becker J., Veti G., Hangretinger R., Attanasio A., Bruchelt G., Treuner J., Niethammer D. y Gupta D. Circadian variations in the immunomodulatory role of the pineal gland. *Neuroendocrinol. Letter 10*: 65-79 (1988).

Lee P. P. and Pang S. F. [¹²⁵I] Iodomelatonin bindings sites in the gastrointestinal tract in ducks. *Life Sci.* 50. pp: 117-25. (1992).

Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80. pp: 2587 (1958).

Levine, M. New concepts in the biology and chemistry of ascorbic acid. *New Engl. J. Med.* 3. pp: 892-902 (1986).

Levi F., Canon C., Depres-Brummer P., Adam R., Bourin P., Pati A., Florentin I., Misset J. L. and Bismuth H. The rhythmic organization of the immune network: implication for the chronopharmacologic delivery of inteferons, interleukins and cyclosporin. *Adv. Drug. Deliv. Re.* 9, 85-112. (1992).

Lewy A.J., Tetsuo M., Markey S.P., Goodwin F.K., Kopin I.J. Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J Clin Endocrinol Metab.* 50(1). pp:204-5 (1980).

Linder M.C. Nutrición y metabolismo de las vitaminas. En: *Nutrición. Aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos.* pp: 101-68. Eunsa (1988b).

Liu Z.M and Pang S.F. [¹²⁵I]-Labelled iodomelatonin bindig sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. *J. Pineal. Res.* 12. pp: 97-104 (1992a).

Liu Z.M. and Pang S. F. [125] Iodomelatonin-binding sites in the bursa of Fabricius of birds: Binding characteristics, subcellular distribution, diurnal variations and age studies. *J. Endocrinol.* 138. pp: 51-57. (1992b).

Lopez-González MA. Gerrero JM, Sanchez B. Delgado F. Melatonin restores and enhances the human type B tonsillar lymphocyte subset in recurrent acute tonsillitis. *Neurosci Lett.* 247 (2-3): 131-4 (1998).

Lubec G. Widness J.A. Hayde M. y cols.: Hydroxyl radical generation in oxygen-treated infant. *Pediatrics* (100) pp:700-4 (1997).

Mac Rae E.K. and Powell R.E. Cytochemical reaction for cationic proteins as a marker of primary granules during development in chick heterophils. *Histochemistry.* 60. pp: 295-306 (1979).

Maes M., Meltzer H.Y., Scharpé S., Bosmans E., Suy E., De Masetter I., Calabres J. and Cosons P. Relationships between lower plasma tryptophan levels and immune-inflammatory variables in depression. *Psychiatry Res.* 42(2). pp: 151-65 (1993).

Maes M., Bosmans E., De Jongh R., Kenis G., Vandoolaeghe E. and Neels H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine.* 9(11). pp: 853-8 (1997).

Makino R., Tanaka T., Lizaca T., Ishimura and Kanagasaki S. Stoichiometric conversion of during oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. Direct evidence by a new method for measurement of superoxide anion with diacetyldeutereheme-substituted nerseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 261. pp: 1444-1447 (1986).

Malawista S.E., Gee J.B.L. and Bensch K.G. Cytochalasin B reversibly inhibits phagocytosis. *Yale J. Biol. Med.* 44. pp: 286-300 (1971).

Markowska M., Bialecka B., Ciechanowska M., Koter Z. Laskowska, H. Karkucinska,-Wieckowska, A. Effect of immunization on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland. *Neuroendocrinol Lett.* 21, 367-373. (2000).

Markowska M., Waloch M. and Skwarlo-Sonta K. Melatonin inhibits PHA-stimulated chicken lymphocyte proliferation *in vitro*. *J. Pineal Res.* 30(4), 220-226. (2001).

Max M., McKinnon P.J., Seidenman K.J., Barret R.K., Applebury M.L., Takahashi J.S., and Margolskee R.F. Pineal opsin: a nonvisual opsin expressed in chick pineal. *Science.* 267 (5203). pp: 1502-1506 (1995).

Maxwell M.H. and Trejo F. The ultrastructure of white blood cells and trombocytes of the domestical fowl. *British Veterinary J.* 126: 583-92 (1970).

Maxwell M.H. Comparison of heterophil and basophil ultrastructure in six especies of domestic bird. *J. Anat.* 115. pp: 187-202 (1973).

Maxwell M.H. The distribution and localization of acid trimetaphosphatase in developing heterophils and eosinophils in the bone marrow of the fowl and the duck. *Cell. Tissue Res.* 235. pp: 171-176 (1984a).

Maxwell M.H. Histochemical identification of tissue eosinphils in the inflammatory response of the fow1 (*Gallus domesticus*). *Res. Vet. Sci.* 37: 7-11. (1984b).

McArthur A.J., Gillette M.U. and Prosser R.A. Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock *in vitro*. *Brain Res.* 565. pp: 158-161 (1991) .

Mc Call G.E., Chatelet L.R., Cooper M.R. and Ashburn, P. The effects of ascorbic acid on bactericidal mechanism of neutrophils. *J. Infect. Dis.* 124. pp: 194-197 (1971).

Mc Cord J.M. and Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann. Int. Med.* 89. pp: 122-127 (1978).

Mc Graw K., Hoffmann R., Harker C., Herman JH. The development of circadian rhythms in a human infant. *Sleep*. 22 pp:303-10. (1999).

Mc Nulty J.A. Organ culture of the goldfish pineal body. An ultrastructural and biochemical study. *Cell Tissue Res*. 238(3). pp: 565-75.(1984).

Meier-Koll A., Hall U., Hellwig U., Kott G. and Meier-Koll V. A biological oscillator system and development of sleep-waking behavior during the early infancy. *Chronobiologia*.p 5. pp: 425-440 (1978).

Meissl H., Kroeber S., Yancz J. and Kuff H. W. Regulation of melatonin production and intracellular calcium concentrations in the trout pineal organ. *Cell. Tissut Res*. 286. pp: 315-323 (1996).

Mellor Al., Sivakumer J., Chandler P., Smith K., Molina H., Mao D. y Mund D.H. Prevention of T-cell driven complement activation and inflamatori by tryptophan catabolism during pregnancy. 2(1):64-8 (2001).

Menaker M. and Wisner S. Temperature-compensated circadian clock in the pineal of *Anolis*. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*. 80. pp: 6119-6121 (1983).

Metsvaht T., Llves P., Talvik T. y cols. Posible oxidative stress in healthy term newborns. *Acta Paediatric* .88. pp: 1299-300 (1999).

Michl J., Pieczonka M.M., Unkeless J.C., Bell G.I. and Silverstein S.C. Fc receptor modulation in mononuclear phagocytes maintained on immobilized immune complexes occur by diffusin of the receptor molecule. *J. Exp. Med*. 157. pp: 2121 (1983).

Miguez J.M., Recio J., Vivien-Roels B. and Pevet P. Diurnal changes in the content of indoleamines, catecholamines, and methoxyindoles in the pineal gland of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): effect of photoperiod. *J. Pineal Res*. 21. pp: 7-14 (1996).

Mirshahi M., Faure J.P., Brisson P., Falcón J. Guerlotté J. and Collin J. S-antigen immunoreactivity in retinal rods and cones and pineal photosensitive cells. *Biol. Cel.* 52. pp: 195-198 (1984).

Miyamoto A, Oki J, Takahashi S, Okuno A. Serum melatonin kinetics and long-term melatonin treatment for sleep disorders in Rett syndrome. *Brain Dev.* 1999; 21(1):59-62 (1999).

Moison R., Palinckx J., Roest M. and cols.: Induction of lipid peroxidation of pulmonary surfactant by plasma of preterm babies. *Lancet:* (341) pp:79-82 (1993).

Molina-Carballo A., Muñoz-Hoyos A., Reiter R.J., Rufo-Campos M. Utility of high doses of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in the child with severe myoclonic epilepsy: two years' experience. *J Pineal Res.* 23. pp: 97-105 (1997).

Molina A., Giron F., Muñoz A., Rodriguez T., Acuña D. Effects of immunoterapia o melatonin-beta-endorphin relationship in olive pollen-sensitive patients. *1st Locarno International Meeting on neuroendocrinology.* (1993).

Mollinedo F. and Schneider D.L. Membrane fusion as a mechanism for activation of the superoxide generating system in human neutrophils. In: *Redox Functions of the Eukariotic Plasma membrane.* Ed. Ramírez, J.M. C.S.I. Madrid. pp: 232 (1987).

Moore R.Y. Organization of the mammalian circadian system. *Ciba Found Symp.* 183. pp: 88-99; discussion 100-6 (1995).

Moore R.Y. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med.* 48. pp: 253-66 (1997).

Moore C. B. and Siopes T. D. Effects of lighting conditions and melatonin supplementation on the cellular and humoral immune responses in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp. Endocrino.* 119(1). pp: 95-104. (2000).

Moore C. B., Siopes T. D., Steele C. T. and Underwood, H. Pineal melatonin secretion, but not ocular melatonin secretion, is sufficient to maintain normal immune responses in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Geneal and Comparative Endocrinology*. 126. pp: 352-358. (2002).

Morita Y. Absence of electrical activity of the pigeon's pineal organ in response to light. *Experientia*. 22(6). pp:402 (1966).

Morton D.J., and Forbes H.J. Pineal gland N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*): seasonal variation linked to photoperiod. *Neurosci Lett*. 5. 94(3). pp: 333-7 (1988).

Moreno-Madrid F., Muñoz-Hoyos A., Sánchez-Forte M., Molina-Carballo A., Macias M., Escamez G., Narbona-López E. y acuña-castroviejo D. Valoración de un test de función pineal con L-triptófano en niños. *Investigación Clínica*. 2(4):297-303 (1999).

Moroni Flavio. Tryptophan metabolism and brain function: focus on Kynurenine and other indole metabolites. *European Journal of Pharmacology*. 375(1-3):87-100 (1999).

Moser P. J. y Weber F. Uptake of ascorbics acid by human granulocytes. *Int. J. Vitamin. Nutr. Res.* 54 : 47-53. (1984).

Moyer R.W., Firth B.T. and Kennaway D.J. Effect of variable temperatures, darkness and light on the secretion of melatonin by pineal explants in the gecko, *Christinus marmoratus*. *Brain Res*. 747. pp: 230-235 (1997).

Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshall B., Brown C. y Mellor A.L. Prevention of allogenic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-4 (1998).

Murakami N., Nakamura H., Nishi R., Maremoto N. and Nasu T. Comparison of circadian oscillation of melatonin release in pineal cells of house sparrow, pigeon and Japanese quail, using cell perfusion systems. *Brain Res*. 651. pp: 209-214 (1994).

Murphy J.W. Immunity to fungi. *Current Opinion in Immunology*, 2. pp: 360 (1990).

Nakahara K., Murakami N., Nasu T., Kuroda H. and Murakami T. Individual pineal cells in chick possess photoreceptive, circadian clock and melatonin-synthesizing capacities *in vitro*. *Brain Res.* 774. pp: 242-245 (1997).

Nathan C.F. Respiratory burst in adherence human neutrophils: triggering by colony-stimulating factor CSF-GM and CSF-G. *Blood*, 73. pp: 301-306 (1988).

Nelson R. J. and Demas G. E. Seasonal changes in immune function, *Q. Rev. Biol.* 71. pp: 511-548. (1996).

Nelson R. J., and Demas G.E. y Klein S.L. Photoperiod mediation of seasonal breeding and immune function in rodents: A multifactorial approach. *Amer. Zool.* 38: 226-237. (1998).

Nielson C.P. b-adrenergic modulation of the polymorphonuclear leukocyte respiratory Bursa is dependent upon the mechanism of the activation. *J. Immunol.* 139. pp: 2392-2397 (1987).

Nishihara K., Horiuchi S., Eto H., Uchida S. The development of infants circadian rest-activity rhythm and mothers rhythm. *Physiology & Behavior.* 77. pp:91-98 (2002).

Nycyk J., Drury J., Cooke R.: Breath pentane as a marker for lipid peroxidation and adverse outcome in preterm infants. *Arch Dis Fetal Neonatal Ed.* (79) pp: F67-F69 (1998).

Oberitter H., Glatthaar B., Haser V. and Schimdt K. H. Effect of functional stimulation on ascorbate content in phagocytes under physiological and pathological conditions. *Int. Arch. Allergy appl. Immun.* 81. pp: 46-50 (1986).

Ohshima K. and Matsuo S. Immunohistochemical localization of serotonin in the pineal gland of the chicken during post-hatching development in relation to light-dark cycle. *Anat. Anz.* 173. pp: 65-72 (1991).

Okano T., Yoshizawa T. and Fukada Y. Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature.* 372. pp: 94-97 (1994).

Okano T., Yamazaki K., Kasahara T. and Fukada Y. Molecular cloning of heterotrimeric G-protein alpha-subunits in chicken pineal gland. *J. Mol. Evol.* 44. pp: 91-97 (1997).

Oksche A., Kirschstein H., Farner D.S. Electron microscopic and experimental studies of the pineal organ in the white-crowned sparrows *Zonotrichia leucophrys gambelii*, *Z. Zellforsch.* 124. pp: 247 (1972).

Okuda S., Nishiyama N., Saito H. Y H. Katsuki , 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J. Neurochem.* 70:299–307 (1998).

Olah I. The pineal gland is a transitory lymphoid organ in the chicken. Abstract of Conference: Neuroendocrine-Immune-Interactions, September 8-10, Ladek Zdrój near Wroclaw, Poland. (1995).

Olson C. Variation in cells and haemoglobin content in blood of normal domestic chickens. *Cornell Vet.* pp: 235 (1937).

Omura Y. and Oguri M. Histological studies on the pineal organ of 15 species of teleost fishes. *Bull. Jap. Soc. Fish.* 35. pp: 991-1000 (1969).

Oram J.D. and Reiter B. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chemotacting agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 170. pp: 351-356 (1968).

Osculati F. Fine structural localization of acid phosphatase and arylsulfatase in the chick heterophil leukocytes. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 109. pp: 398-406 (1970).

Osol G., Schwartz B. and Foss D.C. Effect of time, photoperiod, and pinealectomy on ocular and plasma melatonin concentrations in the chick. *Gen Comp. Endocrinol.* 58. pp: 415-420 (1985).

Olsen Erlend O., Neckelmann D., Ursin R. Diurnal differences in L-tryptophan sleep and temperature effects in the rat. *Behavioural Brain Research.* 65. pp 195-203. (1994).

Palm L., Blennow G., Wetterberg L. Long-term melatonin treatment in the blind children and young adults with circadian sleep-wake disturbances. *Dev Med Child Neurol.* 39. pp:319-325 (1997).

Pang S.F., Chow P.H., Wong T.M., Tso E.C. Diurnal variations of melatonin and N-acetylserotonin in the tissues of quails (*Coturnix sp.*), pigeons (*Columba livia*), and chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol.* 51(1). pp: 1-7 (1983).

Pelham R.W. A serum melatonin rhythm in chickens and its abolition by pinealectomy. *Endocrinology.* 96(2). pp: 543-6 (1975).

Penev P., Zee P. Melatonin: a clinical perspective. *Ann Neurol* 1997; 42. pp:545-553 (1997).

Pennial R. and Spitznagel J.K. Chickens neutrophils. Oxidate metabolism in phagocytic cells devoid of myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72. pp: 5012-5015 (1975).

Petrie K. J., Conaglen V. Thompson L, Chamberlain K. Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *Br Med J.* 1989 298. pp :705-7 (1989).

Pickard G.E. and Tang W.X. Individual pineal cells exhibit a circadian rhythm in melatonin secretion. *Brain Res.* 627. pp: 141-146 (1993).

Pickard G.E. and Tang W.X. Pineal photoreceptors rhythmically secrete melatonin. *Neurosci. Lett.* 171. pp: 109-112 (1994).

Pratt B.L. and Takahashi J.S. Vasoactive intestinal polypeptide and alpha 2-adrenoceptor agonists regulate adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and melatonin release in chick pineal cell cultures. *Endocrinology.* 125(5). pp: 2375-84 (1989).

Prince R.C. and Gunson D.E. Superoxide production by neutrophils. *TIBS.* 12. pp: 86-87 (1987).

Prosser R.A., Edgar D.M., Heller H.C., Miller J.D. A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Res.* 643(1-2). pp: 296-301 (1994).

Quay W.B. Volumetric and cytologic variation in the pineal body of *Peromyscus leucopus* (Rodentia) with respect to sex, captivity and day-length. *J.Morph.* 98. pp: 471-495 (1995).

Ralph C.L. and Dawson D.C. Failure of the pineal body of 2 species of birds (*Coturnix coturnix japonica* and *Passer domesticus*) to show electrical responses to illumination. *Experientia.* 24 (2). pp: 147-148. (1968).

Ralph C.L., Binkley S., MacBride S.E. and Klein D.C. Regulation of pineal rhythms in chickens: effects of blinding, constant light, constant dark, and superior cervical ganglionectomy. *Endocrinology.* 97(6). pp: 1373-8 (1975).

Reiter R.J. The pineal gland. *Vols. I, II, III.* Boca Raton, CRC Press (1981).

Reiter R.J. Novel intracellular actions of melatonin: its relation to reactive oxygen species. *Front. Horm. Res.* 21. pp: 103-117 (1997).

Richdale A.L. Sleep problems in autism: prevalence, cause, and intervention. *Dev Med Child Neurol* 1999; 21. pp:59-60 (1999).

Robertson L.M. and Takahashi J.S. Circadian clock in cell culture: I. Oscillation of melatonin release from dissociated chick pineal cells in flow-through microcarrier culture. *J. Neurosci.* 8. pp: 12-21 (1988a).

Rodríguez A.B., Lea R.W. Changes in the immune response of the ring dove (*Streptotelia risoria*). *Comp. Biochem . Physiol.* 109. pp: 157-66 (1994).

Rodríguez, A.B., Ortega, E. Lea, R.W. and Barriga, C. Melatonin and the phagocytic process of heterophils from ring dove (*Streptopelia risoria*). *Molecular and Cellular Biochemistry.* 168. (1-2). pp : 185-90 (1997).

Rodriguez, A.B., Nogales, G., Ortega, E., Barriga, C. Melatonin controls of superoxide anion level: modulation of superoxido dismutase activity in ring dove heterophils. *Journal Pineal Research.* 24 (1). pp : 9-14 (1998).

Rodríguez A.B., Marchena J.M., Nogales G., Durán J., Barriga C. Correlation between circadian rhythm of melatonin and the phagocytosis and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *Journal Pineal Research.* 26(1). pp: 35-42 (1999).

Rodríguez A. B., Terron P., Durán J., Ortega E. and Barriga C. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J. Pineal Res.* 31(1). pp: 31-38. (2001).

Roitt I., Brostoff J., and Male D. *Inmunología.* 5ª Edición.. Harcoort (2000).

Rojas W. *Inmunología. Ind. Fondo Educ. Interamericana.* Medellín. (Colombia). pp: 29-50 (1982).

Root R.K. and Cohen M.S. The microbicidal mechanism of human neutrophils and eosinophils. *Rev. Infect. Dis.* 3. pp: 565-598 (1981).

Rosolowska-Huszcz D., Thaela M.J., Jaguar M., Stepien D. and Skwarlo-Sonta K. Pineal influence on the diurnal rhythm of nonspecific immunity indices in chickens. *J. Pineal. Res.* 10. pp: 190-195. (1991).

Rossi F., Berton G., Bellavite D. and Della Bianca V. The inflammatory cells and their respiratory burst. *Inflammation Res.* 3. pp: 329-340 (1982).

Sack R. and Lewy A. Melatonin administration to blind people: phase advances and entrainment. *J Biol Rhythms.* 6. pp:249-61. (1991).

Sack R. and Lewy A. Human circadian rhythms: Lessons from the blind. *Ann Med.* 25. pp:303-5 (1992).

Sato T. and Wake K. Innervation of the avian pineal organ. A comparative study. *Cell Tissue Res.* 233(2). pp: 237-64 (1983).

Sbarra A.J. and Karnousky M.L. The biochemical basis of phagocytosis. Metabolic Changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 234. pp: 1355-1362 (1959).

Scott A.. Developing Circadian Rhythmicity in infant. *Pediatrics* (2) pp: 373-381.

Schmitz Y. and Witkovsky P. Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience.* 78(4). pp:1209-16 (1997).

Schöcksnadel K., Widner B., Bergant A., Neurauter G., Schennach H., Schöcksnadel H. and Fushs D. Longitudinal study of tryptophan degradation during and after pregnancy. *Life Sciences* 72(7):785-93 (2002).

Semple-Rowland S., Larkin P., Darin Bronson J., Nykamp K, Wolfgang J and Wolfgang B. Characterization of chicken GCAP Gene Array and Analyses of GCAP1, GCAP2, and GC1 Gene Expression in Normal and rd Chicken Pineal. *Molecular Visión*. 5:14 (1999).

Serino I., D'Istria M. and Monteleone P. A comparative study of melatonin production in the retina, pineal gland and harderian gland of *Bufo viridis* and *Rana esculenta*. *Comp Biochem Physiol C*. 106(1). pp:189-93 (1993).

Shafer W.N., Martin L.E. and Spitzagel J.K. Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisoprophyl fluorophosphates. *Infect. Immun.* 45. pp: 29-35 (1984).

Shilotri P.G. and Bhat K.S. Effect of megadoses of vitamin C on bactericidal activity of leukocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 30. pp: 1077-1081 (1977).

Shinohara K., Honma S., Katsuno Y., Abe H. and Honma K. Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(16). pp: 7396-400 (1995).

Silverstein S.C., Greenberg S., Di Virgilio F. and Steinberg T.H. Phagocytosis. In: *Fundamental Immunology*.. Ed. Paul W. Raven Press. New York. pp: 703 (1989).

Simmonds N., Allen R., Stevens T. and cols. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. (103) pp:186-96. pp:(1992).

Skwarlo-Sonta K., Raczynska J., Zujko J., Koziowska E., Gladis A., Laskowska H. y cols. Lack of the ant-glucocorticoid activity of melatonin in chicken immune system. *Adv. Pineal Res.* 7. pp: 137-142 (1994).

Skwarlo-Sonta K. Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol. Exp.* 56. pp: 341-357. (1996).

Skwarlo-Sonta K. Reciprocal interdependence between pineal gland and avian immune system. *Neuroendocrinology*. 20. pp: 151-156. (1999).

Skwarlo-Sonta K. Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuroendocrinology Letteres*. 23(1). pp: 61-66. (2002).

Skwarlo-Sonta.; Majewski P.; Markowska M.; Oblap R. y Olszanska B. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune System. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81: 342-349. (2003).

Spitznagel J.K. Bactericidal mechanism of the granulocytes. In: *Progress in clinical and biological research*. Ed. T.J. Greenwalt and G.A. Jamiesen. 13, Alan R., Liss. Inc., New York (1977).

Stankova L., Gerhardt N.B., Nabgel L. and Bigley R.H. Ascorbate and Phagocyte function. *Infect. Immun.* 12. pp: 252-256 (1975).

Stendahl O., Hartwig J., Brotsch E. and Stossel T. Distribution of actin binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J. Cell. Biol.* 84. pp: 215 (1980).

Steinberg L., O'Connell N., Hetch T., Frances P. and Birch L. Tryptophan intake influences infant's sleep latency. *Human and clinical nutrition*. 17: 81-91 (1992).

Stossel T.P. Medical progress. Phagocytosis. *N. Eng. J. Med.* 290. pp: 717-723; pp: 774-780; pp: 833-839 (1974).

Stossel T.P. and Hartwig, J.H. Interaction of actin of rabbit pulmonary macrophages. *J. Cell. Biol.* 68. pp: 602-619 (1976).

Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland *Experientia*. 45. pp: 922-932 (1989).

Sun J.H., Reiter R.J, Mata N.L. and Tsin A.T. Identification of 11-cis-retinal and demonstration of its light-induced isomerization in the chicken pineal gland. *Neurosci Lett.* 133(1). pp: 97-9 (1991).

Sun J.H., Reiter R.J., Hattori A., Yaga K., Herbert D.C. and Tsin A.T. Phototransduction-related circadian changes in indoleamine metabolism in the chick pineal gland *in vivo*. *J. Pineal Res.* 15. pp: 132-137 (1993).

Tan D. X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C., Reiter R. J. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1: 57-60. (2000).

Tamotsu S., Kork H. W., Morita Y. and Oksche A. Immunocytochemical localization of serotonin and photoreceptor-specific protein (rodopsin, S-antigen) in the pineal complex of the river lamprey, *Lampetra japonica*, with special reference to photoneuroendocrine cells. *Cell Tissue Res.* 262. pp: 205-216 (1990).

Takahashi J.S., Hamm H. and Menaker M. Circadian rhythm of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77. pp: 2319-2322 (1980).

Takahashi J.S., Murakami N., Nikaido S.S., Pratt B.L. and Robertson L.M. The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: cellular regulation of circadian rhythms by light, second messengers, and macromolecular synthesis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 45. pp: 279-348 (1989).

Takahashi J.S. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci.* pp: 18:531-53 (1995).

Tauber A. I. Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood.* 69. pp: 711-720 (1987).

Terrón P., Shai J. M., Harley S., Lea R. W. and Rodríguez A. B. Melatonin: An antioxidant at physiological concentrations. *J. Pineal Res.* 31(1). pp: 95-96. (2001)

Thilbault C. Falcón J., Greenhouse S.S., Lowery C.A., Gern W.A. and Collin J.P. Regulation of melatonin production by pineal photoreceptor cells: role of cyclic nucleotides in the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neurochem.* 61. pp: 332-339 (1993a).

Underwood H., Binkley S., Siopes T. and Mosher K. Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies, and blood of Japanese quail (*Conturnix conturnix japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 56. pp: 70-81 (1984).

Vakkuri O., Rintamaki H. and Leppaluoto J. Presence of immuno-reactive melatonin in different tissues of the pigeon (*Columba livia*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 58. pp: 69-75(1985).

Valsecia y Malgor. Farmacología de la melatonina (1998).

Van't Hof T.J. and Gwinner E. Development of post-hatching melatonin rhythm in zebra finches (*Poephila guttata*). *Experientia.* 52(3). pp: 249-52 (1996).

Van Veen T., Ekstrom P., Nyberg L., Borg B., Vigh-Teichmann I., and Vigh B. Serotonin and opsin immunoreactivities in the developing pineal organ of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *L. Cell Tissue Res.* 237. pp: 559-564 (1984).

Varsila E., Hallman M., Andersson S.: Free-radical-induced lipid peroxidation duration the early neonatal period. *Acta Paediatr.* (83): 692-5. (1994).

Vigh B., Vigh-Teichmann I. Light-and electron-microscopic demonstration of immunoreactive opsin in the pinealocytes of various vertebrates. *Cell Tissue Res.* 221(2). pp: 451-63 (1981).

Vigh B., Vigh-Teichmann I., Debreceni K. and Takacs J. Similar fine structural localization of immunoreactive glutamate in the frog pineal complex and retina. *Arch Histol Cytol.* 58(1). pp: 37-44 (1995).

Vigh B., Debreceni K., Fejer Z. and Vigh-Teichmann I.I. Immunoreactive excitatory amino acids in the parietal eye of lizards, a comparison with the pineal organ and retina. *Cell Tissue Res.* 287(2): pp: 275-83. (1997).

Vivien-Roels B., Pitrosky B., Zitouni M., Malan A., Canguihem B., Boun D. and Pevet P. Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Criostus cricens.* *Gen Comp. Endocrinol.* 106. pp: 85-94 (1997).

Voisin P. and Collin J.P. Regulation of chicken pineal arylalkylamine-N-acetyl transferase by postsynaptic alpha 2-adrenergic receptors. *Life Sci.* 39(21). pp: 2025-32 (1986).

Vollrath M. The pineal organ. *Handb. Der mikrosk. Anat. De Menschen VI/ 7*, Berlin-Heidebberg-New York- Springer-Verlag (1981).

Wainwright S.D. and Wainwright L.K. Regulation of the cycle in chick pineal serotonin N-acetyltransferase activity in vitro by light. *J Neurochem.* 35(2). pp: 451-7 (1980).

Wainwright S.D. and Wainwright L.K. The relationship between variations in levels of serotonin acetyltransferase activity and cGMP content in cultured chick pineal glands. *Can J Biochem.* 59(8). pp: 593-601 (1981).

Wallace R.B., Altman J., Das G.D. An autoradiographic and morphological investigation of the postnatal development of the pineal body. *Am. J. anat.* 126. pp: 175-183 (1969).

Wang X. L., Yuan H. and Pang S. F. Specific binding of [¹²⁵I] Iodomelatonin in pigeon and quail spleen membrane preparations and effect with hydrocortisone-treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* 14. pp: 292-295. (1993).

Wang X. T., Pappas G. D., Sagen J. and Unnerstall J. R. Cells expressing preproenkephalin mRNA in the rat pineal gland are not serotonin-producing pinealocytes: evidence using in situ hybridization combined with immunocytochemistry for serotonin. *Cell Mol. Neurobiol.* 16. pp:73-84 (1996).

Weiss J., Victor M., Stendahl O.Y. and Elsebach P. Killing of gram-negative bacteria by polymorphonuclear leukocytes. Role of an O₂-independent bactericidal system. *J. Clin. Invest.* 69. pp: 954-970 (1982).

Widner B., Ledochowosky M., and Fush D. Interferon- γ -induced tryptophan degradation: neuropsychiatric and immunological consequences. *Current Drug Metabolism.* 1(2013). pp:193-204 (2000).

Winklhofer- Roob B., Ellemunter H., Fruhwirth M. y cols.: Plasma vitamin C concentration in patient with cystic fibrosis: evidence of association with lung inflammation. *Am J Clin Nutr.* (65):1858-66. (1997)

Williams R. Inmunología 5nd. Ed. *Fondo Educ. Interamericano.* Medellín (Colombia). pp: 29 (1982).

Willis H.E., Browder B., Feister A.J., Mohanakumar T. and Ruddy S. Monoclonal antibody to human IgG Fc receptors. Cross linking of receptors induces lysosomal enzyme release and superoxide generation by neutrophils. *J. Immunol.* 140. pp: 234-239 (1988).

Wispe J., Bell E., Roberts R.: Assessment of lipid peroxidation in newborn infant and rabbits by measurements of expired ethane and pentane: Influence of parenteral lipid infusion. *Pediatr Res* (19) 374-9. (1995).

Wurtmann R.J., Axelrod J., Kelly D.E. The pineal. *Academic Press*, New York – London (1968).

Wyatt R. J., Kupfer D.J., Sjoersma A., Engelman K. and Snayder F. Effects of L-tryptophan (a natural sedative) on human sleep. *The lancet*. 296 (7678) pp: 842-846.

Yin H.L. and Stossel T.P. control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*. 281. pp: 583-586 (1979).

Youbicier-Simo B.J., Boudadar F., Mekaouche M., Bayle J.D. y Bstide M. A role bursa fabricii and bursin in the ontogeny of pineal biosynthetic activity in the chicken. *J. Pineal Res.* 21: 35-43. (1996).

Yu Z.H., Lu Y. and Pang S.F. [125] Iodomelatonin bindings sites in spleens of birds and mammals. *Neurosci Lett*. 125.pp: 175-8 (1991).

Zachmann A., Falcon J., Knijff S.C., Bolliet V. and Ali M.A. Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol*. 86(1). pp:26-33 (1992).

Zakhirech B., Block L.H. and Root R.K. Neutrophil function and host resistance. *Infection..* 7. pp: 88-98 (1979).

Zatz y Mullen D. A. Norepinephrine, acting via adenylate cyclase, inhibits melatonin output but does not phaseshift the pacemaker in cultured chick pineal cells. *Brain Res*, 450: 137-143. (1988).

Zatz M. Agents that affect calcium influx can change cyclic nucleotide levels in cultured chick pineal cells. *Brain Res*. 583. pp: 304-307 (1992).

Zatz M. Melatonin rhythms: trekking toward the heart of darkness in the chick pineal. *Sem. Cell Dev. Biol.* 7. pp: 811-820 (1996).

Zatz M., Kasper G. and Marquez C.R. Vasoactive intestinal peptide stimulates chick pineal melatonin production and interacts with other stimulatory and inhibitory agents but does not show alpha 1-adrenergic potentiation. *J. Neurochem.* 55. pp: 1149-1153 (1990).

Zatz M. Does the circadian pacemaker act through cyclic AMP to drive the melatonin rhythm in chick pineal cells? *J Biol Rhythms.* 7(4):301-11(1992).

Zatz M., Lange G.D. and Rollag M.D. What does changing the temperature do to melatonin rhythm in cultured chick pineal cells? *Am. J. Physiol.* 266. pp: 50-58 (1994).

Zimmerman B.L. and Tso MO. Morphologic evidence of photoreceptor differentiation of pinealocytes in the neonatal rat. *J Cell Biol.* 66(1). pp: 60-75 (1975).

La realización de la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de los proyectos: del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Ref.: AGL 2000 0182-P4-03) y de los Laboratorios Ordesa S.L. (Ref.:003-03).