

Artículo Original

Melatonina inhibe la respuesta de cortisol a ACTH. Posible mediación a través del gen reloj PER1

Francisco J. Valenzuela^{1a}, Henry E. Reynolds^{1b}, Claudia Torres-Farfán^{2c},
Auristela Rojas^{1d}, Guillermo J. Valenzuela^{3e} y María Serón-Ferré^{1c}

Melatonin inhibition of the cortisol response to ACTH may be exerted through period circadian protein homolog 1 (Per1)

¹Facultad de Medicina, Programa de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²Instituto de Anatomía, Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

³Department of Women's Health, Arrowhead Regional Medical Center, Colton, CA, USA.

^aCandidato a Doctor en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

^bTesista de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

^cPhD.

^eTecnólogo Médico.

^dMédico Cirujano.

Este trabajo fue financiado por la Sociedad Chilena de Endocrinología y Metabolismo (proyecto SOCHED 2009-07) y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondecyt 1090381).

Correspondencia y solicitudes:

María Serón-Ferré (PhD), Salvador 486, Providencia, Santiago, Chile, Departamento de

Fisiopatología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 16038, Santiago 9, Santiago, Chile.

Fax 56-2-2741628

E-mail: mseron@med.uchile.cl

Recibido: 15 septiembre 2011

Aceptado: 21 noviembre 2011

Background: Circadian cortisol production results from the interaction of the circadian production of ACTH, the autonomic nervous system and intrinsic factors within the gland. An additional regulator is the neuro-hormone melatonin. In human adrenal gland cultures, melatonin inhibited ACTH stimulated cortisol production and *Per1* mRNA expression. ACTH actions on the adrenal involve early and late responses. **Aim:** To investigate the effects of melatonin on the time course of ACTH stimulated cortisol production and of *Per1* expression in the lamb adrenal gland. **Material and Methods:** Adrenal glands and plasma of five newborn lambs were obtained. Adrenal glands were cut in 15 mg explants. Three of these explants were stored for RNA extraction. The rest of explants were using in different culture protocols with ACTH and melatonin. **Results:** Lambs had an in vivo a circadian variation in plasma cortisol and in adrenal *Per1* expression. In vitro, ACTH stimulated an early and late increase in cortisol production and an early increase in *Per1* expression reaching a maximum at 3 hours of treatment. Melatonin inhibited the early *Per1* response to ACTH without affecting the early ACTH stimulated cortisol production. However, melatonin inhibited the late response of cortisol production to ACTH. **Conclusions:** The inhibitory actions of melatonin on *Per1* response to ACTH may contribute to the inhibitory effects of melatonin on adrenal steroidogenic response to ACTH.

Key words: Adrenal, Melatonin, Cortisol, clock genes, *Per1*.

Introducción

Los glucocorticoides participan en prácticamente todas las funciones fisiológicas del organismo (respuesta al estrés, metabolismo, proliferación celular y respuesta inmunológica). Además están involucrados en la fisiopatología de enfermedades como la diabetes mellitus, el síndrome metabólico y la enfermedad de Cushing. La secreción de glucocorticoides presenta un marcado ritmo circadiano, con máximas concentraciones plasmáticas al comienzo de la etapa de actividad del individuo^{1,2}. La producción circadiana de cortisol está regulada por la acción coordinada del ritmo circadiano de ACTH en plasma, el sistema nervioso autó-

no a través de la innervación de la glándula suprarrenal y también por factores intrínsecos de esta glándula^{3,4}. Asimismo, la glándula suprarrenal está expuesta cada noche al aumento de la concentración plasmática de melatonina, como consecuencia del ritmo circadiano de síntesis de esta hormona⁵. Melatonina, actuando directamente a través del receptor MT1, inhibe la respuesta de glucocorticoides a ACTH en las glándulas suprarrenal de primates no humanos, ovejas y de ratas⁶⁻⁸. Este efecto inhibitorio de melatonina sobre la producción de cortisol estimulada por ACTH, también está presente en la suprarrenal humana^{9,10}.

La glándula suprarrenal posee un reloj circadiano cuyos genes se expresan en la suprarrenal humana y de otras es-

pecies^{9,11,12}. A nivel molecular, los relojes circadianos son generados por la interacción de un grupo de genes colectivamente denominados genes reloj y sus proteínas en un circuito autoregulado transcripcional/traduccion. Los máximos y mínimos de la expresión de los mRNA de los reguladores positivos Bmal1 y Clock y de los negativos Per1-2 y Cry1-2 muestran una expresión horaria opuesta en las 24-h. El heterodímero BMAL-CLOCK se une a las cajas E del promotor de los genes Per estimulando su transcripción³. Estudios utilizando microarreglos en la suprarrenal de primates no-humanos y en la rata demuestran una organización en las 24-h de la expresión de genes relacionados con diversas funciones biológicas: procesamiento de colesterol, enzimas y cofactores relacionados con la esteroidogénesis, síntesis y metabolismo de catecolaminas y síntesis y degradación de proteínas. Entre estos genes se encuentran Star, 3 β -HSD y Cyp21 y el gen del receptor de ACTH (MCR2)^{11,12,13}. Los genes reloj participan en la estimulación por ACTH de la producción de glucocorticoides, demostrado en ratones *knockout* y mediante supresión con sondas antisentido en la suprarrenal del mono capuchino^{12,14}.

En suprarrenales humanas cultivadas por 12 horas, ACTH junto con estimular la expresión de las proteínas esteroidogénicas StAR and 3 β -HSD y la producción de cortisol y progesterona, también estimuló la expresión del mRNA del gen Per1. Tanto la respuesta esteroidogénica a ACTH como la respuesta del gen reloj Per1, fueron inhibidas por melatonina¹⁰. Las acciones esteroidogénicas de ACTH involucran una respuesta temprana a través de la movilización de colesterol a las mitocondrias y una respuesta más prolongada a través de la inducción de genes de enzimas esteroidogénica¹⁵. Para aclarar sobre cuál de estas respuestas actúa melatonina, investigamos su efecto sobre la producción de cortisol y expresión de Per1 estimulada por ACTH, utilizando como modelo experimental la glándula suprarrenal de un animal diurno, el cordero de 5 días de edad.

Protocolos Experimentales y Métodos

1. Obtención de tejidos y plasma

Obtuvimos las glándulas suprarrenales y plasmas de corderos recién nacidos destinados a investigaciones del Proyecto Fondecyt 1090381. Los corderos nacieron en el vivero de animales mayores de la Facultad de Medicina, ubicado en el Programa de Fisiopatología, Campus Oriente, permaneciendo con sus madres en jaulas individuales en condiciones de luz:oscuridad 12:12, con disposición de agua *ad libitum* y alimentación 2 veces al día. A los 4-6 días de edad los corderos se sedaron con 10 mg/kg de peso de ketamina (KETAMIL, Troy Laboratories, Australia) y se eutanizaron con una sobredosis de 100 mg/kg de peso de tiopental sódico (OPET, Jagsonpal Pharmaceutical Ltd, India) vía intravenosa a las 08 h (n = 4), 14 h (n = 14) y 20 h (n = 5). Se tomó una muestra de sangre heparinizada para medir la concentración de cortisol en plasma y se disecaron y pesaron ambas glándulas su-

prarrenales en condiciones estériles. Inmediatamente de obtenidas, las suprarrenales se cortaron en explantes de 15 mg, tres explantes (representando la expresión de genes *in vivo*) se guardaron en TRIzol (INVITROGEN, California, USA) o en buffer de Lisis (PROMEGA, Madison, WI, USA) para extracción de RNA. Los restantes explantes de suprarrenal de los animales eutanizados a las 14 h se preincubaron por 9 hrs en medio DMEM-F12, GIBCO, a 37°C, en atmosfera de aire y 5% CO₂ y luego se utilizaron en los tres protocolos de cultivo descritos a continuación. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y de Fondecyt.

2. Protocolos experimentales

Protocolo 1. Efecto directo de melatonina sobre la producción de cortisol y la expresión del gen reloj Per1 en respuesta al tratamiento por 12h con ACTH.

Una vez completado el precultivo, los explantes de suprarrenal de 5 corderos se cultivaron en triplicado en 500 μ L de medio solo (control), en medio con ACTH 10 nM y en medio con ACTH 10 nM + Melatonina 100 nM. Una vez finalizada la incubación, los explantes de cada tratamiento se pesaron y guardaron en buffer de lisis. El sobrenadante se guardó a -20 °C para medir la producción de cortisol por RIA¹⁶. La producción de cortisol se expresó como porcentaje del control.

Protocolo 2. Efecto directo de melatonina sobre el curso temporal de la respuesta de cortisol a ACTH en explantes de glándula suprarrenal de corderos recién nacidos.

Los explantes de suprarrenal de 5 corderos se cultivaron por 20 horas con medio solo y con ACTH 10 nM. Un tercer grupo de explantes se cultivo por 8 h con ACTH 10 nM + Melatonina 100 nM, luego se cambió el medio por ACTH 10 nM hasta completar las 20 horas de incubación. Cada 4 horas se recolectaron 3 explantes de cada tratamiento que se pesaron y guardaron en TRIzol, el sobrenadante se guardó a -20 °C para medir la producción de cortisol por RIA. La producción de cortisol se expresó como producción por mg de tejido.

Protocolo 3. Efecto directo de melatonina sobre el curso temporal de la expresión de Per1 en explantes de la glándula suprarrenal de corderos recién nacidos durante las primeras ocho horas de tratamiento con ACTH.

Los explantes de 4 animales se mantuvieron en cultivo por 8 h en las condiciones descritas para el protocolo 1, recolectándose 3 explantes cada hora que se pesaron y guardaron en TRIzol para medir la expresión de Per1.

3. Extracción de RNA y transcripción reversa

El RNA de las muestras guardadas en TRIzol se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante, seguido de un tratamiento con DNasa utilizando las columnas del Kit SV Total RNA Isolation System, Promega. Las otras muestras guardadas en buffer de lisis se extrajeron con el mismo kit

Artículo Original

anterior, que incluye un tratamiento con DNAsa. Todos los RNA se almacenaron a -20°C . La transcripción reversa se realizó con $0,3\ \mu\text{g}$ - $1,3\ \mu\text{g}$ de RNA extraídos por buffer de lisis, con $100\ \text{ng}$ de hexameros *random* y $200\ \text{U}$ M-MLV RT (INVITROGEN), volumen final de $20\ \mu\text{L}$. Las condiciones de transcripción fueron: 65°C durante 5 minutos, 4°C durante 5 minutos; 37°C durante 2 minutos; 25°C durante 10 minutos; 37°C durante 50 minutos y 70°C durante 15 minutos.

4. PCR en tiempo real

La expresión del mRNA del gene *Per1* se midió por PCR cuantitativo (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) usando $0,3\ \mu\text{M}$ de partidores de *Per1* (For $5'$ -GGGCAAG-GACTCAGAAAGAA- $3'$ y Rev $5'$ -AGGCTCCATTGCT-GGTAGAA- $3'$; Cushman et al, 2007). Las condiciones de PCR fueron: denaturación inicial de 95°C por 10 min y 45 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C de annealing/extensión por 1 minuto. La cuantificación se realizó interpolando las lecturas de las muestras en una curva estándar elaborada a partir de una cantidad conocida de producto de PCR, purificado y cuantificado mediante el software Scion Image (www.scion-corp.com), con respecto a un marcador de DNA. Los resultados se expresaron como fg *Per1* * $1.000/\text{ng}$ RNA.

5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ error estándar (SEM). Los promedios se compararon por ANOVA de una vía, paramétrico o no paramétrico según lo apropiado y los test de Tukey y Dunn como post-hoc test, utilizando GraphPad Software, Inc. Prism (versión 5.0). Los resultados se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

Resultados

El cordero de 5 días de edad muestra cambios en la concentración plasmática de cortisol plasmático con la hora del día, siendo más alta a las 08 h que a las 20 h (Figura 1A). Los promedios de la concentración plasmática de cortisol calzan en una ecuación periódica de 24 h con un $R^2 = 0,56$ consistente con una variación circadiana. La suprarrenal del cordero recién nacido, expresa el mRNA de *Per1* con un mínimo a las 20 h sugiriendo una oscilación circadiana (Figura 1B). No detectamos diferencias en el peso de la suprarrenal con la hora del día.

Efecto directo de melatonina sobre la producción de cortisol y la expresión del gen reloj *Per1* en respuesta al tratamiento por 12 h con ACTH de explantes de glándula suprarrenal de corderos recién nacidos.

El tratamiento por 12 h con ACTH aumentó la producción de cortisol expresada como porcentaje de la producción por explantes de suprarrenal tratados con medio solo. Asimismo, aumento la expresión del gen reloj *Per1*. La presencia de melatonina en el medio inhibió ambos efectos de ACTH (Figuras 2A y 2B, respectivamente).

Efecto directo de melatonina sobre el curso temporal de la respuesta de cortisol a ACTH en explantes de glándula suprarrenal de corderos recién nacidos.

En mediciones realizadas cada 4 h por 20 h, observamos un patrón bifásico en la producción de cortisol estimulada por ACTH como se observa en la Figura 3. Inicialmente, en las primeras 8 h de tratamiento, se observa un aumento de la producción de cortisol por los explantes estimulados por ACTH, efecto que aumenta en las segundas 8 horas de incubación. La exposición a melatonina en cultivos con ACTH por las primeras 8 horas, no cambia la producción de cortisol durante este intervalo (Figura 3). Sin embargo, esta exposición a melatonina disminuye la producción de cortisol en las siguientes 8 horas de tratamiento con ACTH.

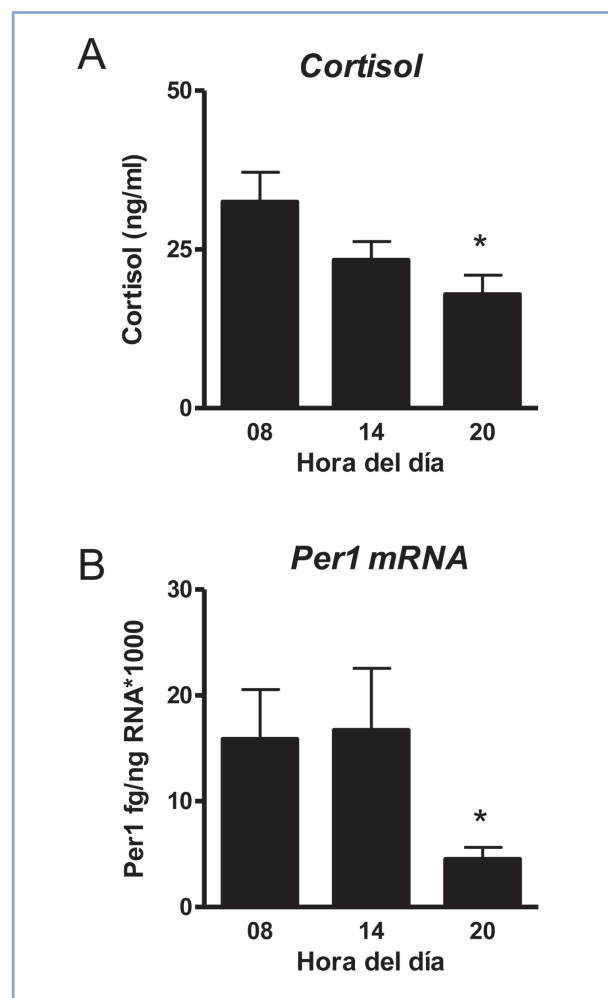


Figura 1. Función circadiana *in vivo* de la glándula suprarrenal del cordero recién nacido. **A.** Promedio $\pm$ SEM de la concentración plasmática de cortisol a las 08 h (n = 4), 14 h (n = 6) y 20 h (n = 5). **B.** Promedio $\pm$ SEM de la expresión cuantitativa del mRNA de *Per1* en las suprarrenales de los mismos animales. * $P < 0,05$, ANOVA una vía, distinto de 08 h y test de Dunn.

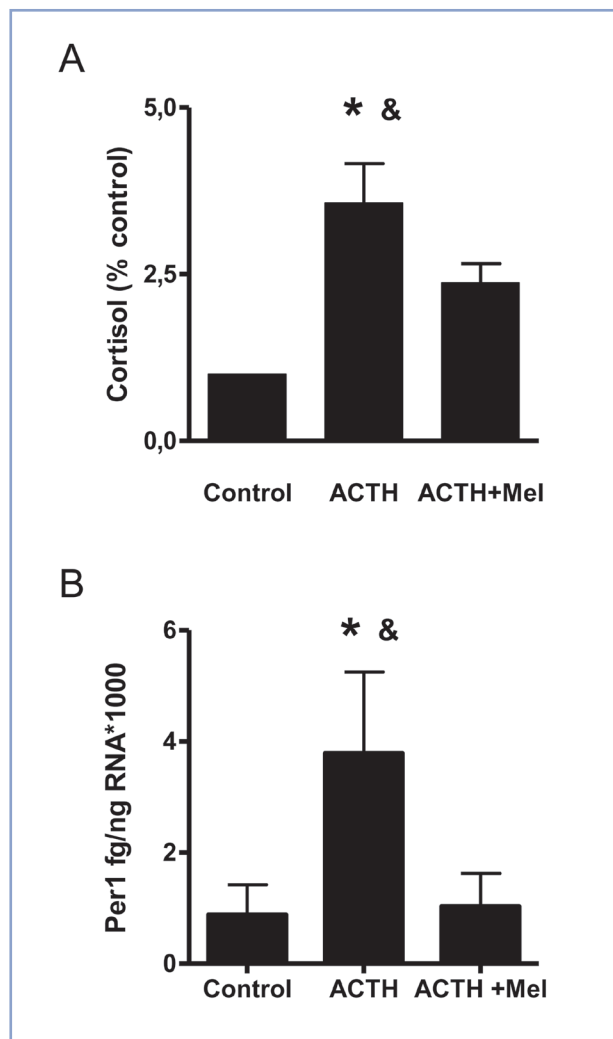


Figura 2. Efecto directo de melatonina sobre la producción de cortisol y la expresión del gen reloj Per1 en respuesta al tratamiento con ACTH por 12 h en explantes de glándula suprarrenal del cordero recién nacido. **A.** Promedio $\pm$ SEM de la producción de cortisol expresada como porcentaje del control, en suprarrenales tratadas con ACTH 10 nM y ACTH + melatonina 100 nM por 12 horas. **B.** Promedio $\pm$ SEM de la expresión cuantitativa del mRNA de Per1, en suprarrenales tratadas con ACTH 10nM y ACTH + melatonina 100nM por 12 horas, *P < 0,05, distinto del control y distinto de ACTH + Mel, ANOVA una vía para mediciones repetidas y test de Tukey.

Efecto directo de melatonina sobre el curso temporal de la expresión de Per1 en explantes de la glándula suprarrenal de corderos recién nacidos durante las primeras ocho horas de tratamiento con ACTH.

Basados en los resultados anteriores estudiamos la expresión de Per1 en respuesta a ACTH y a ACTH más melatonina durante las primeras 8h de tratamiento. Como se observa en la Figura 4A, la expresión de Per1 se mantiene constante cuándo los explantes de suprarrenal se incuban con medio

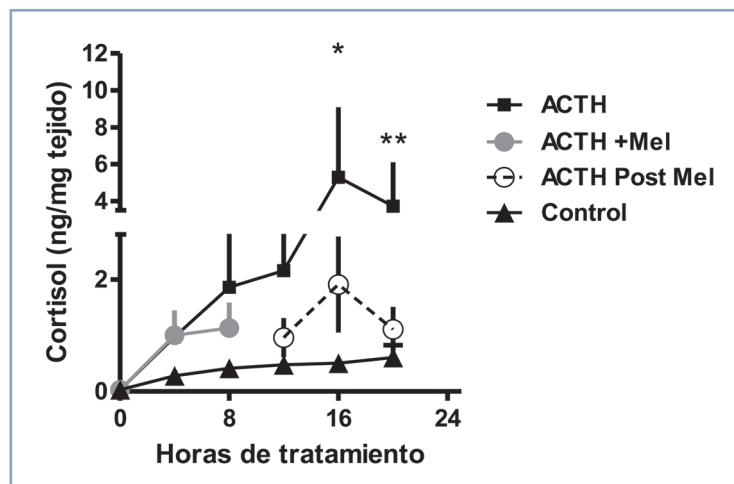


Figura 3. Efecto directo de melatonina sobre el curso temporal de la respuesta de cortisol a ACTH en explantes de glándula suprarrenal de corderos recién nacidos. Promedio $\pm$ SEM de la producción de cortisol medida cada 4 horas en explantes cultivados con medio solo (control), ACTH 10 nM o ACTH + Melatonina 100nM por 7 horas y luego cambiado por ACTH solo (Post melatonina con ACTH). (*, ** P < 0,05 n = 5, distinto de las 0, ANOVA una vía para mediciones repetidas, y test de Tukey).

solo (control). Cuando los explantes son tratados con ACTH, se produce un aumento progresivo en la expresión de Per1, alcanzando un máximo a las 3 horas de incubación para luego disminuir (Figura 4B). El efecto de ACTH sobre la expresión de Per1 es inhibido cuando melatonina está presente en el medio (Figura 4C).

Discusión

En la glándula suprarrenal, ACTH induce una respuesta temprana de la producción de glucocorticoides, a través de la movilización de colesterol a las mitocondrias y una respuesta tardía a través de la inducción de genes de enzimas esteroidogénicas¹⁵. En el presente trabajo, detectamos aumentos tempranos y tardíos en la producción de cortisol estimulado por ACTH. Melatonina inhibió sólo la respuesta tardía de cortisol a ACTH. Junto con esto encontramos que ACTH indujo un aumento temprano de la expresión de Per1, efecto inhibido por melatonina. Las acciones inhibitorias tempranas de melatonina sobre Per1 contribuirían a la inhibición por melatonina de la respuesta de cortisol a ACTH.

En este estudio usamos como modelo experimental la glándula suprarrenal de un animal diurno, el cordero de 5 días de edad. Este animal muestra un ritmo de cortisol en plasma con valores más altos a las 08 que a las 20 horas, patrón similar a lo descrito en otros animales diurnos como el mono y el humano. A nivel suprarrenal encontramos un ritmo de la expresión del gen reloj Per1, lo que sugiere que la suprarrenal de cordero contiene un reloj circadiano, al igual que en otras especies^{9,11,13}.

Artículo Original

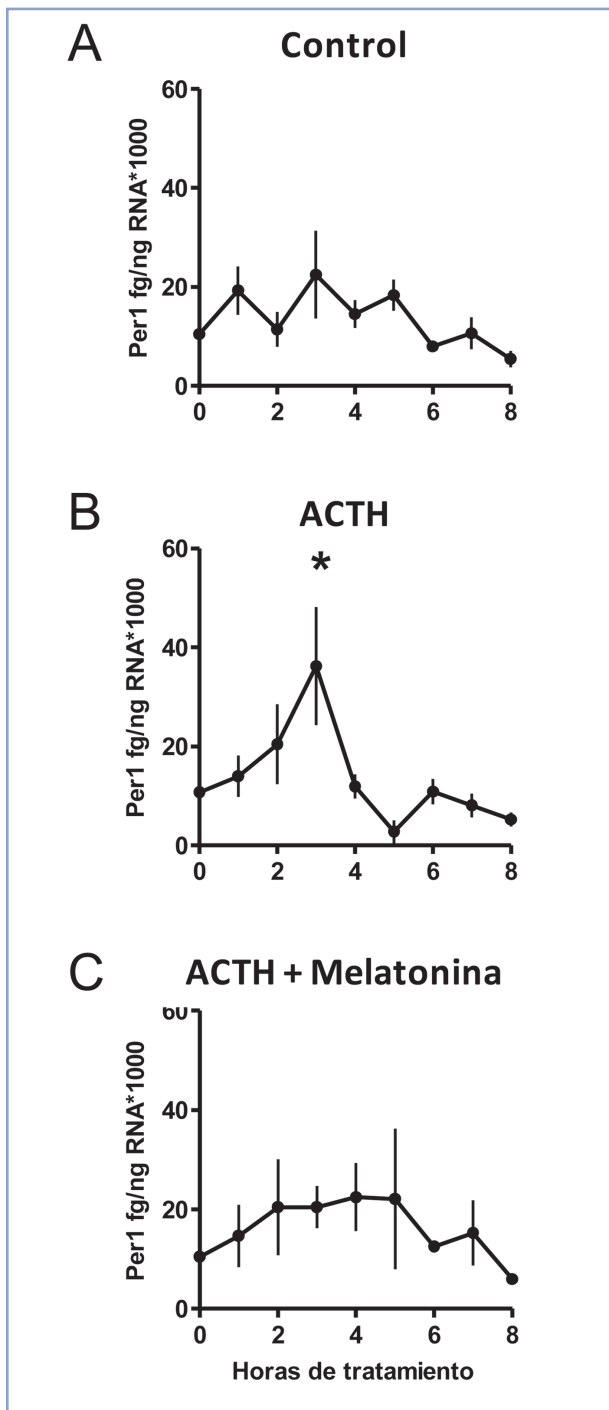


Figura 4. Efecto directo de melatonina sobre el curso temporal de la expresión de Per1 en explantes de la glándula suprarrenal de corderos recién nacidos durante las primeras ocho horas de tratamiento con ACTH. Promedio $\pm$ SEM de la expresión de mRNA de Per1 medida a cada hora en explantes de suprarrenal tratados con (A) medio DMEM solo (control), (B) con ACTH 10 nM o (C) ACTH 100nM + Melatonina 100 nM (ACTH; * $p < 0,05$, $n = 4$, ANOVA de una vía, mediciones repetidas y test de Tukey).

Utilizando explantes de glándula suprarrenales de cordero, confirmamos la acción inhibitoria de melatonina sobre la producción de cortisol estimulada por ACTH ya reportada cuando la exposición a ambas hormonas en cultivo se prolonga por 12 horas o más^{10,7,8}. También confirmamos el hallazgo de una mayor expresión de Per1 en explantes tratados por 12h con ACTH y su inhibición por melatonina. Para ahondar en esta observación, estudiamos el patrón temporal de la respuesta de cortisol a ACTH, medido como la producción de cortisol cada 4h, manteniendo constante la concentración de ACTH, observando dos fases de aproximadamente 8 horas de duración cada una. No observamos efectos de melatonina sobre la fase inicial de la respuesta de cortisol a ACTH. Sin embargo, el tratamiento con melatonina en presencia de ACTH durante las primeras 8 horas inhibió la segunda fase de respuesta a ACTH, indicando que acciones tempranas de melatonina son necesarias para la respuesta tardía. No sabemos si esto refleja una diferencia entre el cordero y otras especies ya que no hay estudios en la literatura de tratamiento con ACTH y melatonina en tiempos menores a 12-h. Por otra parte, el requerimiento de una exposición a melatonina por 12 horas o más para producir el efecto inhibitorio sobre la producción de cortisol inducida por ACTH representaría una característica propia de la suprarrenal. Lo anterior es debido a que en otros tejidos esteroidogénicos (cuerpo lúteo equino y células de Leydig de hámster), los efectos inhibitorios de melatonina sobre la producción de progesterona y testosterona estimulada por HCG y sobre la expresión de genes de enzimas esteroidogénicas, se observa ya a las tres horas de tratamiento^{17,18}.

A continuación, estudiamos detalladamente, a intervalos de una hora, el curso temporal de la expresión de Per1 durante la fase temprana de la respuesta esteroidogénica a ACTH (primeras 8 horas de tratamiento). Observamos que la expresión de Per1 se mantiene constante en explantes tratados con medio solo. En contraste, ACTH induce un rápido incremento en la expresión de Per1 que alcanza un máximo a las tres horas de incubación. Este patrón temporal no se observa en los explantes tratados con ACTH + melatonina, que mantienen niveles constantes de Per1. Este efecto de ACTH sobre Per1 y su curso temporal se asemeja a los efectos a tiempos cortos reportados para PTH en una línea celular de osteoblastos^{19,20}, en células granulosas estimuladas por FSH²¹ y en una línea celular de glioma estimuladas con norepinefrina²². Las tres hormonas mencionadas junto con ACTH, utilizan receptores de membrana acoplados a proteína G, los cuales generan una señal de transducción vía cAMP-Proteína Kinase A y la proteína CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*).

Varios antecedentes asocian los genes reloj, y en particular Per1, con la producción de glucocorticoides por la suprarrenal. *In vivo*, la mayor expresión de Per1 en la glándula suprarrenal se encuentra en las horas en que la producción de cortisol es más elevada¹³. Otros experimentos muestran que la estimulación del nervio esplácnico produce una rápida inducción de la expresión de Per1 en la suprarrenal y aumenta

la secreción de corticosterona²³. Por otra parte, la ausencia de expresión de Per2/Cry1 en ratones *knockout* reduce la producción de corticosterona e inhibe la respuesta a ACTH¹². Finalmente, el bloqueo de la expresión de genes reloj con sondas antisentido inhibe la respuesta a ACTH¹⁴. El presente trabajo muestra además que melatonina afecta directamente la expresión de Per1 inducida por ACTH. Este hallazgo concuerda con observaciones anteriores en que demostramos que melatonina, en ausencia de ACTH es capaz de inhibir la expresión circadiana de Bmal1 y Per2 en cultivo de glándula suprarrenal^{11,24} y con la observación de que melatonina disminuye la expresión de genes reloj en neuronas del núcleo estriado de ratón²⁵.

En conclusión, en el presente trabajo caracterizamos la función circadiana de la suprarrenal de cordero, demostrando que ACTH induce la expresión temprana de Per1. Además, identificamos acciones inhibitorias tempranas de melatonina sobre esta respuesta que podrían ayudar a entender los efectos inhibitorios de melatonina sobre la esteroidogénesis. Las similitudes entre la suprarrenal del cordero y la humana, permiten abordar preguntas respecto a los mecanismos involucrados en la interacción ACTH-genes reloj-melatonina en la regulación de la producción de cortisol, una hormona fundamental en la homeostasis fisiológica.

Agradecimientos

Agradecemos a Natalia Méndez, médico veterinario por las cirugías y el cuidado experto de los animales.

Referencias

- Orth DN and Kovacs WJ. 1998. The adrenal gland. In: Wilson J, Foster D, Kronenberg, Larsen P editors. Williams textbook of Endocrinology 9th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Nader N, Chrousos GP, Kino T. 2010. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. Trends Endocrinol Metab 21: 277-286.
- Dickmeis T. 2009. Glucocorticoids and the circadian clock. J Endocrinol 200: 3-22.
- Engeland WC, Arnhold MM. 2005. Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. Endocrine 28: 325-332.
- Dubocovich ML, Delagrangé P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. Pharmacol Rev 62: 343-380.
- Torres-Farfán C, Richter HG, Rojas-García P, Vergara M, Forcelledo ML, Valladares LE, et al. 2003. mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. J Clin Endocrinol Metab 88: 450-458.
- Torres-Farfán C, Valenzuela FJ, Mondaca M, Valenzuela GJ, Krause B, Herrera EA, et al. 2008. Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland. J Physiol 586: 4017-4027.
- Richter HG, Torres-Farfán C, García-Sesnich J, Abarzúa-Catalán L, Henríquez MG, Álvarez-Felmer M, et al. 2008. Rhythmic expression of functional MT1 melatonin receptors in the rat adrenal gland. Endocrinology 149: 995-1003.
- Campino C, Valenzuela F, Arteaga E, Torres-Farfán C, Trucco C, Velasco A, et al. 2008. Melatonin reduces cortisol response to ACTH in humans. Rev Med Chile 136: 1390-1397.
- Campino C, Valenzuela FJ, Torres-Farfán C, Reynolds HE, Abarzúa-Catalán L, Arteaga E, et al. 2011. Melatonin exerts direct inhibitory actions on ACTH responses in the human adrenal gland. Horm Metab Res 43: 337-342.
- Valenzuela FJ, Torres-Farfán C, Richter HG, Méndez N, Campino C, Torrealba F, et al. 2008. Clock gene expression in adult primate suprachiasmatic nuclei and adrenal: is the adrenal a peripheral clock responsive to melatonin?. Endocrinology 149: 1454-1461.
- Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcaková V, Abraham D, Tian J, et al. 2006. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. Cell Metab 4: 163-173.
- Lemos DR, Downs JL, Urbanski HF. 2006. Twenty-four-hour rhythmic gene expression in the rhesus macaque adrenal gland. Mol Endocrinol 20: 1164-1176.
- Torres-Farfán C, Abarzúa-Catalán L, Valenzuela FJ, Méndez N, Richter HG, Valenzuela GJ, et al. 2009. Cryptochrome 2 expression level is critical for adrenocorticotropin stimulation of cortisol production in the capuchin monkey adrenal. Endocrinology 150: 2717-2722.
- Sewer MB, Waterman MR. 2001. Insights into the transcriptional regulation of steroidogenic enzymes and StAR. Rev Endocr Metab Disord 2: 269-274.
- Torres-Farfán C, Valenzuela FJ, Germain AM, Viale ML, Campino C, Torrealba F, et al. 2006. Maternal melatonin stimulates growth and prevents maturation of the capuchin monkey fetal adrenal gland. J Pineal Res 41: 58-66.
- Pedrerós M, Ratto M, Guerra M. 2011. Expression of functional melatonin MT(1) receptors in equine luteal cells: in vitro effects of melatonin on progesterone secretion. Reprod Fertil Dev 23: 417-423.
- Frungieri MB, Mayerhofer A, Zitta K, Pignataro OP, Calandra RS, González-Calvar SI. 2007. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. Endocrinology 146: 1541-1552.
- Hanyu R, Hayata T, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, et al. 2011. Per-1 is a specific clock gene regulated by parathyroid hormone (PTH) signaling in osteoblasts and is functional for the transcriptional events induced by PTH. J Cell Biochem 112: 433-438.
- Hinoi E, Ueshima T, Hojo H, Iemata M, Takarada T, Yoneda Y. 2006. Up-regulation of per mRNA expression by parathyroid hormone through a protein kinase A-CREB-dependent mechanism in chondrocytes. J Biol Chem 281: 23632-23642.
- He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hashimoto S, Hattori MA. 2007.

Artículo Original

- Gonadotropic regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. *Mol Cell Biochem* 302: 111-118.
22. Morioka N, Sugimoto T, Tokuhara M, Dohi T, Nakata Y. 2010. Noradrenaline induces clock gene *Per1* mRNA expression in C6 glioma cells through beta(2)-adrenergic receptor coupled with protein kinase A-cAMP response element binding protein (PKA-CREB) and Src-tyrosine kinase - glycogen synthase kinase-3beta (Src-GSK-3beta). *J Pharmacol Sci* 113: 234-245.
23. Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, et al. 2005. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2: 297-307.
24. Torres-Farfán C, Mendez N, Abarzúa-Catalán L, Vilches N, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M 2011. A circadian clock entrained by melatonin is ticking in the rat fetal adrenal. *Endocrinology* 152:1891-1900.
25. Imbesi M, Arslan AD, Yildiz S, Sharma R, Gavin D, Tun N, et al. 2009. The melatonin receptor MT1 is required for the differential regulatory actions of melatonin on neuronal 'clock' gene expression in striatal neurons in vitro. *J Pineal Res* 46: 87-94.