



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Inmunolocalización de Melatonina y Seguimiento
Histológico por la Administración Crónica de Melatonina
y M₃C en el Testículo de Rata”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RAÚL DENNIS MARTÍNEZ MELÉNDEZ

MÉXICO, D.F. ABRIL 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. OFELIA ESPEJO GONZÁLES

VOCAL: DRA. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

SECRETARIO: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

1er. SUPLENTE: DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA

2º. SUPLENTE: QFB. JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Neurofarmacología 1-E y Bioterio del edificio A, Facultad de Química. U.N.A.M.

Laboratorio de Inmunoterapia Experimental Departamento de Biología Celular y Tisular Edificio "A", 6º Piso, Facultad de Medicina U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA: DRA. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: BIOL. BEATRIZ HÉRNANDEZ TÉLLEZ

SUSTENTANTE: RAÚL DENNIS MARTÍNEZ MELÉNDEZ

INDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	4
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1.0 MELATONINA.....	7
1.1 Historia.....	7
1.2 Generalidades.....	8
1.3 Estructura y síntesis.....	9
1.4 Metabolismo.....	10
1.5 Mecanismo de acción.....	11
1.6 Farmacología.....	14
2.0 Eje Hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG).....	15
2.1 Túbulos seminíferos (TS).....	16
3.0 Antecedentes; influencia de MT en el Eje HHG.....	18
4.0 Envejecimiento y MT.....	20
5.0 Análogos de MT.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
OBJETIVOS.....	24
HIPÓTESIS.....	24
METODOLOGÍA.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

MT	Melatonina
GP	Glándula Pineal
SNC	Sistema Nervioso Central
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
NPV	Núcleo Paraventricular
aa	Aminoácido
Trp	Triptófano
TPH	Triptófano Hidroxilasa
6-BH4	6-tetrahidropterina
5-HT	5-hidroxitriptófano/Serotonina
AAD	Aminoácido Aromático Descarboxilasa
NAT	N-acetiltransferasa
AANAT	Arilalquinamina-N-acetiltransferasa
HIOMT	Hidroxindol-O-metiltransferasa
5-MTOL	5-metoxitriptofol
AFMK	N (1)-acetil-N (2)-formil-5-metoxicumarina
CYP	Citocromo
RN	Receptores Nucleares
RZR	Receptores Retinoides Z
ROR	Receptores Retinoides Huérfanos
SOD	Superóxido Dismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutación Peroxidasa
GSH-Rd	Glutación Reductasa
G6PD	Glúcosa-6-fosfato Deshidrogenasa
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
LH	Hormona Leuteinizante
FSH	Hormona Folículo Estimulante
TS	Túbulos Seminíferos
ERA	Epitelio de Replicación Activa

ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
AMPc	Monofosfato de Adenosín cíclico
GMPc	Monofosfato de Guanosín cíclico
SER	Retículo Endoplásmico Liso
Ca²⁺	Calcio Divalente
PKC	Proteína quinasa C
DHEA	Dehidroepiandrosterona
Ctrl	Control
Ctrl-V	Control-Vehículo

LISTADO DE FIGURAS

Figura No.

1. Estructura de la MT.
2. Diversos efectos de la MT en tejidos y sistemas.
3. Actividad de la GP para la secreción de la MT en el cerebro de rata.
4. Síntesis de la MT.
5. Mecanismos de acción de la MT.
6. Espermiogénesis.
7. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.
8. Efectos reportados de la MT en el eje HHG.
9. Niveles plasmáticos de la MT durante 24 h.
10. Concentraciones de la MT en suero durante el envejecimiento.
11. Estructura de los análogos N-sustituidos de MT.
12. Histología (HE) de la GP. Fotografías 40x.
13. Fotografías (40x) de cortes de la GP del grupo Ctrl-V: (a) GP al inicio de la administración; (b) GP con 25 días de administración.
14. Fotografías (40x) de cortes de la GP a los 30 días post administración. (a) Grupo Ctrl-V, (b) Grupo MT y (c) Grupo M₃C.
15. Histología (HE) del hígado. Fotografías 40x.
16. Fotografías de cortes de hígado correspondientes a los 10 días posteriores a la administración de MT. (a) 10x , (b) 20x y (c) 40x.
17. Histología (HE) del TS. Fotografías 40x.

- 18.** Fotografías (10x) de TS correspondientes a 30 días de administración: (a) Grupo Ctrl-V. (b) Grupo MT y (c) Grupo M₃C.
- 19.** Fotografías (40x) del TS de rata. (a) blanco (S / anticuerpo primario). (b) Inmunohistoquímica (c / anticuerpo). El color café marca el lugar donde se localiza la MT. (Martínez, D., 2013)
- 20.** Localización de la MT en el TS. (a) Túbulos correspondientes a 60 días de edad. (b) Túbulos correspondientes a 21 días de edad. Fotografías 10x y 40x.
- 21.** Inmonulocalización de MT en distintas etapas de experimentación en el TS. Fotografías 40x.

RESUMEN

La melatonina (MT) (N-acetyl-5-metoxitriptamina) es una hormona de origen lipofílico producida principalmente en la glándula pineal (GP) durante la escotofase. Esta hormona es un compuesto pleiotrópico en el cuerpo humano. La MT posee actividad en la regulación de ritmos biológicos, regulación neuroinmunológica, función reproductiva, actividades antioxidante, gastroprotectoras, antiinflamatorias y antidepresivas, así como sus propiedades antiproliferativas. En el humano, alrededor de los 60 años de edad la concentración de MT llega a ser 80% menor que en la etapa de pubertad. Esta disminución dependiente de la edad sigue en controversia, pero se atribuye a un signo de envejecimiento. Para contrarrestar este efecto, hoy, existe un uso terapéutico con MT exógena sin que se conozca la toxicidad y los efectos secundarios que pueda causar. Sin embargo, los estudios realizados previamente por el Dr. Debeliuk y Cols., (1969) mostraron que la administración de 300µg de MT durante 30 días, disminuye el peso de los testículos y afecta la producción de testosterona en ratas. Así mismo, en 2002 el Dr. Redins y Cols., muestran que la administración de 100µg de MT durante 22 días, produce un daño a nivel de ultraestructura en células de Leydig de ratones. Finalmente, en 2011, el Dr. Tuncer y cols., reportan una degeneración tubular, edema y obstrucción de túbulos seminíferos con la administración de 3mg/kg de MT durante un mes en ratas. Actualmente, se realizan estudios implicados en sustancias análogas a MT (análogos N-sustituidos) con el fin de modificar sus propiedades para mostrar un mejor efecto farmacológico. El análogo M₃C se ha experimentado en nuestro laboratorio con una buena respuesta ansiolítica y de relajación muscular en roedores. Buscamos evaluar en nuestro laboratorio, si MT y M₃C puedan causar algún daño en las células gonadales (células en el túbulo seminífero) y de causarlo, será igual, menor o mayor que el reportado en los artículos antes mencionados.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la estructura celular testicular del túbulo seminífero (TS) de rata como consecuencia de la administración en un periodo crónico, además, observar la inmunolocalización de la MT en dicha estructura.

Para este proyecto se emplearon 25 ratas macho (cepa Wistar) de 21 días de nacidas y divididas en 4 grupos: I.-Ctrl (n=1); II.-CtrlV (n=8); III.-MT (n=8); IV.-M₃C (n=8). La duración del experimento fue de 60 días. El grupo control (Ctrl) se dejó intacto a lo largo del experimento. Al grupo control-vehículo (Ctrl-V) se le administro, vía intraperitoneal, 0.5mL de vehículo (Tween 80 al 5%). A los grupos MT y M₃C se les administro, por la misma vía, 300µg en 0.5 mL de vehículo de sustancia respectiva, durante 30 días. Todos los grupos fueron administrados diariamente a las 10:00 horas, teniendo un ciclo de 12h luz/12h oscuridad a 25 °C de temperatura.

Se llevaron a cabo sacrificios los días de administración 1, 18, 21, 25, 30 y 10, 20 y 30 días post administración, mediante perfusión (SSI para lavado y formaldehído amortiguado como fijador). Por último, se extrajeron los testículos para su estudio histopatológico (tinción eosina-hematoxilina) e inmunolocalización de MT con anticuerpo específico anti-melatonina.

INTRODUCCIÓN

1.0 MELATONINA

1.1 Historia

La primera descripción acerca de la glándula pineal (GP) y su producto principal, la melatonina (MT) datan del siglo III a.C. donde Herófilo de Alejandría vinculó “El flujo del pensamiento” en el sistema ventricular. Posteriormente, Galeno describió la anatomía de la GP llamándola Konarium (cono de piña) en el siglo II d.C. Durante el Renacimiento, André Vesalio la describió de una manera singular en su obra “*Humani Corporis Fabrica*” (1543). Más tarde René Descartes la calificó como “el asiento del alma” o “tercer ojo” en su obra “*De Homine*” (1633) y la incluyó dentro del sistema nervioso asignándole la función de la percepción del entorno. En 1905, Studnicka mencionó la propiedad fotorreceptora. Heubner, supuso la existencia de una hormona antigonadotrópica de origen pineal que estaba involucrada en el comienzo de la pubertad, estableciendo la primera relación entre la GP y la reproducción en el siglo XX. Bergman (1943), dijo que la función endocrina de la GP se regulaba por la luz a través del SNC. En 1954, Kitay y Altschule en su publicación “*The Pineal Gland*” mencionan que la GP interviene en el control de la función gonadal, en la respuesta dérmica debido a los cambios de luz y afecciones en la conducta. Finalmente, en 1958, Lerner condujo una serie de experimentos que lo llevaron a la identificación de la MT, como un extracto pineal. Para 1965, se consolidó la GP como órgano neuroendocrino activo en mamíferos (Guerrero, et al., 2007). Hoy sabemos que se encarga de regular la actividad sexual y reproducción. Así mismo, existen estudios que demuestran que al ser extirpada se pierden los periodos anuales normales de fertilidad estacional provocando una desincronización reproductiva.

La actividad de la GP está controlada por la cantidad de luz que ingresa a través de los ojos cada día. Estas señales luminosas se dirigen hacia el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo y desde este, hacia la GP, para activar la secreción de la MT, el principal producto de esta.

1.2 Generalidades

La hormona MT (N-acetil-5-metoxitriptamina) se sintetizada principalmente dentro del SNC (GP, retina y cerebelo), en órganos y tejidos periféricos como son el tracto gastrointestinal, linfocitos humanos y la glándula harderiana en roedores. Ver Figura 1.

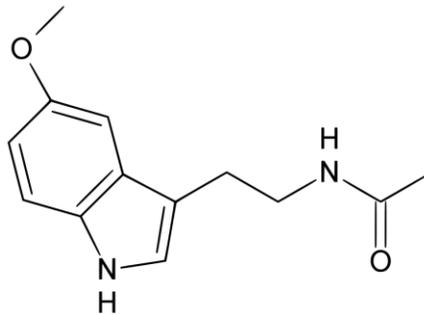


Figura 1 .Estructura de la MT

La MT es un compuesto pleiotrópico sobre el cuerpo humano. Los roles de la MT son numerosos, dentro de los cuales se encuentran la regulación del ritmo circadiano, del ciclo sueño-vigilia y la maduración sexual. Posee propiedades antioxidantes, oncostáticas e inmunomoduladoras. Actúa como neuromodulador, hormona y citoquina (Pandi-Perumal, et al., 2008). En la Figura 2 se mencionan algunos efectos de la MT en tejidos y sistemas. La síntesis y secreción de la MT, es estimulada hasta una concentración de 80-150pg/mL (pico máximo) entre la media noche y las 3 de la mañana (escotofase), mientras que la concentración durante el día (fotofase) está por debajo de 10-20pg/mL (Dziegiel, et al., 2008). Una vez sintetizada, es secretada hacia el torrente sanguíneo, fluido cerebro espinal y a otros fluidos como la bilis, saliva, semen, fluido folicular y fluido amniótico. (Guerrero, et al., 2007). Las concentraciones de MT, en suero, poseen un tiempo de vida media que se ha calculado dentro de un rango de 30-50min (Lane y Moss., 1985). Ver Figura 3.

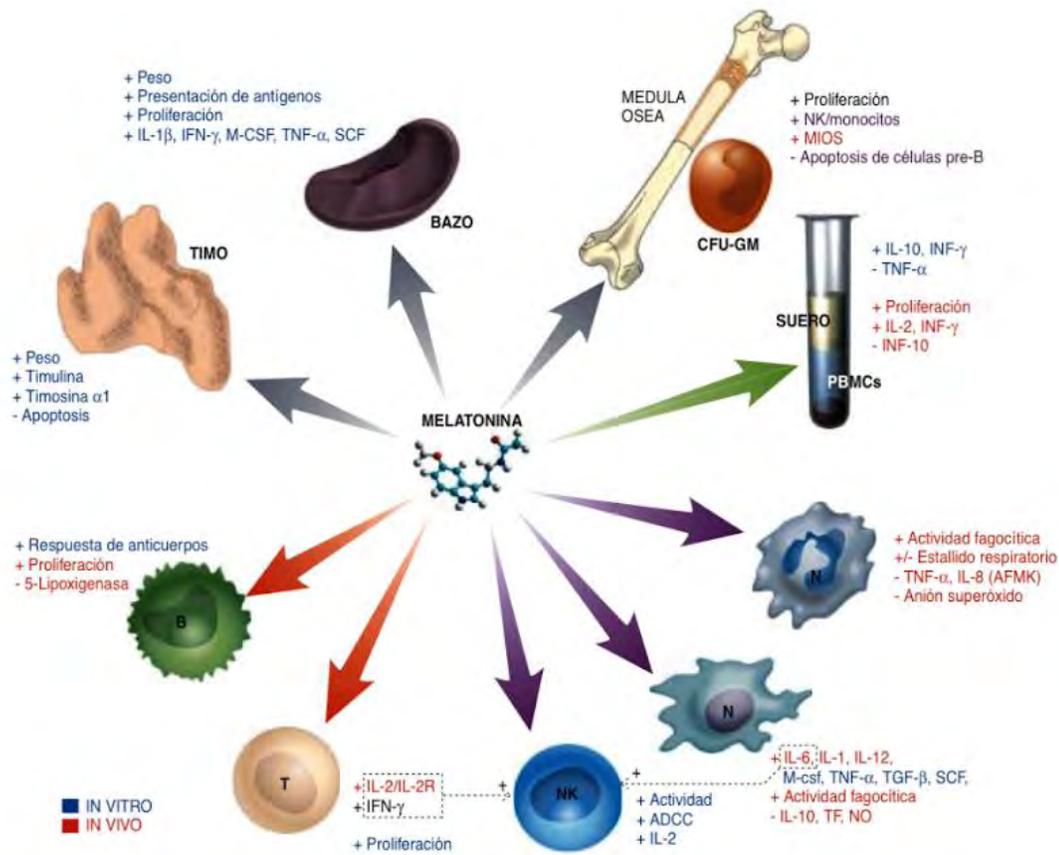


Figura 2. Diversos efectos de la MT en tejidos y sistemas (Guerrero, et al., 2007)

1.3 Estructura y síntesis de la MT

La MT es una indolamina que posee dos grupos funcionales que son fundamentales no solo para la unión con el receptor sino también, para dar a la molécula la capacidad de entrar a cualquier compartimento celular o fluido biológico. En suero, el 70% está unida a la albúmina y el restante se difunde entre los tejidos circundantes (Herdeland, et al., 2006).

La regulación de la síntesis de la MT es controlada por el ciclo luz/oscuridad, actuando a través de la activación neural del hipotálamo anterior mediante las células retinales ganglionares que van a los nervios ópticos y forman el tracto retino-hipotalámico. El núcleo supraquiasmático (NSC) que se conecta a la GP a través del núcleo paraventricular (NPV) y neuronas simpáticas pre-ganglionares (ver Figura 3). La formación de MT comienza con la captura del aminoácido (aa) Triptófano (Trp) proveniente del torrente sanguíneo. La hidroxilación del Trp a 5-

Hidroxitriptófano catalizada por la Triptófano hidroxilasa (TPH) mediante la 6-tetrahidropterina (6-BH4) que actúa como un co-factor esencial para la reacción.

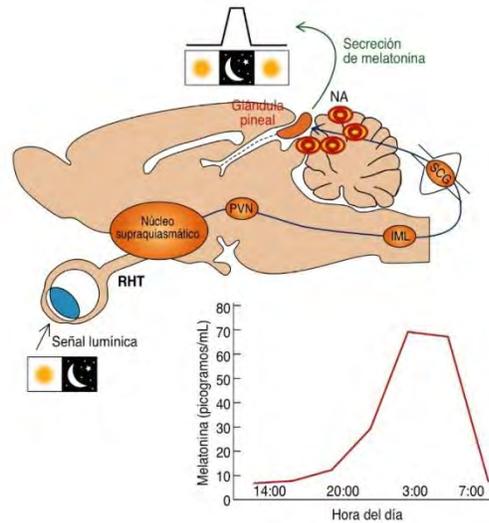


Figura 3. Actividad de la GP para la secreción de la MT en el cerebro de rata (Guerrero, et al., 2007).

Posteriormente, el 5-Hidroxitriptófano es convertido a serotonina (5-HT) por la aromática descarboxilasa (AAD). Luego la 5-HT es convertida a N-acetilserotonina (NAT) mediante la enzima arilalquinamina-N-acetiltransferasa (AANAT). El paso final de la síntesis es la conversión de la NAT a MT por acción de hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT). Ver Figura 4. La AANAT y la HIOMT son consideradas enzimas vitales para la síntesis de MT (Tamura, et al., 2009).

1.4 Metabolismo

Existen tres formas de degradación de la MT: uno, la hepática que genera 6-hydroximelatonina (Reiter, et al., 1991; Facciola, et al., 2001); dos, mediante la vía indólica alternativa que produce ácido acético y 5-metoxitriptofol (5-MTOL) (Rogawski, et al., 1979; Grace, et al., 1991), y tres por la vía quinúrica (Kynuric) que origina N1-acetil-N2-formil-5-metoxicumarina (AFMK) (Hirata, et al., 1974; Hardeland, et al., 1993; Slominski, et al., 2008). En el metabolismo hepático, las enzimas CYP P450, CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 metabolizan a la MT a 6-hydroximelatonina que se conjuga con un sulfato o con ac. glucorónico para su posterior secreción en la orina (Arent, et al., 1988).

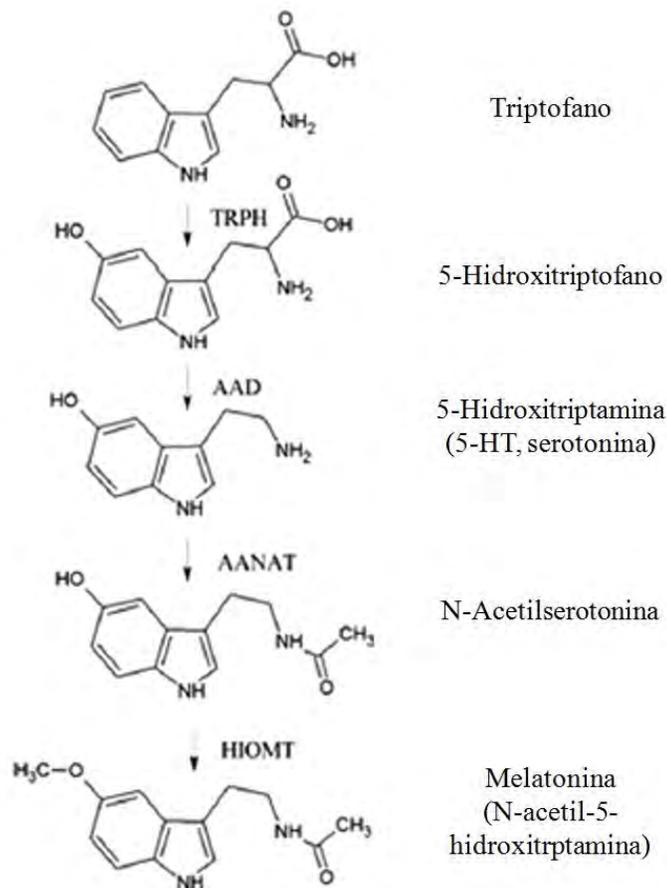


Figura 4. Síntesis de la MT (Radomir, et al., 2012)

1.5 Mecanismo de Acción

Muchas de las acciones de la MT son mediadas por receptores membranales específicos. Se han identificado dos tipos, MT1 (alta afinidad) y MT2 (baja afinidad). Ambos pertenecen a la familia acoplada a proteína G con 7 dominios transmembranales (Dobocovich, et al., 2003). La activación de Gi y Gp, (subtipos de proteína G acoplada) dependiendo del tipo de receptor, media señales intracelulares por modificación de actividad de la adenilatociclase, guanidilciclase, fosfolipasa C y A2, canales de potasio y calcio (Pandi-Perumal, et al., 2008). La existencia de un tercer receptor corresponde a una enzima citosólica llamada quinonareductasa 2 (Seithikurippu, et al., 2007).

El receptor MT1 posee 350 aa y acopla a Gi, específicamente Gi α 2, Gi α 3 y Gq/11. Se ha encontrado expresado en el cerebro, en el sistema cardiovascular (incluyendo aorta y corazón), sistema inmune, testículos, ovarios, piel, hígado, bazo, placenta, glándulas mamarias, retina, páncreas y riñones (Dubocovich y Markowska, 2005; Fischer, et al., 2008b; Pandi-Perumal, et al., 2008; Slominski, et al., 2005a, 2008). En el cerebro, se encuentra predominantemente en hipotálamo, cerebelo, hipocampo, sustancia negra y área ventral tegmental (Pandi-Perumal, et al., 2008).

El receptor MT2 posee 363 aa y muestra un 60% de homología con respecto a MT1 (Reppert, et al., 1996). También está asociado a proteína G y la activación de Gi. MT2 se ha localizado en el sistema inmune, cerebro (hipotálamo, SNC, retina, pituitaria, vesículas sanguíneas, testículos, riñones, tracto gastrointestinal, glándulas mamarias, tejido adiposo y piel (Dubocovich, et al., 2005; Reppert, et al., 1995; Roca, et al., 1996; Slominski, et al., 2005a).

El receptor “MT3” que actúa como quinona reductasa no ha sido encontrado en humanos, solo se ha identificado en hamsters (Nosjean, et al., 2001). Los niveles más altos se han encontrado en hígado, riñón, corazón, tejido adiposo y cerebro (Nosjean, et al., 2001).

Algunas otras acciones de la MT son originadas por sitios nucleares correspondientes a miembros “huérfanos” de la superfamilia RZR/ROR (receptores retinoides Z/ receptores retinoides huérfanos). Las subfamilias que enlazan con la MT incluyen a RZR α , ROR α , ROR α 2 y RZR β (Becker-Andre, et al., 1994). Los grupos de receptores nucleares (RN) se distribuyen de acuerdo a su subtipo. RZR β se ha encontrado en tejido neuronal y RZR α en tejido adiposo, en piel, testículos, cartílago e hígado (Smirnov, et al., 2001). Hasta hoy, los experimentos *in vivo* no han respondido la incógnita de si MT actúa como regulador fisiológico de las actividades del grupo de receptores RZR/ROR, y qué funciones fisiológicas son reguladas directamente por MT mediante estos receptores.

Una característica sobresaliente de MT es su capacidad de “scavenger”, depuradora o antioxidante. La lipofilicidad que presenta ésta, le permite atravesar las membranas celulares y penetrar a mitocondria y núcleo donde se han encontrado altas concentraciones de especies reactivas (Leon, et al., 2005; Martin et al., 2000). Además, la MT juega un importante papel en la activación de SOD, CAT, GPx, GSH-Rd y G6PD (Mayo, et al., 2002; Rodríguez, et al., 2004), y también en la prevención de la peroxidación de lípidos (Akbulut, et al., 2009; Carretero, et al., 2009), proteínas (Ganguly y Swarnakar, 2009) y daño al DNA (Tajes, et al., 2009; Allegra, et al., 2003). Ver Figura 5.

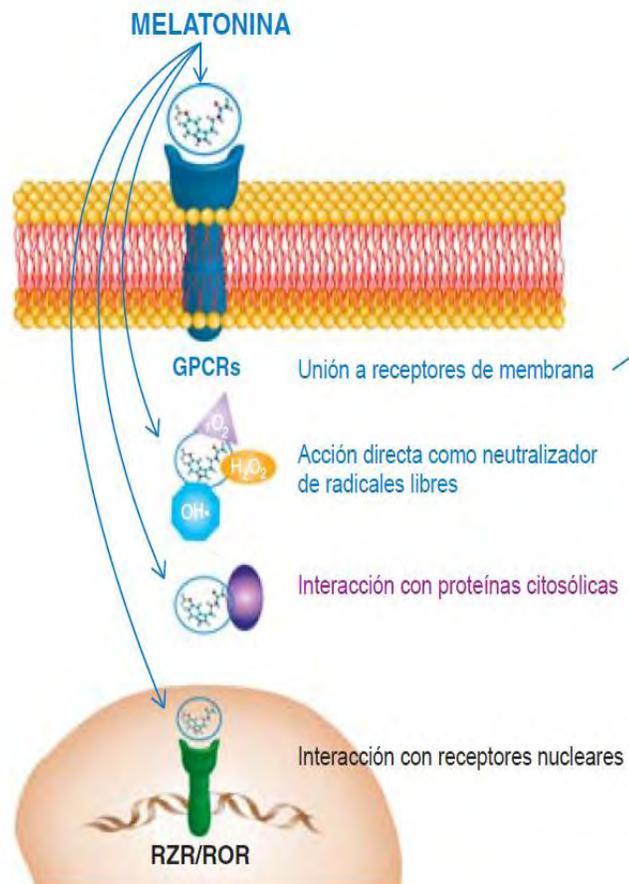


Figura 5. Mecanismos de acción de la MT (Guerrero, et al., 2007)

1.6 Farmacología

Farmacocinética: la MT se absorbe rápidamente luego de la administración oral, alcanza niveles picos de los 30min a las 2h; aunque el metabolismo de primer paso es significativo, existe una gran variabilidad inter individual con respecto a los niveles plasmáticos alcanzados. Con las tabletas de liberación sostenida (2mg), los niveles plasmáticos máximos se observan más tardíamente (después de 4h) y son menores que con las fórmulas convencionales. La vida media de eliminación después de una dosis oral es de 30 a 50min, de una dosis intravenosa en bolo oscila entre 1.4 a 3min. Con una infusión constante (4µg/h), la vida media de distribución es de 3min. El volumen de distribución es de 35L después de administración intravenosa. La MT se metaboliza en el hígado a 6-hydroxymelatonina y N-acetil serotonina, estos metabolitos son excretados como glucuronido y sulfato conjugados. La mayor parte (85%) de una administración exógena de la MT se excreta por orina como 6-hydroximelatonina sulfato. Otros metabolitos urinarios son los de 6- hydroximelatonina y N-acetil serotonina sulfato (Young, et al., 1985; Garfinkel, et al., 1995).

Efectos Adversos: puede producir: mareos, fatiga, cefalea, confusión, disminución de la temperatura corporal y disforia en pacientes depresivos. Se han observado las siguientes reacciones adversas:

- Cardiovasculares : Se ha reportado la producción de taquicardia (Claustrat, et al., 1992); aunque la relación causa-efecto es dudosa.
- SNC: - sedación, modorra y fatiga son efectos frecuentes (Dollins, et al., 1994; Dollins, et al., 1993; Petrie, et al., 1993; Tzischinsky y Lavie, 1994; Cavallo, et al., 1993; Claustrat, et al., 1992; Lissoni, et al., 1991; Petrie, et al., 1989; Nordlund y Lerner, 1977).
- Cefalea y confusión puede ocurrir ocasionalmente (Claustrat, et al., 1992; Petrie, et al., 1993; Dollins, et al., 1993; Dahlitz, et al., 1991). En pacientes con depresión mayor, ha producido disforia y pérdida del sueño (Carman, et al., 1976).

- Piel: se ha reportado prurito en uno de cada 12 pacientes geriátricos con insomnio (Garfinkel, et al., 1995). La imputabilidad a la sustancia es dudosa.
- Otros efectos adversos: Se ha observado reducción de la temperatura corporal (Dollinset, et al., 1993; Deacon, et al., 1994), y se considera parte de la capacidad de la hormona de facilitar la fase de cambio en el ritmo circadiano (Deacon, et al., 1994).

Se han reportado numerosos efectos adversos durante la terapia combinada de MT/interleucina 2 en el tratamiento del cáncer, incluyendo fiebre, vómitos y rash; aunque los efectos puede ser atribuidos a la interleucina 2 (Lissoni, et al., 1992; Lissoni, et al., 1995; Lissoni, et al., 1994). Interactúa con alimentos cuando se administra inmediatamente después de las comidas. Se han observado altos niveles plasmáticos de MT (4500 a 6500pg/mL) comparada con la administración en ayunas, aproximadamente 3000pg/mL (Aldhous, et al., 1985). Aunque existe mínima relevancia clínica debido a la alta variabilidad inter paciente (Aldhous, et al., 1985).

El estudio de niveles plasmáticos de la MT puede ser de utilidad en algunos pacientes, aunque existe gran variabilidad (0 a 250pg/mL; promedio, 90pg/mL). Niveles plasmáticos de la MT por encima de lo normal no se han establecido. La concentración urinaria de 6-hydroximelatonina sulfato se ha utilizado como marcador indirecto de los niveles plasmáticos. Su excreción es relativamente constante (jóvenes o pacientes geriátricos, 4 a 5mcg/h). Los niveles urinarios se ven reducidos en pacientes geriátricos con insomnio crónico (Garfinkel, et al., 1995).

2.0 Eje Hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG)

Compuesta por tres partes (ver Figura 7):

Hipotálamo: es la región cerebral encargada de la regularización de hormonas de la hipófisis y de la coordinación de conductas esenciales en un organismo. Recibe

señales externas e internas del SNC que codifica para generar hormonas específicas que darán respuesta al estímulo inicial. Una de las hormonas secretadas más importante es la hormona generadora de gonadotropinas (GnRH). Posee una vida media de 10min y su mecanismo de acción es mediante receptores membranales específicos (de características similares al acoplamiento de proteínas G) encontrados en la adenohipófisis y en las gónadas de rata y humano, entre otros sitios. La respuesta fisiológica de esta acción es la generación de gonadotropinas: LH y FSH (Sealfon, et al., 1997).

Hipófisis: llamada también glándula pituitaria se encuentra unida al hipotálamo mediante el tallo hipofisiario. Fisiológicamente, se divide en dos partes, la hipófisis anterior (adenohipófisis) y la posterior (neurohipófisis). Ambas partes son las encargadas de la secreción de hormonas responsables del control y supervivencia de la especie. Las gonadotropinas, son secretadas mediante la adenohipófisis y son las controladoras del crecimiento gonadal, así como de sus actividades reproductoras. La hormona folículo estimulante (FSH) será la encargada de estimular la espermatogénesis en las células de Sertoli y la hormona luteinizante (LH) controlara la síntesis de testosterona en las células de Leydig (Guyton y Hall, Tratado de fisiología humana, 12ª ed. 2011).

Gónadas: son los órganos reproductores de los mamíferos que originan células sexuales o gametos. En los hombres es el testículo. Los complementos a este, que le permiten llevar a cabo sus distintas funciones son: la arteria testicular, conducto deferente, conductos eferentes, epididímo (cuerpo y cola) y túbulos seminíferos (TS). Dentro del testículo, en los TS, donde se desarrolla la espermatogénesis se encuentran las células de Sertoli y de manera adyacente a los túbulos, entre túbulo y túbulo se encuentran las células de Leydig (Guyton y Hall, Tratado de fisiología humana, 12ª ed. 2011).

2.1 Túbulos seminíferos (TS)

En un macho adulto, cada túbulo posee una luz central revestida por un epitelio de replicación activa (epitelio seminífero, germinal ó ERA), mezclado con una población de células de sostén denominadas células de Sertoli. Estas células son

esenciales en la espermiogénesis (proceso de maduración de la espermatíde haploide a espermatozoide) al ser el único sostén del epitelio en el tubo seminífero, antes de salir a luz. Fagocita, también, los residuos de citoplasma sobrante de la espermatíde durante dicha fase (ver figura 6). Aunque el espermatozoide todavía es inmaduro, el paso por el epidídimo y el conducto deferente le dotaran de movilidad y terminara de madurar (Alan Stevens., Texto y Atlas de Histología.1993)

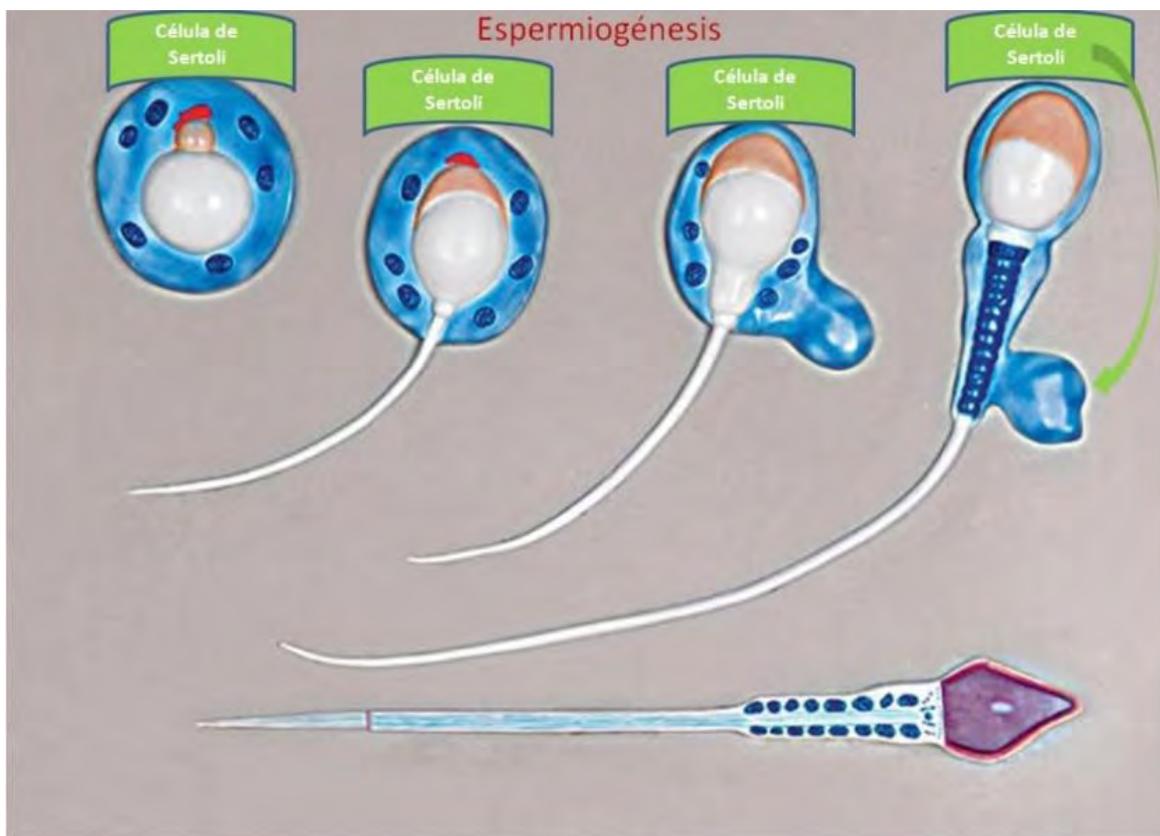


Figura 6. Espermiogénesis (modificada de [www. Noticiascientificas.info](http://www.Noticiascientificas.info))

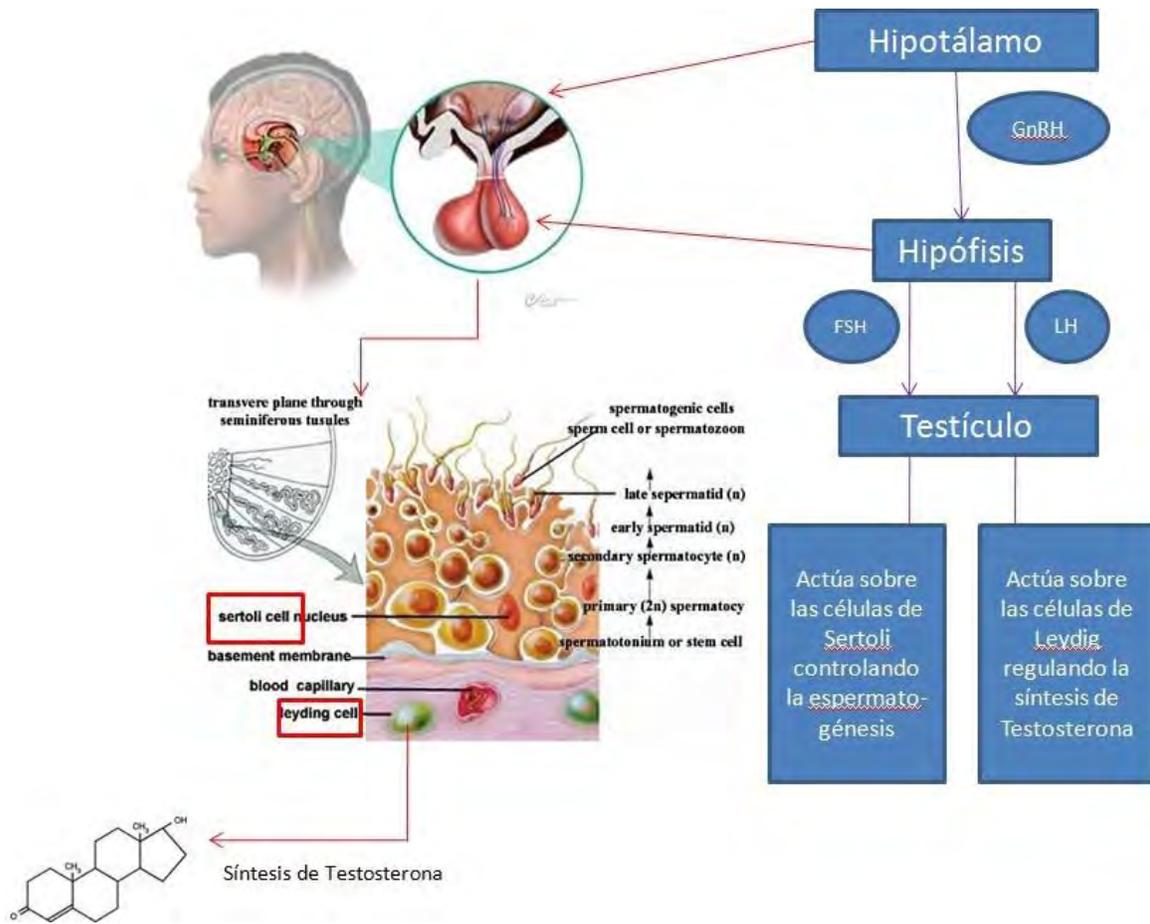


Figura 7. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. (modificada de www.uaz.edu.mx y fisiologíaalfaro.blogspot.mx)

3.0 Antecedentes; Influencia de MT en el Eje HHG

Se sabe que uno de los mecanismos por el cual la MT actúa sobre el eje reproductivo, es inhibiendo la liberación de la hormona generadora de gonadotropinas (GnRH) (Velázquez Paniagua, et al., 2001), disminuyendo la síntesis de LH y FSH (Tanja, et al., 2000) provocando así una disminución en la síntesis de testosterona, la espermatogénesis y la retroalimentación de esteroides sexuales sobre la glándula pituitaria. Se sabe que la MT no afecta directamente a neuronas GnRH pero sí, indirectamente por medio del sistema Kiss/GPR54 que es responsable del estímulo que genera la secreción de GnRH en el hámster siberiano, pero no se descarta la posibilidad de que suceda en otros mamíferos.

Sin embargo, la mayoría de estudios muestra que la MT posee un papel protector en zona gonadal, al mantener la viabilidad de los principales procesos (ovogénesis y espermatogénesis) debido a su capacidad depuradora de radicales libres. Así, se muestra que los efectos de la MT son específicamente dosis-dependiente.

La MT posee gran influencia sobre las gónadas masculinas al modular la esteroidogénesis, la producción de AMPc, del GMPc, la LH y la FSH (Frungieri, et al., 2005). Se han encontrado sitios de unión en células epiteliales del epidídimo de rata lo que nos lleva a pensar que la MT podría estar involucrada en la maduración, transporte y almacenamiento de espermias (Valenti, et al., 1999). Además, se han identificado receptores asociados a la MT en epidídimo (Redins, et al., 2002), próstata (Shiu, et al., 2000) y espermatozoides de humano (Tam, et al., 2008) en donde la MT pueda ejercer un efecto directo. Por ejemplo, *In vitro* se ha demostrado que la administración de 3mg durante 6 meses de MT exógena puede inducir hipomotilidad de los espermatozoides en humanos (Valenti, et al., 1999). Por el contrario, en algunos estudios se ha observado la actividad protectora de la MT en contra de los efectos de radiación ionizante sobre los testículos como el decremento de ROS y RNS (Boczek-Leszczyk, et al., 2007) y contra los efectos de torsión testicular disminuyendo la apoptosis de células germinales en los testículos, el daño mitocondrial y del retículo endoplásmico liso (SER) (Take, et al., 2009). Sin embargo, se sabe que las células de Leydig son uno de los principales blancos de acción de la MT (Itoh, et al., 1999). Se ha reportado que la MT exógena, administrada a 100µg durante 21 días, provoca un daño a nivel de ultraestructura del núcleo, la mitocondria y el SER (Redins, et al., 2002), lo que trae como consecuencia una deficiencia en los niveles de LH, AMPc, Ca^{2+} y proteínkinasa C (PKC) provocando una disminución de la producción de testosterona (Valenti, et al., 1999). Además de que en 2011, el Dr. Tuncer y Cols., reportan degeneración tubular, edema y obstrucción en TS, administrando diariamente 3mg/kg (aproximadamente 750µg/día) durante un mes.

Sabiendo que el receptor MT1 ha sido detectado en células de Leydig, epidídimo, próstata y espermatozoides, y MT2 en epidídimo y próstata (Velázquez Paniagua, et al., 2011), podríamos pensar que una acción adversa podría ser mediada por

medio de receptores y por el contrario, una acción protectora sería dada por acción depuradora. Ver Figura 8.

4.0 Envejecimiento y Melatonina

Los cambios que ocurren durante la menopausia y la andropausia no solo indican la reducción de la producción de las hormonas sexuales sino que también de las hormonas metabólicas, de crecimiento, adrenocorticoides, DHEA y testosterona, así como LH, leptina y prolactina, tiroxina y la MT. Alrededor de los 60 años de edad la concentración de MT llega a ser 80% menor que en la etapa de pubertad. Esta disminución dependiente de la edad sigue en controversia (Bubenik, et al., 2011). Ver Figura 9.

La causa de la disminución en la producción de MT en la edad adulta sigue siendo desconocido, pero se atribuye a un signo de envejecimiento. Basado en esto, la terapia de reemplazo con MT se ha puesto en práctica alrededor del mundo consiguiendo gran aceptación. Sin embargo, no existen estudios que avalen la seguridad de esta hormona como complemento alimenticio.

Algunos efectos de MT en el eje HHG



MT

- Disminución de peso de la adenoipófisis, testículos y vesículas seminales (Debeliuk, et al., 1969)
- Inhibe la secreción de testosterona (Turek, et al., 1976; Jarrige, et al., 1984; Persengiev, et al., 1991; Niedziela, et al., 1995; Valenti, et al., 1999; Yilmaz, et al., 2000)
- Inhibe la liberación de GnRH (Paniagua, et al., 2001)
- Ocasiona un daño ultraestructural en las células de Leydig (Redins, et al., 2001)
- Controla la secreción de testosterona (Valenti, et al., 2002)
- Inhibe la expresión del gen KISS-1 (responsable de generar kisspeptinas, proteínas reguladoras de las neuronas secretoras de GnRH)(Frungeri, et al., 2005)
- Reducción del número de espermatozoides en túbulos seminíferos (Gutierrez-Ruiz, et al., 2006)
- Inhibe la liberación de LH y FSH (Tanja, et al., 2000; Pandi-Perumal, et al., 2008)
- Inhibición de espermatogénesis, degeneración y necrosis tubular testicular (Endokrynol, et al., 2011)

Figura 8. Efectos reportados de la MT en el eje HHG.

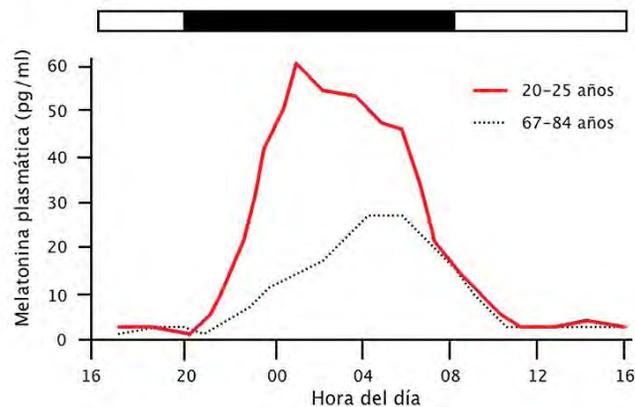


Figura 9. Niveles plasmáticos de la MT durante 24 h (Vitiello, et al., 1986)

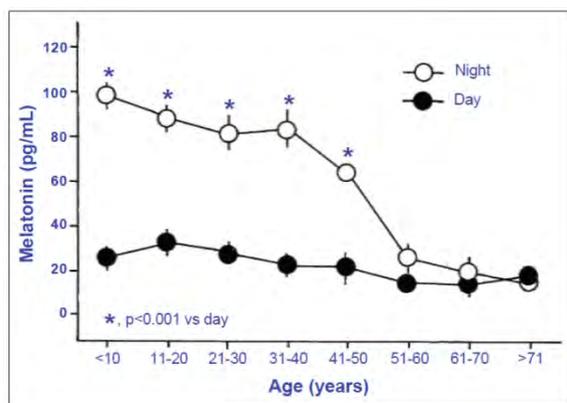


Figura 10. Concentraciones de la MT en suero durante el envejecimiento (Benot, et al., 1998)

5.0 Análogos de MT

La síntesis de análogos de MT, ha permitido un estudio más completo de los potenciales de esta hormona a nivel terapéutico debido a que los cambios estructurales en ellos afectan la unión de receptores así como sus propiedades físico-químicas: solubilidad, pka, etc. (Duvocobich, et al., 1988; Flint, et al., 1995; Mahle, et al., 1997 y Wang, et al., 2006). Estudios previos muestran que los análogos de la MT presentan diferentes propiedades como anticonvulsivas, ansiolíticas, ansiogénicas, sedantes y antidepresivos. Dichas propiedades son dosis dependientes, en donde se puede presentar efectos bifásicos.

La síntesis de análogos N-sustituidos (ver Figura 11) por parte del Dr. Lira Rocha y la Dra. Espejo nos pueden permitir mejorar la afinidad sobre el receptor a MT, mejorar su afinidad y por lo tanto su efecto farmacológico. Disminuyendo al mismo tiempo los efectos secundarios o no deseados por la ingesta de estas sustancias (Lira, et al., 2002).

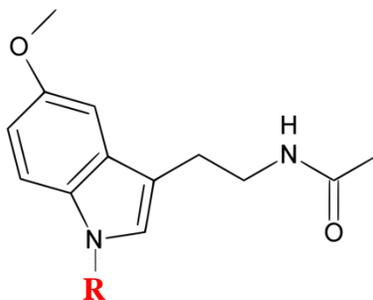


Figura 11 .Estructura de los análogos N-sustituidos de MT (Lira, et al., 2002)

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo corresponde a un nuevo protocolo de investigación en nuestro laboratorio. Hasta ahora, en el laboratorio, no se había buscado un efecto secundario (no deseado) con la administración de MT y análogos sobre la estructura celular de los principales órganos implicados en la reproducción y metabolismo. La literatura reporta que la MT exógena presenta efectos dosis-dependiente según la especie en experimentación, siendo la zona gonadal una de las evaluadas. La mayoría de los reportes dan como resultado una actividad protectora en zona gonadal de roedores a dosis de 10, 30 y 60 μ g, sin embargo, a dosis elevadas, 100, 300 y 750 μ g administradas crónicamente parece tener una actividad antigonadotrópica.

Los efectos secundarios sobre el uso de MT no están bien descritos. No se han realizados estudios exhaustivos referidos a una toxicidad evaluada, que demuestre que es seguro hacer uso de ella. Por lo que se hace patente la necesidad de sustancias que pueden brindar al individuo los beneficios de la MT, sin tener efectos no deseados, lo que ha llevado al laboratorio a sintetizar sustancias análogas a MT. Así, los resultados histológicos nos permitirán acercarnos un poco más a una toxicidad evaluada a MT y su análogo M₃C. Por otro lado, aunque se conoce el papel depurador en el testículo, no hay reportes que nos muestren la presencia física de ella. Este trabajo es el primero que pretende reportar la inmunolocalización de MT en el testículo.

OBJETIVOS

- Evaluar histológicamente los cortes de testículo después de la administración de 30 días consecutivos de MT exógena y análogo M₃C.
- Determinar la inmunolocalización de la MT en testículo.

HIPÓTESIS

- La administración de 300µg de MT y M₃C podrá ocasionar una alteración en las células pertenecientes a los túbulos seminíferos de rata.
- La MT podrá ser vista en todo el epitelio de replicación activa del túbulo seminífero.

METODOLOGÍA

Este trabajo se realizó en tres partes experimentales: I, II y III

Sujetos de Experimentación

25 ratas macho Wistar de 21 días de nacidas con un peso de 45 ± 5 g de peso (Laboratorios Harlan, S.A. de C.V.)

Sustancias

- Anestésico: Anestosal pentobarbital sódico 6.3g/100ml (Pfizer)
- Formaldehído amortiguado: 100 ml formaldehido 10%+ 900 ml de agua destilada+4.0g NaH₂PO₄.H₂O (J.T.Baker)+6.5g Na₂HPO₄ (J.T.Baker)
- Solución salina isotónica (SSI) 0.9% (SABBOTT)
- Tween 80 (MERCK)
- Melatonina: Melatonin (SIGMA)
- Análogo de Melatonina: M₃C (Laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química, UNAM)
- Xilol I y Xilol II (REPROQUIFIN)
- Alcohol Etílico (REPROQUIFIN)
- Buffer de Citratos (Biocare)
- Buffer de Fosfatos (PBS): NaCl 7g(J.T.Baker) , Na₃PO₄ 1.48g (J.T.Baker), Na₂PO₄ 0.43g (J.T.Baker) a pH 7.4 para 1 litro
- Peróxido de Hidrógeno (J.T.Baker)
- Albúmina (Equinotech)
- Tween 20 (SIGMA)
- Anticuerpo Anti-melatonina (BiorByt)
- Anticuerpo Secundario Anti-rabbit (MP Biomedicals)
- Complejo Estreptoavidina Peroxidasa (Kid universal: MP Biomedicals)
- Cromógeno Diamina Bencidina (Kid DAB ZYMED)
- Eosina y Hematoxilina (J.T.Baker)

Parte Experimental I. Organización de Animales

El total de ratas (25) se divide en cuatro grupos:

1. Control (Ctrl): 1 rata por este grupo.
2. Control vehículo (Ctrl-V; n=8): Administración diaria vía intraperitoneal de 0.5mL de Tween 80 al 5% durante 30 días.
3. Tratamiento con Melatonina (MT; n=8): Administración diaria vía intraperitoneal. Dosis de 300 µg/día, en un volumen de 0.5mL de vehículo.
4. Tratamiento con Análogo (M₃C; n=8): Administración diaria vía intraperitoneal. Dosis de 300µg/día, en un volumen de 0.5mL de vehículo.

Las administraciones se realizaron de 10:00 a 11:00 horas. Cada grupo se separó en 4 distintas cajas de acrílico previamente etiquetadas. Tuvieron comida y agua *ad libitum* con una ciclo de luz/oscuridad de 12h. Las ratas fueron pesadas al inicio y durante cada etapa de experimentación.

El experimento se dividió en 8 etapas:

Etapa 0 (sin administración)

Etapa 1 (día 1 al 18)

Etapa 2 (día 1 al 21)

Etapa 3 (día 1 al 25)

Etapa 4 (día 1 al 30)

Etapa 5 (10 días posteriores a la última administración)

Etapa 6 (20 días posteriores a la última administración)

Etapa 7 (30 días posteriores a la última administración)

Parte Experimental II. Perfusión y obtención de órganos

Al finalizar cada etapa, se eligió al azar a una rata de cada grupo. Se administró vía intraperitoneal una dosis de 40mg/Kg de pentobarbital sódico como anestésico. Se colocó a la rata en una tabla de disección y procedió a abrir la caja

torácica del animal exponiendo el corazón. Se introdujo en la aurícula el catéter con SSI e inmediatamente se cortó la aorta ventricular para el lavado. Al término, se introdujo el catéter con formaldehído amortiguado en el mismo orificio para la fijación de los órganos. Una vez terminada la fijación se disecciono y retiraron los testículos, el hígado y la GP. Se realizaron cortes significativos de cada órgano con ayuda de una hoja de corte ultradelgada para posteriormente ser colocados en tubos Eppendorf de 1.5mL con formaldehído amortiguado, previamente etiquetados. Las secciones de órganos se incluyeron en parafina, posteriormente se hicieron cortes de 4 micras con un microtomo y fueron colocados en portaobjetos para el estudio histológico e inmunohistoquímico.

Parte Experimental III. Histología e Inmunohistoquímica

Histología

Se lleva a cabo el método cotidiano para Hematoxilina-Eosina (HE)

Inmunohistoquímica

Para el desparafinado de las laminillas se incubaron en la estufa a 60°C durante 30min. Posteriormente se pasaron por las soluciones para desparafinar (xilol I y xilol II durante 5min; alcohol absoluto durante 3min; graduaciones de alcohol etílico 90%, 80%, 70% durante 1min y agua destilada)

Las laminillas con las muestras se colocaron en vasos Coplin que contenían buffer de citratos. Se introdujeron en el autoclave a una temperatura de 120°C durante 5min. Al término, se lavan con agua destilada del lado donde se encuentra el tejido y son colocadas en cámaras húmedas. Se hicieron 3 lavados de 3min con Buffer de Fosfatos PBS.

Se agregaron 300µl de Peróxido de Hidrógeno al 10% y 700µl de PBS durante 10min. para inhibir la acción de la peroxidasa endógena. Se lava una vez con PBS y se deja con el mismo durante 3min.

Para el bloque de uniones específicas, se le aplica PBS albúmina con Tween 20 al 0.1% durante 10min.

Se lava con PBS y se le coloca el primer anticuerpo (anti-melatonina) con una dilución de 1:500. Se deja incubar de 18 a 24 h a 4°C.

Al término, se deja 10min. a temperatura ambiente. Se realiza un lavado directo de PBS y posteriormente se realizan 3 lavados de 3min. con PBS. Se da un lavado con PBS albúmina durante 10min.

Se aplica el anticuerpo secundario (anti-rabbit) y se incuba a 37°C durante 30min. Al término, se hacen los lavados correspondientes con PBS.

Se aplica el Complejo de Estreptoavidina Peroxidasa y se deja incubar durante media hora. Después se le hacen los lavados con PBS.

Las muestras se revelan con cromógeno (Diamina Bencidina, DAB), durante 3min. Se lava con agua destilada para detener la reacción.

Se realizó una contratinción con hematoxilina durante 1min. y lavando con agua destilada. Se deja secar la laminilla en la campana durante 5min. Se coloca Xilol para deshidratar durante 5min.

Se montan las muestras mediante el pase de las laminillas en recipientes que contienen concentraciones graduales ascendentes (alcoholes al 70%, 80%, 90%, absoluto 1 y absoluto 2). Se pasa por Xilol I y Xilol II. Por último, se fijan las muestras con un cubre objetos y se sella con resina. Se deja secar en campana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Histología (HE)

Los resultados presentados en este trabajo forman parte de una nueva metodología de investigación en nuestro laboratorio, aunque son preliminares, le dan una nueva perspectiva a nuestros experimentos. Este nuevo protocolo nos va a permitir analizar las dosis de la MT empleadas en los modelos de depresión, ansiedad, anticonvulsivo, sedante hipnótico, relajante muscular, gastroprotector y antidiarreico, además, de poder asegurar que la dosis, el período de administración y las sustancias empleadas son seguras a nivel histológico. La dosis empleada (300µg/ día) en esta tesis corresponde a la reportada por Debeljuk y Cols. en 1969 y la correspondiente a M₃C, fue tomada del modelo de ansiedad perteneciente a nuestro laboratorio. Este análogo forma parte un conjunto sintetizados por el Dr. Lira Rocha y la Dra. Espejo (Facultad de Química, UNAM. 2002), con los cuales se busca tener un efecto terapéutico eficaz, incluso mayor al de la MT, asegurando también la no toxicidad a corto, mediano o largo plazo en la evaluación histopatológica que se emplea en este protocolo. M₃C ha dado una excelente respuesta ansiolítica y de relajación muscular en nuestro grupo de trabajo.

A continuación, se presentan los resultados en donde se observan fotografías de cada tejido correspondientes a los grupos de experimentación: Ctrl-V, MT y M₃C. Se muestran los días más representativos: inicio del experimento (sin administración), a los 25 y 30 días de administración, (días donde se ha reportado daño por Redins, y Cols., 2002, y Tuncer, y Cols., 2011). Finalmente, a 10 días posteriores a la última administración. Los tejidos presentados están relacionados estrechamente con la MT, por ello, no solo se estudiaron los testículos sino también la GP que es una de las productoras principales de la MT (en el SNC) y el hígado que es el órgano que metaboliza a la misma.

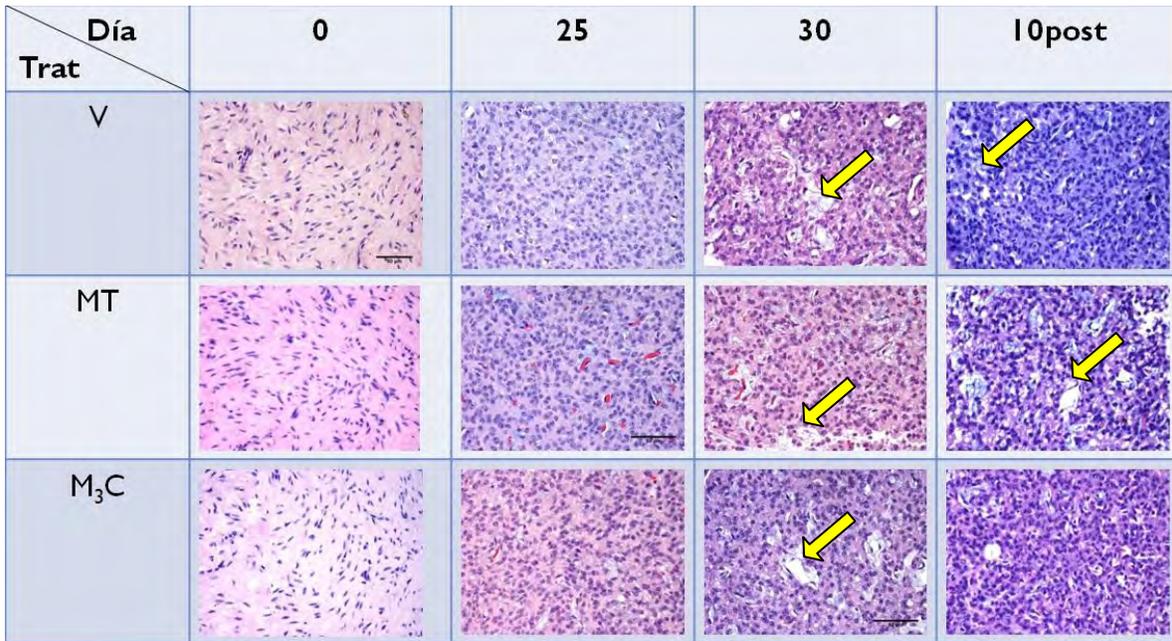


Figura 12. Histología (HE) de la GP. Fotografías 40x (Martínez, D., 2013).

En la **Figura 12**, observamos cortes de la GP a lo largo del período de experimentación. Al inicio del experimento, se muestra un tejido compacto en donde las células (pinealocitos) no han alcanzado su madurez y su forma activa, como se muestra en la **Figura 13(a)**. A los 25 días de experimentación se alcanzan a distinguir los pinealocitos activos (forma ovalada), como se observa en la **Figura 13(b)** (flecha roja) y a los astrocitos de forma alargada y densa (flecha verde). A los 30 días de tratamiento (correspondientes a 60 días de edad de las ratas) aparecen espacios fibrilares ó redes fibrilares (**Figura 14**, flecha amarilla) entre los cúmulos de pinealocitos y astrocitos, dichos espacios son síntoma de envejecimiento por parte de la GP (Redins, et al., 2000). Posteriormente, a los 10 días post administración, la tendencia de envejecimiento normal continua. El envejecimiento de la GP se hace más evidente a los 30 días post administración (81 días de edad de las ratas) y los espacios fibrilares son cada vez más grandes (**Figura 14, a, b y c**), lo que trae como consecuencia una disminución en la cantidad y actividad de pinealocitos (Redins, et al., 2000).

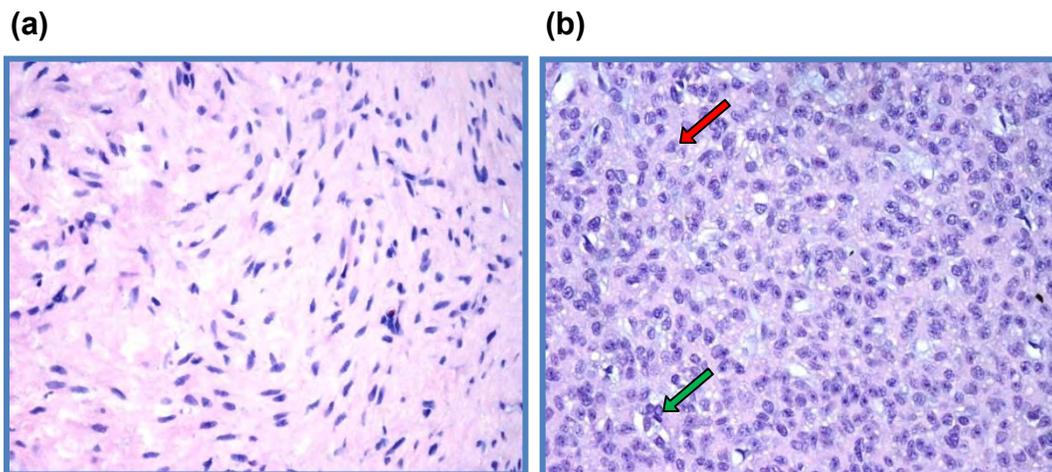


Figura 13. Fotografías (40x) de cortes de la GP del grupo Ctrl-V: (a) GP al inicio de la administración; (b) GP con 25 días de administración (Martínez, D., 2013).

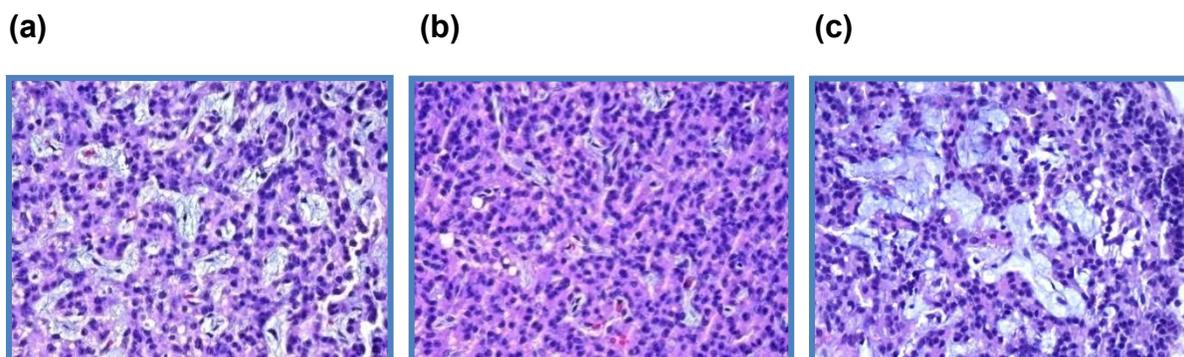


Figura 14. Fotografías (40x) de cortes de la GP a los 30 días post administración: (a) Grupo Ctrl-V, (b) Grupo MT y (c) Grupo M₃C (Martínez, D., 2013)

En la **Figura 15**, se muestran cortes del hígado a lo largo de la experimentación con MT y M3C. En general, no se observa un daño hepático que se pueda considerar tóxico, ya que la estructura de los hepatocitos y sinusoides se conserva alrededor de la vena centrolobular (flecha azul), excepto, en la fotografía correspondiente a los 10 días posteriores al tratamiento con MT (contorno amarillo), donde las placas de hepatocitos no siguen la estructura normal. Se

observa, una desorganización alrededor de la vena y la formación de espacios citoplasmáticos (**Figura 16**, flecha verde), lo cual, podríamos considerar como daño hepático.

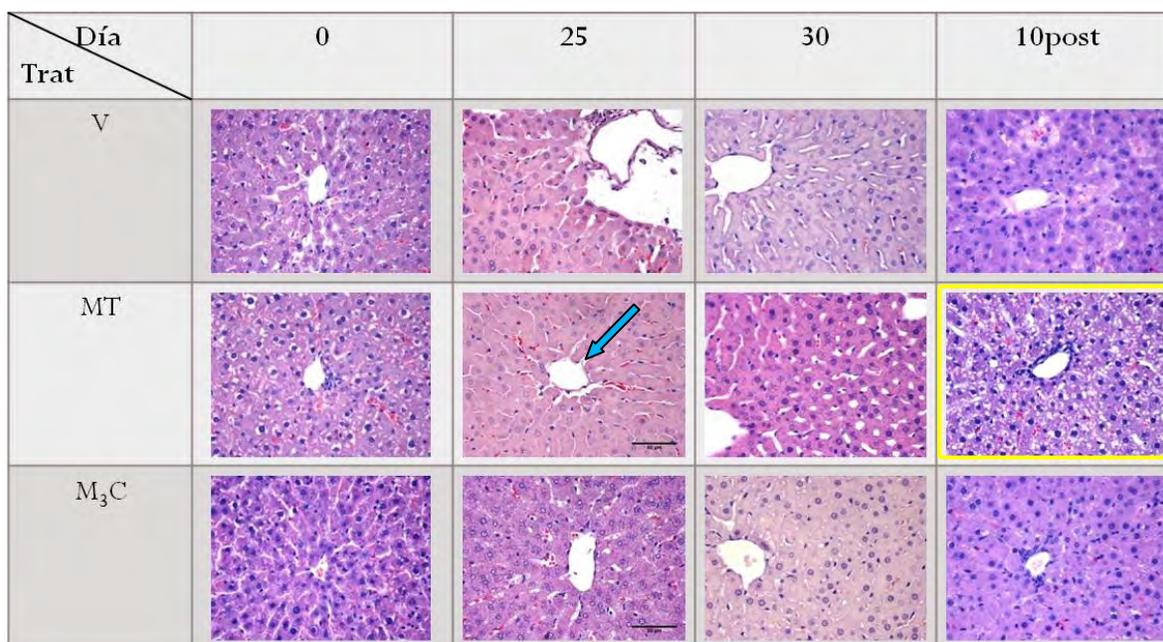


Figura 15. Histología (HE) del hígado. Fotografías 40x (Martínez, D., 2013)

Como podemos observar, solo una rata de las 25 tratadas, presentó el hígado con las características mencionadas anteriormente. Esto nos lleva a pensar en varias situaciones, la rata pudo haber presentado este daño desde el nacimiento; o bien, pudo ser sensible a la administración del vehículo (Tween 80 al 5%), a la MT (300µg/día) o a ambos, simplemente por variabilidad biológica. Para comprobar cualquiera de nuestras teorías, en un futuro experimento, se podrían utilizar un número mayor de ratas, en el cual, por cada etapa se sacrificaría por lo menos 6 (n=6), y no una como en este trabajo. Así, se podría comprobar la existencia de un posible daño hepático causado por cualquiera de las sustancias administradas.

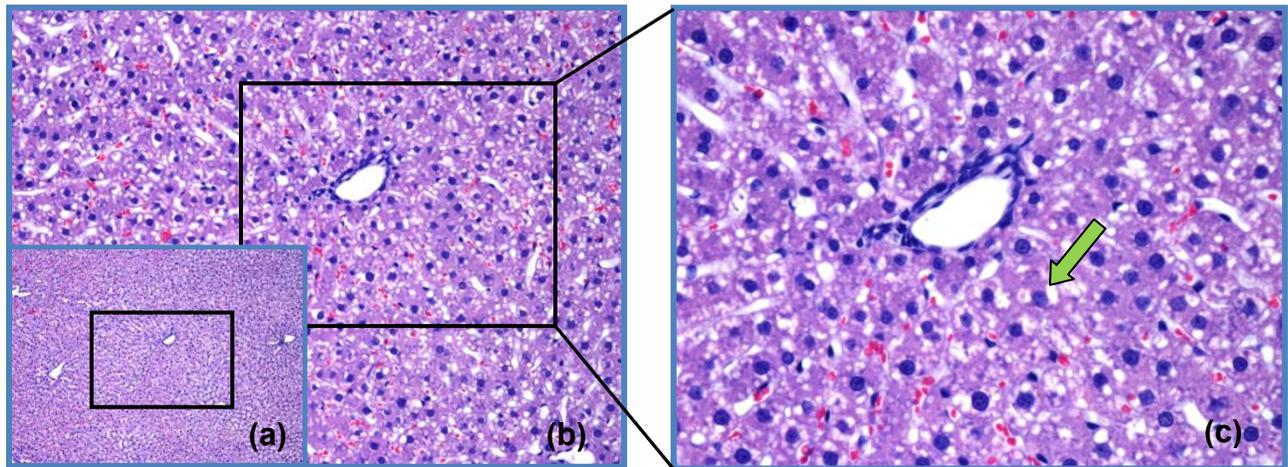


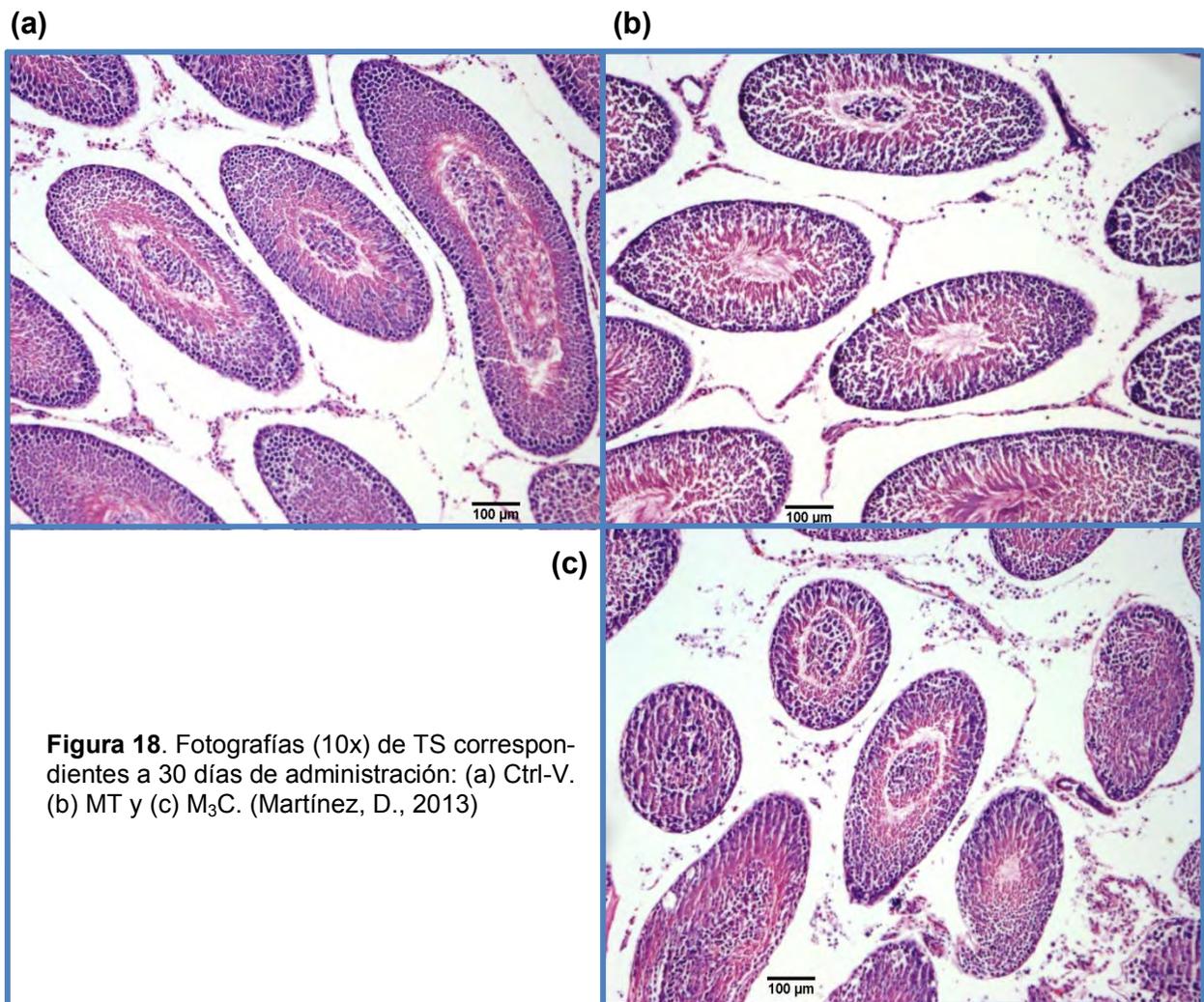
Figura 16. Fotografías de cortes de hígado correspondientes a los 10 días posteriores a la administración de MT. (a) 10x, (b) 20x y (c) 40x (Martínez, D., 2013).

Día / Trat	0	25	30	10post
V				
MT				
M ₃ C				

Figura 17. Histología (HE) de un TS. Fotografías 40x (Martínez, D., 2013)

En la **Figura 17**, observamos fotografías a un TS correspondientes a los distintos tratamientos, tiempos de experimentación y post administración. El espacio entre

túbulo y túbulo, se muestra separado debido a que para la obtención de la muestra se tuvo que romper la cápsula testicular. Sin embargo, el contenido medular quedó intacto. En la primera columna, se muestra un TS con poca actividad espermatogénica correspondiente a ratas de 21 días de edad. En la segunda columna, correspondiente a 25 días de administración (46 días de edad), se muestra una espermatogénesis activa en los tratamientos.



A los 30 días de administración, los túbulos del grupo MT y M₃C presentan divisiones en el epitelio de replicación activa (ERA) que recubre la luz del TS. Las fotografías 10x nos muestran un campo más amplio de estos resultados (**Figura 18**). En donde el grupo Ctrl-V presenta gran actividad espermatogénica dentro de

los túbulos (**Figura 18(a)**). No así, los grupos MT y M₃C en donde es evidente la fractura del espacio epitelial y se observa la pérdida de algunos estadios del desarrollo de espermias (**Figura 18(b) y 17(c)**). Sin embargo, conociendo que el perfundido del tejido fue el mismo para los tres casos y que no ocasionó un daño adicional, pareciera que la administración de MT y M₃C producen efectos similares. Por lo tanto, como antes se mencionó, para aseverar este afecto no deseado se debe tener al menos 6 ratas en esta etapa para poder comparar así los resultados. De permanecer el mismo resultado, podríamos mencionar entonces un daño causado por MT y M₃C. Estos resultados preliminares no podemos tomarlos como definitivos, pero sí, nos permite poner atención en esta etapa, en la dosificación y en complementar con más sujetos de experimentación. Con la revisión bibliográfica realizada, encontramos solo dos trabajos que reportan daños en la estructura celular del testículo. El Dr. Redins y Cols.* que empleó 100µg de MT diarios durante 22 días, reportó un daño en células de Leydig a nivel de ultraestructura y el Dr. Tuncer y Cols.** quienes reportaron obstrucción y edema en TS administrando una dosis de 3mg/kg (750µg/día) de MT durante 30 días. Sin embargo, ninguno de los dos autores ha tenido un seguimiento de sus trabajos reportados.

*Redins, C.A., Redins, G.M., Novaes, J.C., 2002. The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. *Brazilian Journal Biology* 62(3). 517-523.

**Tuncer I, Sunar F, Toy H, Baltaci AK, Mogulkoc R. Histological effects of zinc and melatonin on rat testes. *J. Citation Report*. (2011), 112(8).425-427.

Inmunolocalización de MT en el testículo

La mayoría de los reportes mencionan a la MT como principal antioxidante de radicales libres en la zona del ERA, y poder, así, salvaguardar el proceso de espermatogénesis y espermiogénesis gracias a su propiedad depuradora o “*scavenger*”. (Meena, et al., 2013;). Sin embargo, no existen reportes de artículos en los cuales se muestre la inmunolocalización de MT en el TS.

En este estudio por primera vez se reporta la inmunolocalización de MT en el testículo, como se muestra en la **Figura 19**, donde se compara el TS sin anticuerpo (**Figura 19 (a)**) y con anticuerpo (**Figura 19 (b)**), en donde, la MT se identifica mediante el color café (entre más denso sea el color más cantidad de MT es identificada en el tejido).

Los resultados obtenidos muestran la MT concentrada en las espermátides, alrededor de la luz del túbulo, justo en el estadio final de la espermiogénesis. También, se observa en menor intensidad a lo largo de todo el ERA en ratas maduras (**Figura 19 (b)**).

Por otro lado, en ratas jóvenes de 21 días de nacidas, la presencia de MT se extiende en todo el epitelio que rodea la luz del túbulo. Las espermatogonías aún en espera de sufrir mitosis y los primeros espermátocitos se encuentran rodeados de una alta concentración de MT (**Figura 20 (b)**). Como se puede observar, ésta recubre las células germinales y los primeros estadios del desarrollo del esperma.

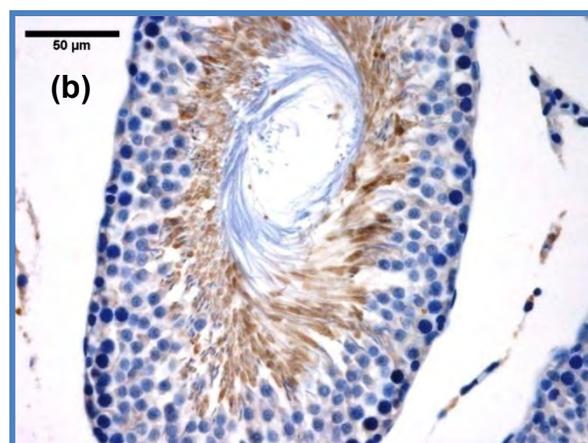
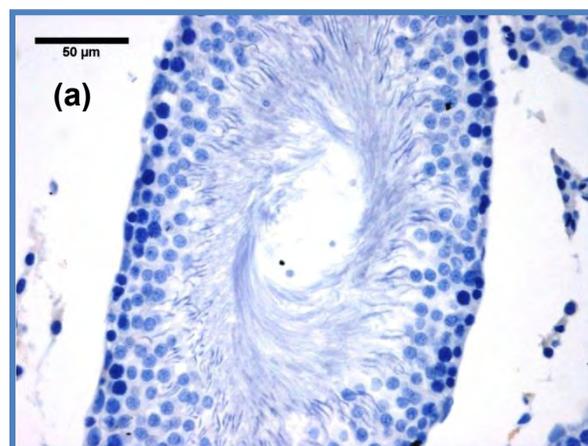


Figura 19. Fotografías (40x) del TS de rata. (a) blanco (S / anticuerpo primario). (b) Inmunohistoquímica (c / anticuerpo). El color café marca el lugar donde se localiza la MT. (Martínez, D., 2013)

Por el contrario, en ratas adultas, se observa que la presencia de la MT es más alta, concentrándose principalmente en las espermátides (**Figura 20 (a)**).

A lo largo de las etapas de experimentación se incluyeron muestras para la inmunolocalización en los distintos tratamientos (**Figura 21**). El Ctrl-V, muestra la cantidad basal de MT en el tejido y aunque se esperaba que a lo largo del proceso la MT aumentara su presencia en el túbulo, no fue así. La diferencia de la presencia de MT parece no ser significativa en los grupos a lo largo del tratamiento.

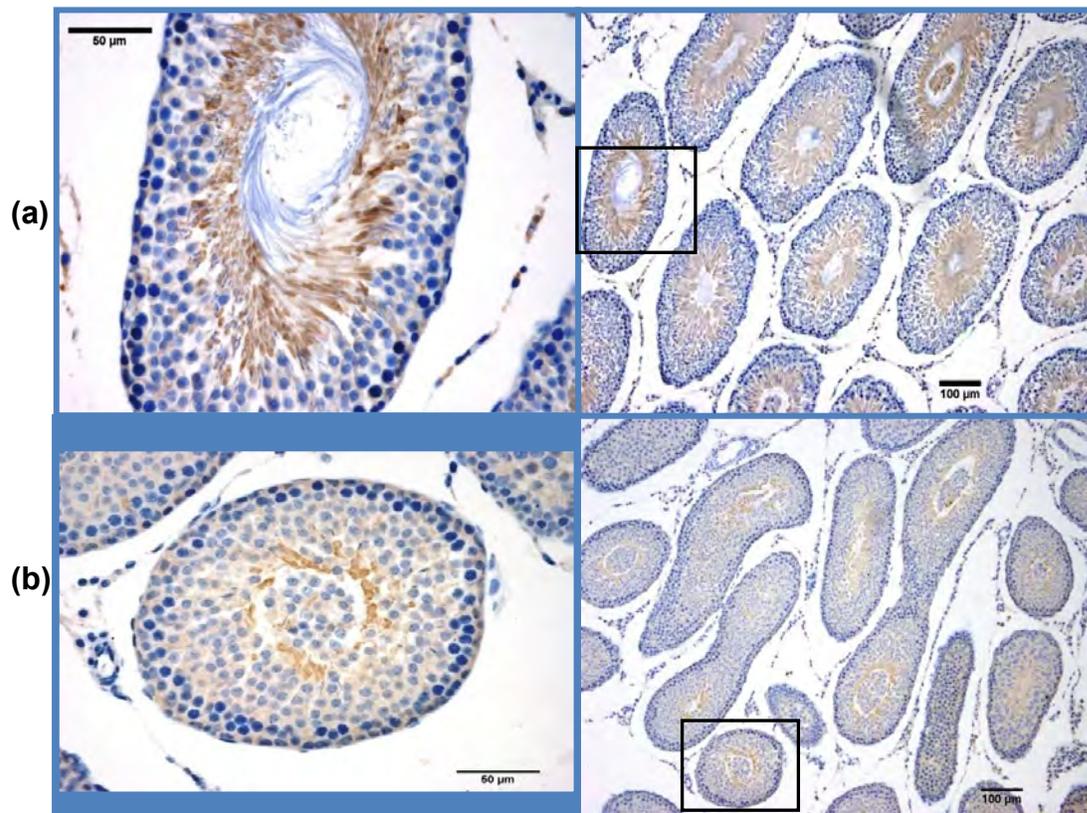


Figura 20. Localización de la MT en el TS. (a) Túbulos correspondientes a 60 días de edad. (b) Túbulos correspondientes a 21 días de edad. Fotografías 10x y 40x. (Martínez, D., 2013)

No se puede concluir que el anticuerpo anti-melatonina pudo reconocer el análogo M_3C , ya que el fabricante no especifica donde se une el anticuerpo en la

estructura de MT, es decir, si reconoce la molécula completa o solo una parte (**Figura 21**).

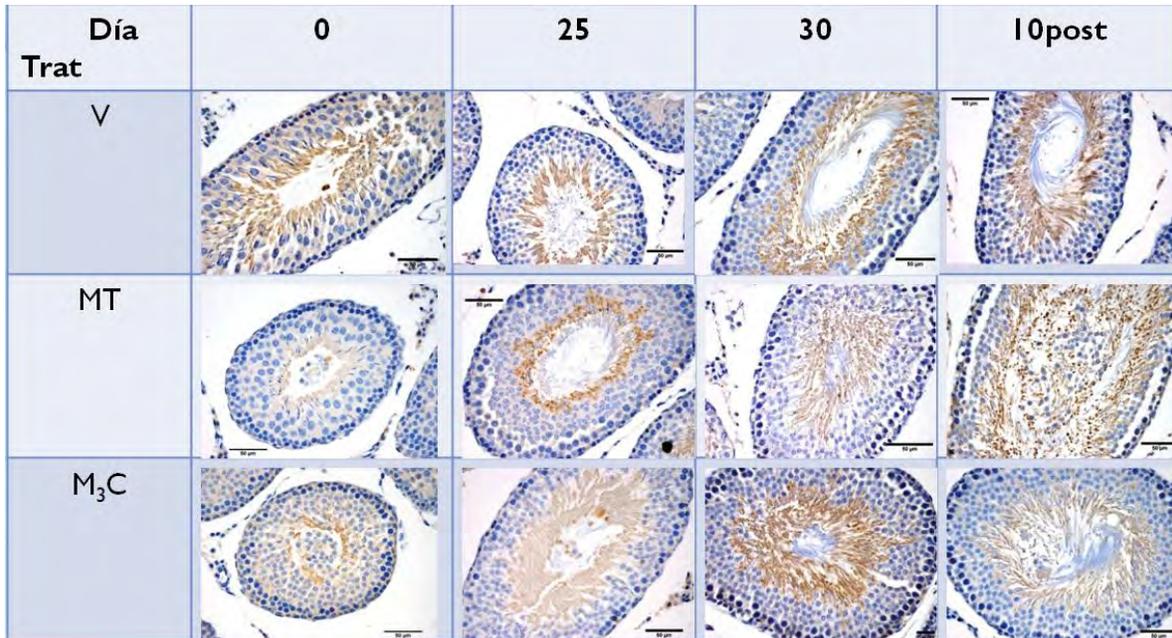


Figura 21. Inmunolocalización de MT en distintas etapas de experimentación en el TS. Fotografías 40x. (Martínez, 2013).

Este trabajo muestra por primera vez la localización de la MT en el TS, lugar donde se sabe que posee una acción antioxidante, depuradora o de “*scavenger*” eficaz. La alta presencia de MT en el ERA de los TS (en ratas de 21 días de edad), nos lleva a pensar que la hormona salvaguarda las condiciones de desarrollo de las células germinales a lo largo del proceso de maduración de espermatogonias a espermátides (**Figura 20(a)**). En ratas de 61 días de edad (**Figura 20(b)**), observamos una mayor presencia de MT en las espermátides, lo que parece indicar la presencia de la hormona en la célula de Sertoli, encargada de fagocitar los restos de citoplasma y dar orientación a la espermátide en la espermiogénesis (Ross, Pawlina. Histología, texto y atlas a color con Biología Molecular.2012).

CONCLUSIONES

- La histología de los TS, a lo largo de la administración de 300 μ g de MT y M₃C durante 30 días, muestra un deterioro visible en el ERA, donde se observa la falta de estadíos de maduración de espermatogonias a las espermátides.
- La MT se encuentra en todo el ERA del TS. En edad temprana (21 días de edad), se distribuye uniformemente a lo largo de dicho epitelio. En edad madura (61 días), se concentra en la etapa final de la espermiogénesis, específicamente en las espermátides que rodean el lumen del túbulo.
- Éste es el primer trabajo donde se reporta la distribución de la MT en el TS del testículo de rata.

BIBLIOGRAFÍA

Akbulut, K.G., Gonul B., Akbulut H., 2009. The role of melatonin on gastric mucosal cell proliferation and telomerase activity in ageing. *J. Pineal Res.* 47:308-312.

Stevens, Alan., Lowe, James., 1993. *Texto y atlas de histología*. 1era. ed. Ed. Mosby/Doyma Libros. Madrid, España. Pp 176-183, 255, 305-312 y 314.

Allegra, M., 2003. The Chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res.* 34:1-10.

Arendt, J., 1988. Melatonin. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 29, 205–229.

Becker-Andre, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Missbach, M., Saurat, J.H., Carlberg, C., 1994. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 269:28531–28534.

Boczek-Leszczyk, E., Juszczak, M., 2007. The influence of melatonin on human reproduction *Pol Merkur Lekarski*. 134. 128-130.

Carpentieri, G., Díaz de Barboza, V., Areco, M., Peralta López, N., Tolosa de Talamoni., 2012. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research* 65: 437-444.

Carretero, M., Escames, G., López, L., Venegas, C., Dayoub, J., García, L., Acuña Castroviejo, D. 2009. Long-term melatonin administration protects brain mitochondrial from aging. *J. Pineal Res.* 47:192-200.

Cavallo A. 1993. The pineal gland in human beings: relevance to pediatrics. *J Pediatr.* 123:843-851.

Claustrat B, Brun J, David M. 1992. Melatonin and jet lag: confirmatory result using a simplified protocol. *Biol Psychiatry*. 32:705-711.

Debeljuk L, Federico VM, Paulucci OA. 1969. Effect of treatment with melatonin on the pituitary-testicular axis of male rat. *J. Reprod. Fert.* 21, 363-364.

Dollins AB, Lurch HJ, Wurtman RJ. 1993. Effect of pharmacological daytime doses of melatonin on human mood and performance. *Psychopharmacology.* 112:490-496.

Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ. 1994. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:1824-1828.

Dubocovich, M.L., Markowska, M., 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27, 101–110.

Dubocovich, M.L., Rivera-Bermudez, M.A., Gerdin, M.J., Masana, M.I., 2003. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front. Biosci.* 8, d1093–d1108.

Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Zabel M. 2008. Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. *Med Sci Monit.* 14:RA64–70.

Facciola, G., Hidestrand, M., von Bahr, C., Tybring, G., 2001. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56, 881–888.

Fischer, T.W., Slominski, A., Zmijewski, M.A., Reiter, R.J., Paus, R., 2008b. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp. Dermatol.* 17, 713–730.

Frungieri, M.B., Mayerhofer, A., Zitta, K., Pignataro, O. P., 2005. 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

Ganguly, K., Swarnakar, S., 2009. Induction of matrix metalloproteinase-9 and -3 in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute gastric ulcers in mice: regulation by melatonin. *J. Pineal Res.* 47.43-55.

Garfinkel D, Laudon M, Nof D. 1995. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *Lancet.* 346:541-544.

Guyton y Hall. 2011. *Tratado de fisiología médica.* 12ª ed. Ed. Elsevier. Barcelona, España. Capítulo 80: Funciones hormonales y reproductoras del varón (925-938).

Grace, M.S., Cahill, G.M., Besharse, J.C., 1991. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res.* 559, 56–63.

Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. 2006. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:313–6.

Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T., Seno, S., 1974. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 249, 1311–1313.

Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X., 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 347–357.

Itoh, M.T., et al. 1999. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod* 5. 402–408.

Lane EA, Moss HB. Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *J Clin. Endocrinol. Metab* 1985;61:1214–6.

Leon, J., Acuña, D. Escames, G., Dun-Xian, T., Reiter, R. 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 38.1-9.

Lira, A., Espejo, O., Naranjo, E., 2002. Receptor-binding studies of 1-N-substituted melatonin analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 37: 945-951.

Martin, M., et al. 2000. Melatonin but not Vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB Journal* 14.1677-1679.

Mayo, J.C., et al. 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59.1706-1713.

Meena, R., Kumari, K., Kumar, J., Rajamani, P., Verma, HN., Kesari, KK., 2013. Therapeutic approaches of melatonin in microwave radiations-induced oxidative stress-mediated toxicity on male fertility pattern of Wistar rats. *Electromagn Biol Med.* Doi: 10.3109/15368378.2013.781035

Nordlund JJ & Lerner AB. 1977. The effect of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 45:768-774.

Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol.* 61, 1369–1379.

Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J., Zisapel, N., Cardinali, D.P., 2008. Physiological effects of melatonin: role of

melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85, 335–353.

Petrie K, Conaglen JV, Thompson L. 1989 Effect of melatonin on jet lag after longhaul flights. *Br Med J* 1989; 298:705-707. 34.

Redins, C.A., Redins, G.M., Novaes, J.C., 2002. The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. *Brazilian J. Biol.* 62(3). 517-523

Regestein QR & Pavlova M. 1995. Treatment of delayed sleep phase syndrome. *Gen Hosp. Psychiatry.* 17:335-345.

Reiter, R., 1991a. Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *Physiol.* 6, 223–227.

Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8734–8738.

Roca, A.L., Godson, C., Weaver, D.R., Reppert, S.M., 1996. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinol.* 137, 3469–3477.

Rodríguez, C., et al. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role of melatonin. *J. Pineal Res.* 36.1-9.

Rogawski, M.A., Roth, R.H., Aghajanian, G.K., 1979. Melatonin: deacetylation to 5-methoxytryptamine by liver but not brain aryl acylamidase. *J. Neurochem.* 32, 1219–1226.

Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP. 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotrophin-releasing hormone receptor. *Endocrinol. Rev.*18: 180-205.

Seithikurippu, R., Pandi-Perumal, Trakht, I., Srinivasan, V. 2007. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85, 335-353.

Shiu, S.Y., et al. 2000. Biological Basis and Possible Physiological Implications of Melatonin Receptor- Mediated Signaling in the Rat Epididymis. *Biol Signals Recept.* 9.172-87

Smirnov, A.N., 2001. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Moscow)* 66, 19–26.

Slominski, A., Fischer, T.W., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., Semak, I., Zbytek, B., Slominski, R.M., Tobin, D.J., 2005a. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 27, 137–148.

Slominski, A., Tobin, D.J., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., Paus, R., 2008. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol. Metab.* 19,17–24.

Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L. 2009. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertility and Sterility.* 1, 92. 328-343.

Tajes, Orduna., et al. 2009. An evaluation of the neuroprotective effects of melatonin in an in vitro experimental model of age-induced by potassium cyanide in vivo and in vitro. *Toxicol.* 179. 29-36.

Take, G., et al. 2009. Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *J. Med. Biol. Res.* 42. 621-628.

Tam, C.W., et al., 2008. Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. *J. Pineal Res.* 45. 403-412.

Tanja, G., Aurich, J.E., 2000. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim Reprod Sci.* 58. 197-213.

Tzischinsky O & Lavie P. 1994. Melatonin possesses time-dependent hypnotic effects. *Sleep.* 17:638-645.

Velázquez Paniagua, M. 2001. Modulación de la excitabilidad del hipotálamo anterior por la administración de melatonina en rata. Facultad de Ciencias-UNAM. (tesis de maestría).

Velazquez Paniagua, M., Gutiérrez-Ruiz, J., Prieto-Gómez, B., 2011. Fertilidad Masculina Modulada por Melatonina. Facultad de Medicina, UNAM. 24-33.