

Radioinmunoanálisis de melatonina: valoración de la función pineal en ratas macho hiperprolactinémicas y controles

M. A. Villanúa, A. I. Esquifino y J. A. F. Tresguerres

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28040 Madrid

(Recibido el 29 de julio de 1985)

M. A. VILLANUA, A. I. ESQUIFINO y J. A. F. TRESGUERRES. *Melatonin Radioimmunoassay: Pineal Function Evaluation in Control and Hyperprolactinaemic Male Rats*. Rev. esp. Fisiol., 42 (2), 227-232. 1986.

A sensitive and specific radioimmunoassay for melatonin quantification in rat pineal and biological fluids is described. The assay utilizes a specific antibody and H^3 -melatonin as tracer. Bound and free fraction were separated by a saturated sulphate ammonium solution. The sensitivity of the method is 9 pg/ml. The intra and interassay variation coefficient were 10.4 and 13.6 % respectively. By means of this RIA the content of melatonin in the pineal gland in male rats made hyperprolactinemic on day 30 of life and their respective sham-operated controls has been evaluated. The results showed that the melatonin content measured at 2 a.m. was reduced in the trasplanted animals when compared to control group, not only shortly (48 hours) after the trasplant operation, but also in the chronic situation; though suggesting that further investigations are necessary to deepen and understand the interrelationships between prolactin and pineal gland and their effect on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Key words: Hyperprolactinaemia, Melatonin, Prolactin, Radioimmunoassay.

Existe abundante literatura indicando que la prolactina ejerce un efecto inhibidor sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, no sólo en animales de experimentación sino también en el hombre (1-3, 12, 17, 19), a través de una disminución en los niveles circulantes de LH (7).

Más recientemente, la glándula pineal ha sido involucrada como moduladora de la función reproductora. Es bien conocido el papel de la melatonina como agente antigonadotrópico al mismo tiempo

que estimula la secreción de prolactina (18) en el animal control, pero se desconoce el papel que podría jugar la pineal en las alteraciones que se encuentra en la rata macho hiperprolactinémica (7).

Por todo esto, el objetivo del presente trabajo ha sido la puesta a punto de un RIA sensible y específico para la medida de melatonina en tejidos y fluidos biológicos a fin de poder evaluar la función pineal en condiciones de hiperprolactinemia.

Material y Métodos

Animales. Ratas macho de la raza Wistar, mantenidas en ciclos de luz/oscuridad (14L:10O) a partir del día del destete y en condiciones de temperatura controlada y comida y bebida *ad libitum*. En el día 30 de vida se distribuyeron en dos grupos (de 42 animales cada uno): Grupo experimental formado por ratas hechas hiperprolactinémicas, mediante el trasplante de una adenohipófisis procedente de un hermano de camada, bajo la cápsula renal, como se ha descrito anteriormente (7) y grupo control, formado por ratas a las que se les simuló la operación.

Las ratas de ambos grupos fueron decapitadas a las 2 a.m. bajo luz roja y a distintos tiempos: 2, 4, 8, 14, 30 y 40 días tras la operación de trasplante. La sangre troncular se recogió en tubos sin anticoagulante. Se dejó retraer el coágulo 2 horas a temperatura ambiente y se centrifugó a 1.500 g durante 15 min. El suero se separó y se almacenó a -20°C hasta el momento de su valoración. Los tejidos congelados se sonicaron en 250 μl de tampón fosfato 0,01 M.

En todos los sueros se determinaron las concentraciones de prolactina, mediante un radioinmunoanálisis específico, utilizando los reactivos suministrados por el NIAMDDK y ampliamente validado y puesto a punto en el propio laboratorio (20).

Los niveles de melatonina, en la glándula pineal se determinaron mediante un método de radioinmunoanálisis específico cuya puesta a punto se discute a continuación.

La melatonina tritiada con actividad específica de 26,4 Ci/mmol (1×10^9 MBq) fue obtenida de «New England Nuclear». La melatonina no radiactiva fue obtenida de Sigma. Todos los solventes (reactivos de análisis) obtenidos de Merck fueron utilizados sin purificación previa. La albúmina sérica bovina (BSA,

Cohn fracción V) fue adquirida de Serva y el sulfato amónico de Merck.

Extracción de melatonina. A 500-1.000 μl de un «pool» de suero que se utiliza como control y a 200 μl del homogenado tisular se adicionan 1.000 cpm (≈ 2.700 dpm) de melatonina tritiada. La extracción de melatonina se realiza con 5 ml de diclorometano, agitando durante un minuto en vortex.

La fase acuosa se aspira y el diclorometano se transfiere a un tubo limpio y se evapora a sequedad bajo corriente de aire. El extracto seco se diluye en 300 μl de tampón de trabajo (dilución a partes iguales de una solución de 2 mg/ml de gelatina en agua destilada y de tampón fosfato 0,02 M, más 1,75 % de cloruro sódico y 1,86 % de ácido etilendiaminotetracético), a pH 7,4. Las recuperaciones se cuentan en 80 μl del extracto.

Radioinmunoanálisis de melatonina. Se utilizan tubos de vidrio en los que se pipetea las muestras problema y las soluciones patrón (de 0 a 3.200 pg/tubo) disueltas en 200 μl de tampón. Se añaden 100 μl de solución de anticuerpo antimelatonina a una dilución final de 1:16.800. Se agitan brevemente los tubos y se mantienen durante 30 min a temperatura ambiente, transcurridos los cuales se añaden 100 μl de tampón conteniendo la melatonina tritiada (≈ 21.600 dpm). Tras agitar de nuevo, los tubos se incuban 1 h a 37°C . Para separar las fracciones libre y unida se añaden 0,7 ml de solución saturada de sulfato amónico en agua a pH 7 y a $2-4^{\circ}\text{C}$. Tras agitar brevemente y mantener a $2-4^{\circ}\text{C}$ durante 30-45 min, se centrifugan en frío a 1.500 g durante 15 min. El sobrenadante se elimina por aspiración y el precipitado se resuspende en 200 μl de NaOH 1 M. Se añaden finalmente 2 ml de solución de centelleo (Histagel) directamente en los tubos de vidrio, se agitan y se introducen una vez tapados en viales de

centelleo para el conteo de radiactividad durante 4 min, en un espectrómetro «B».

Estadística. La evaluación de los resultados de prolactina y melatonina, se realizan mediante un análisis de la varianza y un test de la «t» de Student.

Resultados

La recuperación media de la melatonina tritiada añadida a través del proceso de extracción fue de $51,6 \pm 14,2$ (DS).

La sensibilidad de la curva patrón definida como la más pequeña cantidad de melatonina que significativamente es diferente de 0 en el límite de confianza del 95 % es de 6 pg/tubo, lo que equivale a 9 pg/ml (fig. 1).

Los blancos del análisis se estimaron midiendo agua destilada tras extracción con diclorometano. Debido a que el valor del blanco, medido en la curva patrón, interfería en alguna de las medidas, se ha obviado este problema realizando una corrección de los mismos en la curva estándar. Se construye la curva en etanol, se evapora en corriente de aire y se añade a cada tubo 200 μ l de blancos extraí-

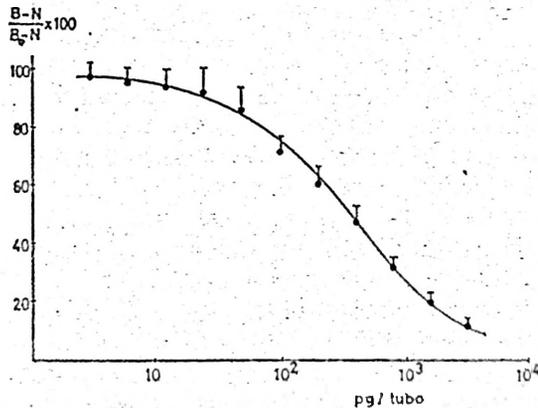


Fig. 1. Curva patrón media obtenida de 5 curvas patrones de diferentes análisis. (Media \pm E.E.M. en cada punto).

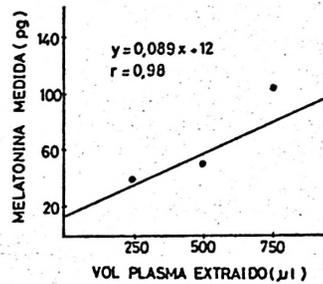


Fig. 2. Estudio de la linealidad mediante cuantificación de melatonina en volúmenes crecientes de un «pool» de suero de rata.

dos y reconstituidos en el tampón de trabajo.

El estudio de la linealidad del anticuerpo se ha realizado mediante la cuantificación de melatonina en volúmenes progresivos de plasma, obteniéndose una buena linealidad, con un coeficiente de correlación de 0,98 (fig. 2).

La exactitud del método se evaluó añadiendo cantidades crecientes de melatonina fría a un «pool» de plasma, procesándose las muestras según la técnica descrita. Los valores obtenidos coinciden razonablemente con las cifras teóricas esperadas en cada caso ($r = 0,84$) (fig. 3).

Los coeficientes de variación intra e interanálisis de un «pool» de suero de rata fueron de 10,4 y 13,6 % respectivamente.

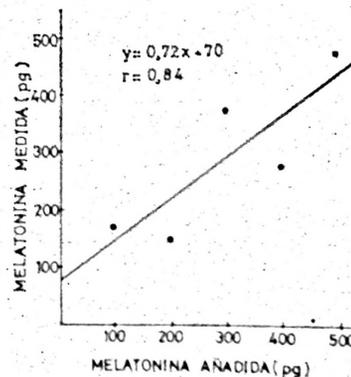


Fig. 3. Recuperación de la melatonina fría añadida a un «pool» de suero de rata.

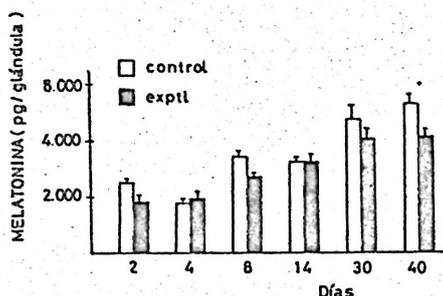


Fig. 4. Contenido de melatonina en la glándula pineal en ratas macho hiperprolactinémicas y controles a distintos tiempos tras la operación de trasplante. (Media \pm E.E.M.). * $p < 0,01$.

El valor medio de melatonina obtenido en un «pool» de suero de ratas viejas, fue de $41,6 \pm 10$ (media \pm e.e.m.).

El contenido de melatonina en la glándula pineal, medido con la técnica expuesta, disminuye 48 h después de la operación en el grupo de animales con trasplante respecto al grupo con operación simulada (fig. 4). Existen oscilaciones en los demás tiempos intermedios estudiados, obteniéndose de nuevo una disminución significativa en la situación

Tabla 1. Niveles plasmáticos de prolactina ($\mu\text{g/l}$) en ratas macho hiperprolactinémicas en el día 30 de vida tras la operación de trasplante.

Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media. El número de animales por grupo es de 6-8.

Días tras la operación	Control	Experimental
2	$2,0 \pm 2,0$	$12 \pm 2,0^*$
4	$3,0 \pm 2,0$	$20 \pm 2,0^*$
8	$3,5 \pm 0,5$	$27 \pm 1,5^*$
14	$4,0 \pm 1,5$	$31 \pm 3,0^*$
30	$4,5 \pm 1,8$	$29 \pm 2,5^*$
40	$5,0 \pm 3,0$	$30 \pm 3,5^*$

* $p < 0,001$, con respecto al grupo control.

crónica en los animales con trasplante. Los niveles plasmáticos de prolactina estaban significativamente incrementados respecto a los del grupo control en todos los tiempos estudiados en condiciones basales (10 a.m.) (tabla I).

Discusión

La determinación de los niveles de melatonina en suero y tejidos tiene interés no sólo desde el punto de vista de la experimentación animal, dado que es el principal producto de la glándula pineal, sino también del hombre. Para su medida se han utilizado otros métodos como son el fluorimétrico (16), espectrometría de gases, acoplado o no con espectrometría de masas (6, 14, 15) y más recientemente se han desarrollado las técnicas de inmunofluorescencia (9, 11).

La puesta a punto de técnicas eventualmente más específicas y que ofrecen las ventajas de reducir el volumen de muestra biológica necesaria, así como una mayor rapidez y rendimiento analítico, es siempre deseable. El radioinmunoanálisis, puesto a punto en este trabajo, puede ser incluido dentro de estas técnicas, siendo suficientemente específico para su aplicación en tejidos y suero de rata y humano.

Es bien conocido que la hiperprolactinemia inhibe el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (7, 19). Si la melatonina ejerce un efecto análogo (5) sobre dicho eje y produce un incremento en la secreción de prolactina, su efecto podría ser directo; mediado por las modificaciones sobre prolactina o bien por un mecanismo que involucre ambas posibilidades.

Los resultados obtenidos indican que el contenido de melatonina en la glándula pineal a las 2 a.m. está reducido en la mayoría de los tiempos estudiados en los animales con trasplante, lo que indicaría que la prolactina ejercería un mecanismo de feed-back tratando de controlar su

síntesis y secreción no sólo a nivel hipotalámico, a través de modificaciones en el turnover de dopamina sobre los que existe un gran número de datos (8, 10), sino también a nivel de la glándula pineal reduciendo el contenido de melatonina.

Sin embargo, existen datos que sugieren que la prolactina ejerce un efecto estimulador sobre la actividad metabólica de la glándula pineal (13) a través de sus receptores en la glándula (4), lo que sugeriría en principio un incremento en la síntesis y secreción de melatonina.

Todos estos datos conjuntamente presentan una gran controversia ya que sugieren una acción dual de la prolactina sobre la glándula pineal dependiendo del modelo experimental utilizado.

Se necesita continuar profundizando en el tema para definir exactamente los mecanismos de interacción entre prolactina y melatonina, así como sus efectos sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Para este propósito ayudará en gran medida la puesta a punto del radioinmunoanálisis específico para la medida de melatonina.

Agradecimientos

Agradecemos al NIAMDDK el suministro del kit para la medida de prolactina (NIH, Bethesda, Maryland, USA), y al Prof. G. M. Brown, por la donación del anticuerpo anti-melatonina (McMaster University, Hamilton, Ontario, Canadá). Se agradece asimismo la ayuda técnica prestada por L. Kraus, P. Calvo, M. D. Cabezudo y J. J. Luengo.

Este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda concedida por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS), y del Comité Conjunto Hispano-Norteamericano (83/108).

Resumen

Se describe la puesta a punto y validación de un radioinmunoanálisis específico y sensible para la medida de melatonina en tejidos y fluidos biológicos. Se utiliza un anticuerpo

específico y melatonina tritiada como trazador. La separación de las fracciones de melatonina unida y libre al anticuerpo se realiza mediante una disolución de sulfato amónico saturado en agua. La sensibilidad del método es de 9 pg/ml y los coeficientes de variación inter e intraanálisis son de 13,6 y 10,4 % respectivamente. Con este análisis se valora el contenido de melatonina en la glándula pineal en ratas macho Wistar hechas hiperprolactinémicas en el día 30 de vida mediante el trasplante de una adenohipófisis bajo la cápsula renal, frente a un grupo control con operación simulada. Los resultados muestran que el contenido de melatonina medido a las 2 a.m. está reducido en el grupo con trasplante, no sólo a tiempos cortos (48 horas) tras la operación sino también en la situación crónica.

Bibliografía

1. Bartke, A.: *Fed. Proc.*, 38, 2577-2581, 1981.
2. Bergh, T., Niliius, S. J. y Wide, L.: *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 89, 945-956, 1978.
3. Bohnet, H. G. y Schneider, H. P. G.: En «Prolactin and Human Reproduction» (Crosignani, P. G. y Robyn, C., eds.). Academic Press, Nueva York, 1977, pp. 153-159.
4. Cardinali, D. P.: *Psychoneuroendocrinology*, 8, 3-30, 1983.
5. Cardinali, D. P.: En «Neuroendocrinología. Aspectos básicos clínicos» (Schiaffini, O., Martini, L., Motta, M., Oriol-Bosch, A. y Tresguerres, J. A. F., eds.). Salvat, Barcelona, 1985, pp. 309-330.
6. Cattabeni, F., Coslow, S. H. y Costa, E.: *Science*, 178, 166-168, 1972.
7. Esquifino, A. I.: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UAM, Madrid, 1979.
8. Esquifino, A. I., Ramos, J. A. y Tresguerres, J. A. F.: *J. Endocr.*, 100, 141-148, 1984.
9. Grota, L. J., Holloway, W. R. y Brown, G. M.: *Neuroendocrinology*, 24, 363-368, 1982.
10. Guldelsky, G. A., Simpkins, J., Mueller, G. P., Meites, J. y Moore, K. E.: *Neuroendocrinology*, 22, 206-215, 1976.
11. Holloway, W. R., Grota, L. J. y Brown, G. M.: *J. Histochem. Cytochem.*, 28, 255-262, 1980.

12. Judd, S. J., Lazarus, L. y Smythe, G.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, **43**, 313-317, 1976.
13. Karasek, M., Lewinski, A., Hansen, J. T. y Reiter, R. J.: *Reprod. Nut. Develop.*, **22**, 785, 1982.
14. Koslow, S. H. y Green, A. R.: *Adv. Biochem. Psychopharmac.*, **7**, 33-43, 1973.
15. Lewy, A. J. y Markey, S. P.: *Science*, **201**, 741-743, 1978.
16. Muller, F. P. y Maickel, R. P.: *Life Science*, **9**, 747-752, 1970.
17. Quigley, M. G., Judd, S. J., Gilliland, G. B. y Yen, S. S. C.: *J. Cl. Endocr. Metab.*, **48**, 718, 1979.
18. Reiter, R. J.: En «Frontiers in Neuroendocrinology» (Ganong, W. F. y Martini, L., eds.). Raven Press, Nueva York, 1982, pp. 287-290.
19. Tresguerres, J. A. F. y Esquifino, A. I.: *J. Endocr.*, **90**, 41-51, 1981.
20. Tresguerres, J. A. F., Esquifino, A. I., Pérez-Méndez, L. F. y López-Calderón, A.: *Endocrinology*, **108**, 83-87, 1981.