



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES: CUAUTITLAN.

**"EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE GLOBULOS BLANCOS Y
ORGANOS LINFOIDEOS DE LA RATA"**

T E S I S

**Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTAN:

**MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ.
MONICA MENDEZ DIAZ.**

**Director Interno: MVZ Angel G. Martínez Sosa.
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.**

**Directores Externos: Dr. Cruz Reyes Vázquez,
Facultad de medicina,
Dra. Elia Naranjo Rodríguez,
Facultad de Química.**

Cuatitlan Izcalli, Estado de México., 1994.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

36
foje



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



"EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE
GLOBULOS BLANCOS Y ORGANOS
LINFOIDEOS DE LA RATA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ

MONICA MENDEZ DIAZ

DIRECTOR INTERNO: MVZ. ANGEL G. MARTINEZ SOSA

DIRECTORES EXTERNOS: DR. CRUZ REYES VAZQUEZ

DRA. ELIA NARANJO RODRIGUEZ



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADEMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F. E. S. - C.

Con base en el art. 23 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Efecto de la Melatonina sobre Glóbulos Blancos y Órganos
Linfoideos de la rata".

que presenta la pasante: Mónica Méndez Díaz
con número de cuenta: 8857308-3 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
Maribel Lucila Herrera Ruiz

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 25 de Agosto de 1964

PRESIDENTE R. Icalio Avila Miyazawa
SOCAL M. G. Luisa Martínez Aguilar
SECRETARIO MVZ Angel G. Martínez Sosa
PRIMER SUPLENTE MBP Antonio Sánchez Ortega
SEGUNDO SUPLENTE Dr. Francisco López Mejía



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADEMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Efecto de la Melatonina sobre Glóbulos Blancos y órganos
Linfoideos de la rata".

que presenta la pasante: Maribel Lucila Herrera Ruiz
con número de cuenta: 8528919-B para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
Mónica Méndez Díaz

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E :
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. a 25 de Agosto de 1994

PRESIDENTE CPH Idalia Ayala Mirazaya

LOCAL M. en C. Luisa Martínez Guzmán

SECRETARIO MVE Angel G. Martínez Sosa

PRIMER SUPLENTE CP Antonio Sánchez Ortega

SEGUNDO SUPLENTE Dr. Francisco López Peña

Cuando existen tantos agradecimientos
respeto y cariño, sobran demasiadas palabras
y decir tan sólo gracias, es poco.

Dedico este mi "gran" esfuerzo
al Dr. Cruz Reyes Vásquez
por cultivar en mi ese interes
por el conocimiento,
por despertar mis ansias de ser más,
por mil consejos, ideas y apoyo,
por todo lo su nombre representa
mil Gracias.

Un agradecimiento muy especial
con todo mi respeto y admiración
para alguien que ha sido algo más
que un guía y apoyo académico.
Gracias a la Dra. Elia B. Naranjo
Por su incondicionable ayuda y
por su valiosa Amistad.

A Víctor:

Por tantos sueños e ilusiones hechos realidad,
por su apoyo justo,
por su compañía incondicional,
por su Amor inmenso,
por todo eso, por lo que falta y mas
Gracias y no sobra decirlo otra vez
Te Amo.

A la propia encarnación del Amor:
a quienes incondicionalmente
me permiten vivir a su lado.

Gracias a esos pequeños gigantes que

tanto adoro.

Gracias por la energía y los desvelos
gracias Aline y Víctor

A la persona más importante de mi existencia.
Con todo el cariño que mi pequeño corazón es capaz de albergar
dedico mi trabajo, así como él me ha dedicado su vida
A Federico Méndez R.
Gracias papá por tu confianza, apoyo y amor que siempre
me has brindado. Te Quiero.

A quien con vida me dio la vida.
Martha Diaz S.
Gracias mamá por todo el apoyo y confianza
que siempre depositaste en mí.
Hoy que no sólo mis sueños se hicieron realidad
una vez más las Gracias te doy. Te Quiero.

No por tenerlos menos cerca los olvido
también ustedes han forjado a mi lado un mundo
de sueños e ilusiones, gracias por compartirlos conmigo.
Gracias por que sin ustedes no hubiera sido igual.
Los Quiero Griselda, Pablo y Karen.

Especialmente un agradecimiento a quienes de una forma u otra dejaron un trozo de sí mismos en este trabajo.

A mis sinodales:

Angel G. Martinez S.

Idalia Avila M.

Ma. Luisa Martinez

Francisco López M.

Antonio Sanchez.

Muchas Gracias Monica.

Agradesco infinitamente a quien en su nombre la palabra Amistad se fortalece. Gracias por tu ayuda incondicional Silvia.

Una vez más gracias a mi compañera y amiga Maribel. Por llevar a termino con todo el esfuerzo necesario nuestro trabajo. Gracias por todo.

Agradesco de todo corazón a quien sin su ayuda las cosas jamás hubieran sido igual: María Fernández. Gracias por su grandiosa e incondicional ayuda y por todo lo demás.

Mónica.

A Dios gracias por haberme dado los mejores regalos:

la vida y mi familia.

Amelia-José Ma.

Gracias, por enseñarme a respetarlos y amarlos, por ser mi guía y un modelo de amor, por compartir su tiempo conmigo, por su confianza y por dejarme ser lo que soy. Y sobre todo por ser para mí lo más grande. Permitanme ofrecerles este trabajo como una pequeña muestra de mi infinito amor.

Erika, Ara y Pepe.

Para mis tres grandes tesoros, mi eterno agradecimiento por estar siempre conmigo, por quererme y dejar quererlos, y por hacerme creer que sin ustedes mi vida hubiera sido aburrida.

Con cariño:

Para alguien que a pesar de su ausencia, siempre ha estado presente en mí.

Lupita Herrera.

Dr. Cruz.

Por ser mi maestro, mi guía y sobre todo mi amigo,
por escucharme y compartir nuestro trabajo y
hacerlo suyo.

Dra. Ella

Gracias por contagiarme de su entusiasmo, darme
siempre su amistad y apoyo.

A los dos, por ser como
son mi infinito agradecimiento y
mi gran cariño.

Mónica.

Por tu amistad y por compartir tu trabajo y tu
tiempo conmigo, muchas gracias.

Victor y Miguel.

Por ser los mejores amigos y demostrarme su
valiosa amistad en todo momento.

Por el recuerdo de los momentos compartidos, en cada etapa de mi vida:

Reyna I, Sonia A

Concepción, Lupita Z, Rosa

Lupita A, Lupita C, Tere, Lolita, Araceli V, Ena Laura, Araceli G.

Alicia, Laura, Mario, Vicky, Jorge, Lety, Blancarte,

Rafael, Toño

Gracias por el tiempo prestado a mis sinodales y en especial a Angel Martínez, mi asesor.

Gracias por todo a mi Universidad, sobre todo a la Facultad de Estudios Superiores -Cuautitlán.

CONTENIDO

Capítulo	Hoja
I. Prólogo.....	3
II. Introducción.....	5
<i>i) Aspectos Históricos.....</i>	5
<i>ii) Aspectos Anatómo-Fisiológicos.....</i>	6
<i>iii) Síntesis de Melatonina</i>	7
<i>iv) Aspectos Inmunológicos.....</i>	11
III. Planteamiento del Problema	13
IV. Hipótesis.....	14
V. Objetivos.....	15
VI. Material y Métodos	16
VII. Resultados.....	28
VIII. Discusión y Conclusiones	45
IX. Referencias	56

1). PROLOGO

La Glándula Pineal (GP) de los vertebrados, es una estructura cerebral que desempeña un papel esencial en el control de los ritmos biológicos, suministrando al organismo información fotoperiódica al liberar únicamente durante la noche su principal neurohormona la Melatonina (MEL). Las acciones de esta sustancia coadyuvan a los organismos a adaptarse a su entorno, ya que realizan un ajuste conductual de los ritmos circadianos y estacionales (5,14).

Algunos autores describieron los importantes efectos que la MEL produce sobre el sistema nervioso central (sedación, antiansiedad e hipnosis) (2,5) y los efectos sobre el sistema endócrino (por ejemplo, su acción antigonaadotrópica) (10,48,54,55). Sin embargo, sus efectos sobre el sistema inmune han sido postulados sólo recientemente. La secreción de esta hormona ocurre de acuerdo a un patrón fotoperiódico con una acrofase similar a la que muestran algunos componentes inmunes de la sangre, sugiriéndose con ello un posible papel regulador de esta hormona sobre algunos parámetros inmunológicos (1).

En base a éstos antecedentes, en el presente trabajo se analizó la relación funcional que existe entre la GP, las células blancas y los tejidos linfoides de la rata. Para ello diseñamos un modelo experimental en el cual se determinó el número y tipo de leucocitos, la concentración de hemoglobina, el hematocrito y el índice organosómico (peso del órgano/peso corporal) de hígado, bazo y timo. Se

utilizaron grupos de animales controles y experimentales, los cuales recibieron durante 15 días la administración diaria de MEL en una dosis que va de 2.5, 5.0 ó 10.0mg/kg de peso. Finalmente los mismos parámetros inmunológicos se analizaron en un grupo de ratas pinealectomizadas.

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de dosis farmacológicas de MEL, así como la reducción de la MEL endógena consecuencia de la pinealectomía, provoca cambios significativos en la distribución y concentración de los elementos inmunológicos de la sangre, así como cambios importantes en el peso de los órganos linfoides. Tales resultados sugieren una acción inmunomoduladora de la Glándula Pineal.

II). INTRODUCCION

1) Aspectos Históricos.

La GP o Epifisis cerebri ha sido objeto de múltiples estudios desde la antigüedad hasta nuestros días, los cuales la han relacionado con una gran variedad de funciones. Así, para los Hindúes, la GP constituía el órgano de la clarividencia, la meditación y la tranquilidad; mientras que para los griegos, constituía un órgano regulador del "fluido vital "; el cual formaba parte del origen de los pensamientos. En 1664 el filósofo francés R. Descartes la definió como "el lugar donde se asienta el alma"(52).

A pesar de este interés, los avances más importantes en el estudio de la GP ocurrieron hasta el siglo XX. Así; McCord y Allen (1917) describieron que los extractos de pineal de bovinos ejercen un efecto aclarador de la piel de anfibios, de esta acción derivó el nombre de MEL, implementado por Lerner y Case (1957), quienes más tarde determinaron su estructura química (14).

En 1960 después de una revisión exhaustiva de la literatura sobre el tópico, Kappers concluye que la GP es un órgano neuroendócrino sensitivo. Este mismo autor describe la inervación que el ganglio simpático cervical superior establece con la GP en animales superiores, y la señala como el único puente de información entre glándula y el sistema nervioso central (11).

Posteriormente en 1961, Doodt y Heerd fueron los primeros en mostrar la relación entre la actividad funcional de la GP y la cantidad de luz del medio ambiente.

Un año más tarde Wurtman mostró que la GP secreta toda una familia de hormonas que incluía indoles y péptidos (5).

A la luz del microscopio electrónico, Studnika menciona que la GP requiere de tres células importantes para su función y señala que una de ellas es muy semejante a la de los fotorreceptores de los ojos laterales de los reptiles. Estudios más recientes, de autores como Romijn (54), Maestroni (36,37), Pierpaoli (446,47), Reiter (50,51) y otros (55); implican a la MEL en actividades funcionales de muchos órganos y sistemas, tanto endócrinos como neuroinmunes, sin embargo el mecanismo de acción de ésta hormona aún no está bien definido.

ii) Aspectos Anatómo-fisiológicos

La GP está presente en todos los vertebrados incluyendo al hombre, y desempeña un papel importante en el control de ritmos biológicos. En los anfibios y reptiles esta glándula recibe información fótica en forma directa, mientras que en los mamíferos la reciben en forma indirecta a través de un circuito neuronal. En especies filogenéticamente inferiores, la GP está constituida de varias estructuras: órgano parapineal en lámpreas y peces, el órgano frontal de anfibios y un órgano parietal en reptiles (6). Este conjunto de estructuras que incluye a la GP y órganos supernumerarios, constituye el Complejo Pineal (28,45,51).

En el hombre se localiza una glándula única, por encima de la porción superior del diencéfalo, en la porción terminal posterior del tercer ventrículo por debajo del

extremo posterior del cuerpo caloso. Esta glándula está unida por un tallo a las comisuras posterior y habenuar, y se encuentra cubierta por la piamadre. La GP a simple vista parece un cuerpo aplanado y cónico de aproximadamente 7 mm de longitud por 4 mm de ancho (Fig. 1). Su célula funcional es el pinealocito, el cual posee prolongaciones que terminan alrededor del tejido conectivo con un citoplasma que contiene cuerpos intracelulares vesiculares los cuales les confieren un carácter secretor (17,21,60,62).

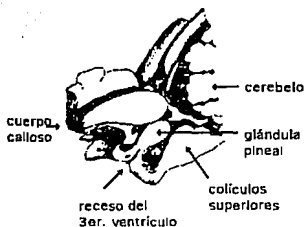


Fig. 1. Detalles anatómicos de la glándula pineal de humanos. Se muestran sus relaciones con el resto de estructuras epitalámicas. En esta especie, la pineal es única y su conformación es básicamente de tipo parenquimatosa, aunque conserva aún su relación con el sistema ventricular cerebral (7).

iii) Síntesis de Melatonina

La GP sintetiza y secreta en sincronía con el fotoperíodo diversos compuestos

peptídicos e indólicos, de estos últimos la Melatonina (MEL, n-acetil-5-metoxitriptamina) es la hormona más estudiada, por sus efectos antigonadales, además de que participa en el control de funciones neuroendócrinas, tiroideas, adrenales y sobre el sistema nervioso central (SNC) (8,28,58).

Algunos de estos compuestos se enlistan a continuación:

- a) Indoles: 5-metoxi-indoles
5-metoxi-triptofoles
Indoles asociados al ácido acético

- b) Péptidos: Neurotensina
Arginina
Vasotensina
Somatoestatina

- c) Otros: β -carbollinas

El ritmo de secreción de MEL está determinado por la actividad de relojes biológicos o marcadores del paso. Estos relojes están sincronizados por el fotoperíodo y a su vez son regulados por un potente coordinador o "Zeitgeber". Diversos trabajos han demostrado que el reloj que gobierna el ritmo de síntesis de la MEL se localiza en los Núcleos Supraquiasmáticos del hipotálamo (3). Según la influencia que la información fotoperiódica ejerza sobre la GP, los mecanismos de regulación de la síntesis de MEL no son los mismos (50,51).

La síntesis de MEL se inicia a partir de la serotonina y es dependiente de la activación de los receptores adrenérgicos de la GP, estos receptores localizados en los pinealocitos, son regulados por la extensión del día y la intensidad de la luz; a través de la actividad de la N-acetiltransferasa que es la enzima que cataliza la

formación de la N-acetil-5-metoxitriptamina en la GP (Fig. 2) (29).

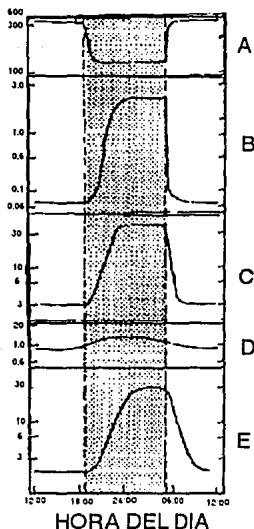


Fig. 2.

Ritmo de producción y secreción de MEL, sus precursores y sus enzimas sintetizantes. Mientras la concentración de MEL (E) alcanza su máximo valor alrededor de las 3 de la mañana, las concentraciones de serotonina (A) alcanzan su más baja expresión. Por su parte los niveles de la N-acetiltransferasa (B), N-acetilserotonina (C) y de la enzima Hidroxindol-O-metiltransferasa (D), muestran un incremento sincronizado con el de la MEL. Estas concentraciones equivalen a los valores absolutos por gramo de proteína de la pineal de la rata (10).

La vía metabólica de síntesis de los indoles requiere de varias enzimas, las más importantes son la N-acetil serotonina (enzima limitante) y la Hidroxi-indol-O-metil transferasa (HIOMT), que es exclusiva de los órganos que producen MEL, como la pineal, retina, intestino y glándula harderiana de los roedores (Fig. 3) (10,58,52).

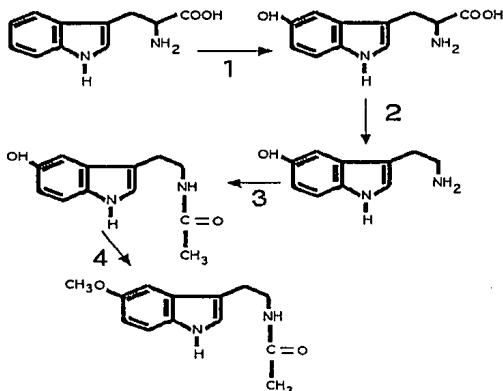


Fig. 3.

Síntesis de MEL.

La síntesis de MEL se inicia con la captura del aminoácido triptófano, el cual es convertido en 5-hidroxitriptófano, por acción de la Hidroxilasa del triptófano, esta enzima es limitante y los mecanismos de regulación de la síntesis de serotonina y MEL recaen sobre ella. El resto del proceso se muestra en la figura y termina con la síntesis de 3 tipos diferentes de indoles; estos son: La MEL, los 5-hidroxitriptófolos y los indoles asociados al ácido acético. Estos tres grupos de indoles poseen actividad fisiológica importante (27).

iv) Aspectos Inmunológicos

El sistema inmune ante agentes externos se encarga de coordinar las respuestas del organismo para mantener el equilibrio con el medio ambiente (53). Como un constituyente neuroendócrino, la GP. juega un papel importante sobre el sistema inmune, vía secreción circadiana de MEL (38). Varios estudios cronobiológicos han establecido que los sistemas inmune y hematopoyético presentan ritmos circadianos no únicamente en el número de células circulantes, sino también en la función de estas. De este modo, se deriva que el número de células mononucleares (linfocitos T y B, monocitos y células NK) muestra una fluctuación durante un ciclo de 24 horas, la cual está caracterizada por una disminución en la mañana y un aumento en la tarde, con una concentración máxima a media noche (33).

Los ritmos circadianos han sido demostrados también en eventos inmunológicos "in vivo", tales como el rechazo a injertos de riñón en rata o de la formación de anticuerpos a eritrocitos de carnero en ratón (1). En 1981, Maestroni y Pierpaoli publicaron los primeros resultados que muestran un claro efecto de la MEL sobre el sistema inmune, el principal efecto fue una acción moduladora del proceso de activación de los linfocitos por parte de esta hormona (38,40). Estos autores también mostraron que la MEL exógena modula los efectos del sistema inmune, contrarrestando la depresión inmunológica inducida por el estrés agudo y/o el tratamiento con concentraciones farmacológicas de corticosteroides. Además los factores psicosociales y el estrés, modifican la producción y liberación de MEL

(38,39,40). Por otra parte las alteraciones en los ritmos circadianos se asocian con estados de ansiedad, desórdenes afectivos, procesos que reflejan alteraciones inmunológicas, tales como cáncer (15,34). También existen reportes que muestran como la administración de MEL puede eliminar los efectos que el estrés inducido por inmovilización produce sobre el peso del timo y la producción de anticuerpos (19,42).

Otros estudios realizados "In vivo" indican que la MEL puede potenciar la acción de los linfocitos T únicamente en presencia de un agente extraño capaz de activarlos (antígeno T dependiente) (16,33,36). Esta acción es eliminada por antagonistas opioides específicos; lo que sugiere que algunos de los efectos de esta hormona sobre el sistema inmune están mediados por péptidos opioides cuyo origen probablemente sean los linfocitos. Aunque no puede excluirse la posibilidad de que provengan de otras fuentes no inmunológicas. Aunado a ello; Maestroni y Pierpaoli (38) mostraron que la MEL exógena tiene propiedades "inmunopotenciadoras" o "inmunoestimulantes" únicamente si se aplica a una determinada hora del día, lo cual depende del ritmo circadiano fotoperfódico a que está sometido el animal (35,39).

Como continuación a estas observaciones el presente estudio pretende analizar la relación existente entre la MEL y las concentraciones de leucocitos en la sangre.

III) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La relación MEL-sistema inmune, ha sido puesta en evidencia a través de trabajos realizados por Maestroni y Pierpaoli (36,38,40,41), Reiter (50,51) y otros autores quienes mostraron dicha conexión utilizando MEL en presencia de un antígeno T dependiente. En estas circunstancias encontraron el efecto Inmunomodulador de ésta hormona que se manifiesta por aumentar el título de anticuerpos en una forma sincronizada con el fotoperíodo (37,39). En este modelo experimental analizaremos el efecto, de disminuir la MEL endógena (animales pinealectomizados) y el de administrar melatonina en animales no comprometidos inmunológicamente, es decir en ausencia de un antígeno T dependiente, sobre los siguientes parámetros:

- Concentración sanguínea de células blancas (linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y número total de leucocitos).
- Peso y conformación histológica de órganos linfoideos (hígado, bazo y timo) y Testículos.
- Valores de hematocrito y concentraciones de hemoglobina.

Desconocemos la existencia de trabajos experimentales semejantes al presente. Los resultados de este trabajo nos permitirán establecer una relación fisiológica de la Glándula Pineal y el sistema inmune en ratas sanas no comprometidas Inmunológicamente. Elegimos estos parámetros, por su accesibilidad y porque serían los primeros en mostrar una modificación ante un estímulo (MEL) que incremente o decremente la función inmunológica.

IV) HIPOTESIS.

"Si la relación MEL - sistema inmune se manifiesta en modelos experimentales que requieren de la presencia de un antígeno T dependiente; es de esperarse que esta inmunomodulación se manifieste al incrementar o decrementar las concentraciones de MEL; lo que se reflejara en alteraciones en la cuenta de leucocitos y en cambios anatómicos de los órganos linfoideos".

V) OBJETIVOS

- 1) Describir los efectos de la administración repetida de MEL sobre la cantidad células blancas (linfocitos, polimorfonucleares, monocitos) en la sangre; y sobre el bazo, el timo y el hígado.
- 2) Analizar el efecto de esta hormona sobre el peso y morfología histológica gruesa de tres órganos linfoides, bazo, timo e hígado.
- 3) Reducir al máximo las concentraciones de MEL endógena a través de la pinealectomía y analizar sus efectos.
- 4) Describir la relación funcional que existe entre la Glándula Pineal y las concentraciones sanguíneas de los leucocitos, peso y morfología de los tejidos linfoides.

VI) MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

i) Material de curación

- Jeringas de 3ml
- Agujas
- Gasa
- Bisturí

ii) Material de vidrio

- Portaobjetos limpios y desengrasados
- Pipetas graduadas de 1ml, 5ml y 10ml
- Varillas de vidrio
- Vidrios de reloj
- Frascos Gotero
- Matraz aforado de 100ml y 500ml
- Probetas graduadas de 50ml y 100ml
- Capilares heparinizados
- Vasos de precipitados de 100ml y 250ml
- Cámara de Neubauer
- Pipeta de Thoma para glóbulos blancos

iii) Equipo fijo

- Microscopio óptico
- Microcentrifuga
- Balanza Analítica
- Balanza Granataria
- Máquina para recuento celular
- Mechero
- Estereotáxico

iv) Diversos

- Estuche de disección
- Mesa de cirugía
- Inmovilizador

v) Reactivos

- Solución Buffer de fosfatos, $\text{ph}=7.2$
- Etanol al 70%
- Heparina Sódica (1,000 USP units/ml) Lypho-Med, Inc. Chicago, Ill.
- Melatonina Sigma Chemicals, St.Louis Mo. (USA)
- Solución de Drabkin
- Líquido diluyente de Turk
- Solución de Wright
- Agua destilada
- Benzal 1:1000
- Polietilenglicol (PEG) Sigma Chemicals, St. Louis Mo. (USA)

vi) Material Biológico

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar, con una edad aproximada de tres meses, y con un peso que osciló entre 180-220g, sin previa manipulación experimental al tratamiento. Los animales se habituaron a las condiciones de luz-obscuridad (7:00 - 21:00hrs) y a la temperatura ambiente del laboratorio, durante una semana antes de la experimentación. Las ratas se colocaron por parejas en cajas de acrílico transparente con tapa enrejada, con acceso libre al agua y alimento.

METODOS

Para llevar a cabo el presente trabajo las ratas macho se almacenaron a razón de 2 animales por caja y fueron separados por grupos ($n=5$), para cada dosis o tratamiento empleado. Se utilizó un grupo control, tres grupos experimentales a los cuales se les administró 2.5, 5.0 y 10.0mg/kg de peso de MEL y dos grupos más uno con pinealectomía y otro con falsa pinealectomía.

A los grupos tratados se les administró MEL durante 15 días diariamente, vía subcutánea aproximadamente dos horas antes de que oscureciera (entre 17:00 y

17:30 hrs). Se les realizó una toma de muestra sanguínea (TMS) basal de la porción terminal de la cola y cuatro TMS más a intervalos de 3 días cada una (44). Al final del tratamiento se sacrificaron a los animales descerebrándolos y se extrajeron los órganos linfoides (hígado, bazo y timo) y testículos. El grupo control recibió el mismo tratamiento pero a este se le administró sólo el vehículo (PEG 2%).

A los grupos con Pinealectomía y Falsa Pinealectomía se les realizó la TMS antes de la cirugía. Después de cuatro días de recuperación continuaron las TMS a intervalos de tres días. El último día se sacrificaron los animales y se extrajeron los mismos órganos. A las muestras sanguíneas se les realizaron las siguientes valoraciones: Cuenta total de Glóbulos blancos, cuenta diferencial de Glóbulos blancos, Hemoglobina y Hematócrito (como medida indirecta del funcionamiento del bazo e Hígado). Todo el proyecto se llevó a cabo entre los meses que comprenden las estaciones de otoño e invierno (Octubre a Febrero).

i) Toma de muestra sanguínea.

La toma de muestra sanguínea (TMS) en rata, se llevó a cabo de una manera poco traumática y que permitía una continua obtención de sangre. Esto se logró cortando pequeñas porciones de la parte terminal de la cola. Obteniéndose sangre suficiente (1.0 ml) para realizar frotis sanguíneos, y determinar número de leucocitos y concentración de hemoglobina, así como el hematócrito. Para realizar tal procedimiento se efectuaban los siguientes pasos:

- Se introducía al animal en un inmovilizador durante 15 min, dejando libre la

cola (fig. 4)

- Los 6 cm finales de la cola se introdujeron en un recipiente con agua caliente (45°C), durante unos 30 seg.
- Posteriormente se aplicaba benzal en la cola e inmediatamente se extirpaba con el bisturí una porción de aproximadamente 3mm de la misma.
- Se desecharon las 2-3 primeras gotas de sangre y la siguiente se colocó en un portaobjetos limpio para la realización de los frotis, bajo la gota directamente se coloca el capilar heparinizado para colectar la muestra para Hematócrito y finalmente con una jeringa se recolectó aproximadamente 1 ml para determinar el número de leucocitos y la concentración de hemoglobina.

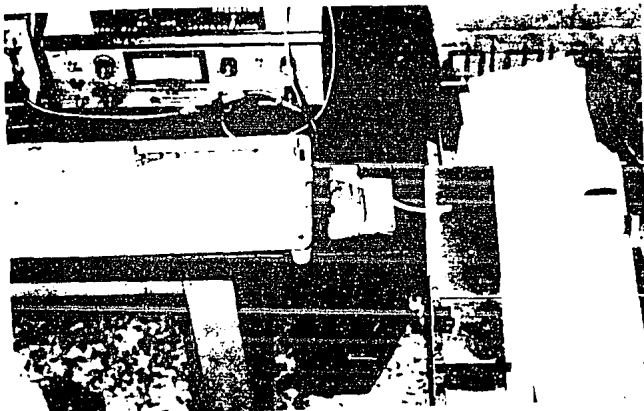


Fig. 4. En esta fotografía se observa el procedimiento a seguir para obtener la muestra de sangre.

ii) Preparación de Frotis sanguíneos:

- Los portaobjetos que se utilizaron para frotis sanguíneos estaban limpios y desengrasados con una mezcla de etanol-éter.
- El portaobjetos se tomaba con una mano y con la otra se colocaba el borde de otro portaobjetos frente a la gota de sangre.
- El portaobjetos se desplazaba hacia atrás, hasta que tocaba la gota de sangre y la extendía por el borde; enseguida se deslizaba el portaobjetos hacia el extremo opuesto.
- El frotis se prepara distribuyendo lo más uniforme posible una gota de sangre sobre un portaobjetos de 25 X 75mm de tal manera que sólo se deposite una capa de células.
- Finalmente el frotis se secaba y se marcaba la laminilla, en la parte más gruesa con un lápiz de grafito (25,43,61).

iii) Determinación de la fracción y número de leucocitos:

FUNDAMENTO: No todos los leucocitos (Glóbulos Blancos) que circulan en la sangre son idénticos. Hay cinco tipos principales, que se diferencian por el tamaño, la forma del núcleo, el color de los gránulos del citoplasma y otras características morfológicas y tintoriales. Para observar al microscopio las peculiaridades morfológicas de cada una de estas células es necesario teñirlas, para lo cual se cuenta con diferentes tipos de colorantes. El más común y utilizado en este trabajo

fue el colorante de Wrigth, que tiñe las estructuras acidofílicas con reacción alcalina de rojo y las estructuras basofílicas con reacción ácida de azul.

La tinción con este colorante se realizó de la siguiente manera:

- El frotis de sangre se cubrió con la solución de Wrigth, durante 3-5 minutos, para después se agrega un buffer de fosfatos (pH=7.2), con ello se forma una superficie de brillo metálico. Posteriormente a los 5-7 minutos se lava el frotis con agua corriente y se seca al aire, con lo cual está listo para observarse al microscopio utilizando una amplificación de 100 veces (100X) (25,49,61)

Con el colorante de Wrigth, las células se observan de la siguiente manera:

Los núcleos de los leucocitos: Violeta rojizo
Gránulos eosinófilos: Rojo brillante a rojo café
Gránulos basófilos: Violeta oscuro
Gránulos neutrófilos: Violeta claro
Citoplasma de linfocitos: Azul
Citoplasma de monocitos: Azul grisáceo

iv) Determinación del número de Células.

Para determinar el número de células se requiere de un examen fundamental que se practica de una manera sistemática, el cual estriba en el recuento de eritrocitos y leucocitos. A pesar de la introducción reciente de métodos automatizados, las técnicas tradicionales aun son ampliamente utilizadas por su fácil operación y alta fidelidad.

FUNDAMENTO: La técnica del Hemocitómetro, la cual utiliza una cuadrícula de Neubauer resulta la más empleada, ésta se inicia al diluir una muestra sanguínea con

anticoagulante en una proporción exacta, con un líquido que permite contar sólo las células que se desean (por destrucción de las otras); un volumen de μl de ésta mezcla se deposita en la cámara de Neubauer y se observa al microscopio determinando el número de células que se encuentran dentro de las cuadrillas específicas para Glóbulos rojos y Glóbulos blancos. Por medio de las fórmulas correspondientes se obtiene el número de células por milímetro cúbico (25,49,61).

v) Determinación del número de Leucocitos.

- Se llenó con la muestra de sangre la pipeta de Thoma hasta la marca de 0.5; y luego con la pipeta inclinada se llevó hasta la marca de 11 con el líquido de Turk (Solución hipotónica que destruye Glóbulos rojos).
- Se tomó la pipeta entre los dedos índice y pulgar para agitarla durante dos o tres minutos.
- Se retiraron las primeras 5 gotas para eliminar el diluyente del capilar y poniendo la pipeta entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos, se llenó la cámara procurando que quedara bien cubierta la superficie.
- Se dejó reposar 3min, se colocó en el microscopio y se localizó la cuadrícula.
- Con el objetivo de 10X se determinó el número de células en las cuatro cuadrículas grandes de los extremos.
- La suma de estos números se multiplicaron por 50 y el resultado fue el número de leucocitos por milímetro cúbico.

vi) Hematócrito.

FUNDAMENTO: El Hematócrito es la prueba diagnóstica que mide el volumen que ocupan los eritrocitos. Esta se obtiene cuando un volumen conocido de sangre completa se somete a centrifugación, a una velocidad constante y durante un período de tiempo determinado. El resultado obtenido se expresa como el porcentaje total de hematíes (25,49,61).

Para determinar este parámetro en nuestro trabajo realizamos el siguiente procedimiento:

- Se obtuvo la muestra sanguínea directamente del corte de la cola de la rata, colocando el capilar de 100µl heparinizado bajo las gotas de sangre, de esta manera se llenaba por capilaridad hasta las tres cuartas partes del mismo, la parte vacía del capilar servía para sellarlo con plastilina.
- El capilar se colocaba en una microcentrífuga, con la parte sellada hacia el exterior.
- El capilar se sometía a una fuerza de centrifugación de 10 000rpm durante 5min (25,49,61).
- La lectura del hematócrito se efectuó por el siguiente cálculo:

$$\text{HCTO} = \frac{\text{vol. ocupado por GB}}{\text{vol. total de la muestra}} \times 100$$

vii) Hemoglobina.

FUNDAMENTOS: El valor de Hemoglobina se determina diluyendo un volumen de sangre venosa mezclada con $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN}_6)$ y solución de KCN (reactivo de Drabkin) para

formar cianometahemoglobina. Luego la densidad óptica de este pigmento es medida a 540nm (49).

Para cuantificar la hemoglobina utilizamos el siguiente procedimiento:

- Colocamos 5 ml de reactivo de Drabkin en un tubo de ensaye y agregamos 0.02 ml de sangre homogenizada.
- Agitamos la mezcla vigorosamente para oxigenarla y posteriormente se colocaba en el espectrofotómetro para leer la absorbancia contra un blanco (5 ml del reactivo de Drabkin), es decir encontrar el cero de transmitancia y calibrar el aparato, posteriormente se introducía el blanco y se calibraba a cero de absorbancia todo este procedimiento utilizando una longitud de onda de 540 nm.
- Enseguida leíamos la muestra problema.

$HB = Absorbancia \times 36.8$ (factor constante) = g Hb/100ml de sangre

viii) Pinealectomía.

FUNDAMENTO: La Pinealectomía es una intervención quirúrgica que consiste en la extracción total (cuerpo y tallo) de la glándula pineal. Este procedimiento quirúrgico es sumamente delicado debido al riesgo que implica lesionar el cráneo, las meninges, el seno venoso sagital y los colículos superiores. La extracción del órgano pineal de roedores deben realizarse en un período de un minuto como máximo, cuando se utiliza la técnica de Hoffman y Reiter.

Para realizar la pinealectomía las ratas se anestesiaban con pentobarbital sódico a

una dosis de 35mg/kg de peso corporal vía intraperitoneal. Una vez anestesiadas, se rasuró el área del cráneo y se colocaron en el estereotáxico (42). Se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm de longitud previa asepsia con benzal 1:1000. Enseguida se retiró el periostio y se localizó el punto lambda (concordancia a la sutura osea occipital con la medla sagital) (60); en ella se hizo una trepanación con una fresa de centro fijo (4.5 mm de diámetro x 5 cm de longitud), la cual deja descubierto el seno venoso localizado por arriba de la GP. Posteriormente se cortó el seno venoso y con las pinzas para microcirugía se extrajo la GP. Luego se intentó realizar hemostasia con Gelfoam y se cubrió la trepanación con cera de hueso, finalmente se suturó la incisión de la piel. Terminada la cirugía se administraron 3 ml de solución salina al 9% en forma muy lenta por vía intraperitoneal (fig 5).



Fig. 5. Fotografía que muestra la manera en que se realizó la cirugía (Pinealectomía).

ix) Falsa Pinealectomía.

Para la realización de esta técnica se procedió de la misma manera que para la pinealectomía, con la excepción de que no se extraía la GP (42).

x) Sacrificio de animales:

Después de las 15 administraciones de MEL 2.5, 5 y 10 mg/kg de peso correspondientes a cada grupo experimental y una vez obtenidas todas las muestras de estos grupos y las del grupo de animales pinealectomizados; estos fueron sacrificados, mediante la técnica de desnucamiento:

- Se colocó al animal sobre una superficie plana y se cubrió con un lienzo.
- Con los dedos índice y pulgar de la mano derecha se sujetó fuertemente el cuello del animal y con los mismos dedos de la otra mano se sujetó la base de la cola.
- De manera firme se separaban ambas manos con el fin de separar las vertebrae del cuello y provocar la muerte del animal (desnucar).

ix) Dosis de Administración

Los datos reportados por algunos autores respecto a la dosis de MEL que causa efectos inmunológicos en animales de laboratorio se encuentran en un amplio rango de concentraciones que van de 10µg hasta 10mg de MEL por kg de peso (35,38). Para la elección adecuada de las dosis de MEL que utilizamos en este trabajo realizamos varios grupos piloto, a los cuales les administramos 10µg, 50µg, 100µg, 2.5mg, 5.0mg y 10mg de MEL utilizando el mismo procedimiento y realizando las

mismas determinaciones; los resultados mostraron que a las dosis de 2.5, 5.0 y 10.0 mg la MEL tenía mayor efecto que el resto de las concentraciones. En base a estos resultados decidimos eliminar las dosis más pequeñas utilizando sólo las dosis de 2.5, 5.0 y 10 mg.

xii) Hora y vía de administración.

Existen algunos reportes en los cuales se describe el efecto de la MEL sobre algunas células, rechazo a injertos, título de anticuerpos (33) cuando esta se administra a distintas horas del día; encontrándose que cuando la MEL es administrada por las tardes existe una mayor sensibilidad de los organismos para responder a ella; mostrando un desfase en la producción de algunas células (monocitos, NK), menor rechazo a injertos y un aumento del título de anticuerpos. Y, al contrario cuando la MEL es administrada por las mañanas no se encuentran ninguno de los mismos efectos, lo que demuestra una menor sensibilidad de los organismos para responder a la MEL cuando es administrada a esta hora del día (3,4,8). Por tal motivo se decidió administrar dicha hormona al momento en el que tiene una mayor sensibilidad, dos horas antes de que empezara a oscurecer.

La vía de administración utilizada fue elegida con el fin de que la concentración de MEL administrada se mantuviera por un período de tiempo más prolongado; la vía de administración subcutánea proporciona una absorción más lenta.

RESULTADOS. •

En el presente trabajo analizamos el efecto de incrementar la MEL y de disminuir su concentración a través de la pinealectomía en el organismo, sobre algunos parámetros inmunológicos, como son: la cuenta total de leucocitos, cuenta diferencial (que comprende el porcentaje de linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos), el índice organosómico de Bazo, Timo e Hígado, además de otros parámetros sanguíneos que no se incluyen dentro de la cuenta blanca celular, como son el porcentaje de Hcto y la concentración de Hb (mg/100ml) por la estrecha relación que guarda la hematopoyesis con los órganos bazo e hígado.

Cada uno de estos elementos fueron medidos y analizados, a partir de pequeñas muestras sanguíneas obtenidas gracias a un pequeño corte en la punta de la cola del animal. Se permitió un intervalo de 3 días entre cada TMS durante el tratamiento, el cual tuvo una duración total de 15 días. Al final del proyecto, además de los órganos linfoides, se les extrajeron a los animales los testículos, y se les determinó su índice organosómico y morfología histológica, como indicador de que la MEL fue administrada correctamente.

Durante todo el proyecto los animales se mantuvieron en jaulas sin modificar las condiciones establecidas al empezar el proyecto. Al inicio del experimento el peso de los animales osciló entre 180 y 200 g y al final del mismo, después de 15 días su peso estuvo entre 290 y 310 g. Ni el tratamiento con MEL, ni la manipulación quirúrgica modificaron en forma gruesa la ingesta de alimento o agua. El peso

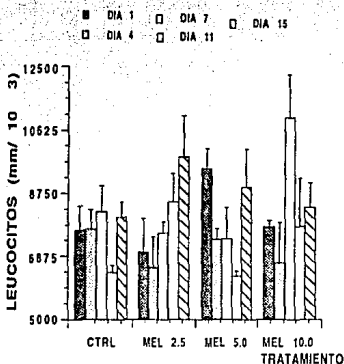
corporal de todos los sujetos fue muy similar independientemente del grupo al que pertenecían. Además no se observó algún cambio conductual aparente relacionado con alguno de los tratamientos aplicados.

En las TMS, los animales se introducían dentro del inmovilizador, lo que provocaba una conducta de inquietud, usualmente mostraban resistencia, muchos de ellos chillaban e intentaban girar dentro del inmovilizador. Al extirpar los 3 mm de cola para obtener la muestra sanguínea el animal mostraba resistencia y chillaba durante todo el tiempo de la toma y la antisepsia; pero una vez terminado esto el animal volvía a su condición basal. Ninguna rata mostro algún problema de tipo infeccioso relacionado con el proceso quirúrgico de la TMS.

En cuanto a los animales sometidos a una pinealectomia y falsa pinealectomia unicamente fueron incluidos en el estudio aquellas ratas que no mostraron alteraciones conductuales resultado de su intervención. En los animales con esta intervención fue frecuente encontrar, sujetos que giraban habitualmente o que rotaban, que no ingerían alimento. Algunas de estas ratas mostraron cuadros infecciosos que incluso les ocasionaban la muerte. Por esta razón decidimos incluir en este trabajo solo aquellos animales cuya conducta en general fue similar a la mostrada por los sujetos controles.

En relación a la cantidad total de leucocitos, la administración de MEL a las dosis empleadas, no provocó efecto significativo alguno. Así, (La concentración sanguínea de leucocitos de las ratas que recibieron 2.5 mg/Kg de MEL (\bar{x} = 7890 ±

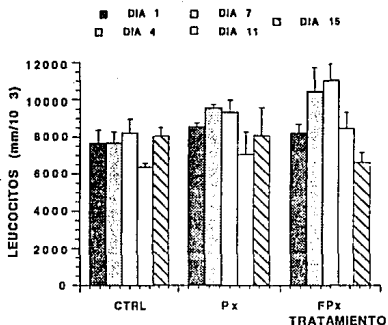
580) no varió significativamente ($p>0.3$) respecto al grupo control ($\bar{X} = 7592 \pm 718$) en todos los días analizados. Lo mismo ocurrió con los datos obtenidos al administrar MEL a la dosis de 5.0 mg/kg ($\bar{X} = 7899 \pm 577$; $p>0.3$) y a 10.0 mg/kg ($\bar{X} = 8304 \pm 717$; $p>0.3$), los cuales aunque muestran variabilidad no son diferentes estadísticamente (Gráfica 1).



Gráfica 1. En esta gráfica se observa la concentración sanguínea de leucocitos en animales tratados con MEL a 2.5, 5.0 ó 10.0 mg/Kg de peso ($n=5$), a lo largo de todo el tratamiento. No se encontraron diferencias estadísticas significativas al comparar los diferentes grupos.

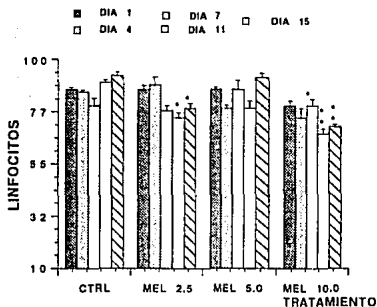
De igual manera, este mismo parámetro no se modificó en los animales sometidos a una pinealectomía o falsa pinealectomía se observó una $\bar{X} = 8515 \pm 451$ para los animales pinealectomizados, valor que no fue estadísticamente significativo ($p>0.06$)

al compararlo con el obtenido en el grupo control ($\bar{X} = 7592 \pm 718$); por otra parte los datos obtenidos mostraron que en el grupo de falsa pinealectomía ($\bar{X} = 8956 \pm 869$) tampoco hubo diferencias significativas ($p < 0.06$) (Gráfica 2).



Gráfica 2. De igual manera la manipulación quirúrgica de la glándula pineal (pinealectomía, Px) o incluso la falsa pinealectomía (FPx) no mostraron efectos significativos sobre la concentración de leucocitos.

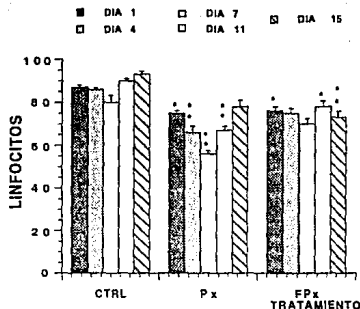
En lo relativo a los linfocitos, observamos que la administración vespertina y diaria de MEL durante 15 días provocó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de linfocitos con las dosis más bajas (2.5 mg/kg) ($\bar{X} = 82 \pm 2.7$) y a las dosis más altas (10.0 mg/kg) ($\bar{X} = 75 \pm 2.4$; $p < 0.005$), en los días 11 y 15 de tratamiento, con respecto al grupo control ($\bar{X} = 86 \pm 5$). Mientras que la MEL exógena en dosis de 5.0 mg/kg no presentó efecto significativo alguno (Gráfica 3).



Gráfica 3. En esta figura se muestra un decremento significativo en el porcentaje de linfocitos provocado por la administración de MEL en dosis de 2.4 y 10.0 mg/Kg, principalmente durante los últimos días de toma de muestra. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$.

Al analizar los datos encontrados en el número de linfocitos en sangre, en animales pinealectomizados y con falsa pinealectomía se encontró una disminución del porcentaje de estas células en los dos grupos, de manera significativa ($p < 0.005$) para la pinealectomía ($\bar{x} = 68.0 \pm 3.0$), al igual que para la falsa pinealectomía ($\bar{x} = 73.0 \pm 1.2$; $p < 0.005$), con respecto al grupo control ($\bar{x} = 87.0 \pm 1.8$) (Gráfica 4). También la administración de MEL provocó efectos sobre el porcentaje de neutrófilos. Con la dosis de 2.5 y 10.0 mg/kg se observaron aumentos significativos ($\bar{x} = 14.6 \pm 4.4$; $p < 0.005$) y ($\bar{x} = 23 \pm 3.4$; $p < 0.005$), respectivamente. Mientras que con 5.0

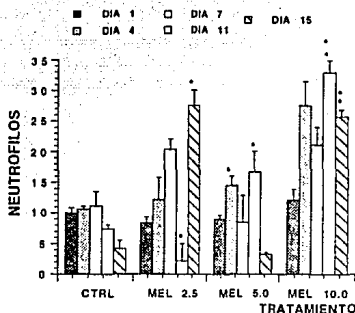
mg/kg ($\bar{X} = 10 \pm 5$) el aumento se produjo en menor grado ($\bar{X} = 10.4 \pm 0.66$; $p < 0.05$) todo ello con respecto al grupo control ($\bar{X} = 8.68 \pm 2.8$) (Gráfica 5).



Gráfica 4. Esta gráfica muestra una reducción significativa en el porcentaje de linfocitos causadas por la intervención quirúrgica correspondiente a la pinealectomía y falsa pinealectomía. En esta y las siguientes gráficas * = $p < 0.05$ y ** = $p < 0.01$.

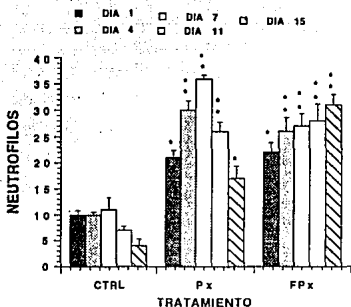
En el caso de este parámetro en animales con pinealectomía y falsa pinealectomía, encontramos que el porcentaje de neutrófilos circulantes, se incrementó muy por arriba del grupo control ($\bar{X} = 8.6 \pm 2.8$), tanto en ratas con pinealectomía ($\bar{X} = 26.0 \pm 3.2$; $p < 0.005$) como en animales a los cuales se les realizó

falsa pinealectomía ($\bar{x} = 27.0 \pm 1.5$; $p < 0.005$) (Gráfica 6).



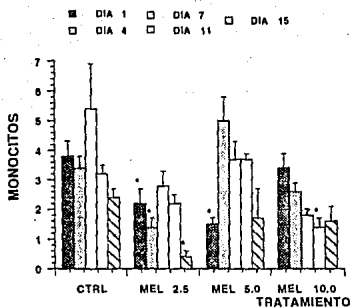
Gráfica 5. Con la administración de MEL se observa un incremento significativo en el porcentaje de neutrófilos, el cual es dependiente de la dosis.

Los frotis sanguíneos mostraron que el porcentaje de monocitos en la sangre periférica se encontró disminuído, principalmente en animales que recibieron dosis de 2.5 mg/kg de MEL ($\bar{x}=1.8 \pm 0.41$; $p<0.05$); también se encontró una disminución, aunque menor y sólo en los últimos días de tratamiento (undécimo y décimoquinto día), en los animales administrados que recibieron MEL en dosis de 10.0 mg/kg ($\bar{X}=1.5 \pm 0.37$; $p<0.05$), cuando se compararon con los datos del grupo control ($\bar{x}=3.6 \pm 1.1$) (Gráfica 7).



Gráfica 6. El porcentaje de neutrófilos en sangre se incrementó significativamente en los grupos de animales con pinealectomía o falsa pinealectomía. Resultado del procedimiento quirúrgico.

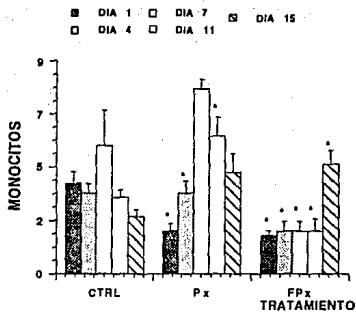
Estas células también se incrementaron en la sangre de los animales pertenecientes al grupo pinealectomizado sobre todo en el 4to día posterior a la cirugía ($\bar{X} = 5.8 \pm 1.02$; $p < 0.05$), una situación similar ocurrió con el grupo de falsa pinealectomía (2.3 ± 0.57), al compararlo con el grupo control ($\bar{X} = 3.6 \pm 1.1$) (Gráfica 8).



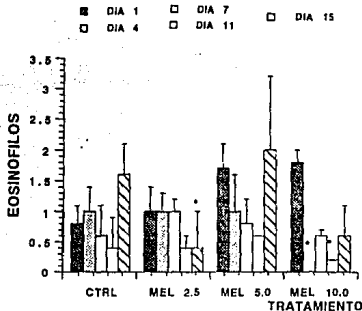
Gráfica 7. En esta figura se observa una disminución importante en el porcentaje de monocitos debido a la administración de MEL el cual se manifestó con mayor intensidad con el empleo de la dosis de 2.5 mg/Kg.

Al igual que el porcentaje de monocitos, el porcentaje de eosinófilos circulantes en sangre disminuyó, principalmente con la administración de una dosis de 10.0 mg/kg ($X=0.6 \pm 0.31$; $p<0.05$) en los días cuarto y undécimo del tratamiento, con respecto al grupo control ($x=0.88 \pm 0.4$) (Gráfica 9).

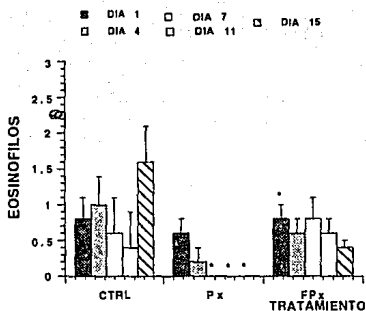
Cuando se reducía la concentración de MEL endógena, vía la pinealectomía se observa inicialmente una disminución del porcentaje de eosinófilos. En los últimos días de tratamiento (séptimo, undécimo y décimoquinto día), la reducción es tal que estos desaparecen en los frotis sanguíneos. (Gráfica 10).



Gráfica 8. Esta gráfica muestra el porcentaje de monocitos en los animales con pinealectomía y falsa pinealectomía, el cual mostró un importante descenso por tales maniobras quirúrgicas.



Gráfica 9. Esta figura representa la disminución del porcentaje de eosinófilos en los grupos tratados con pinealectomía sobre todo a la dosis de 10.0 mg/kg



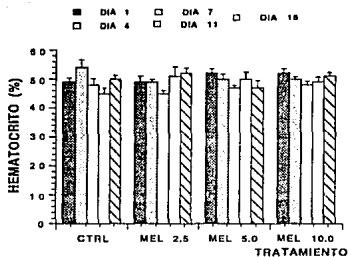
Gráfica 10. Esta figura muestra una disminución importante en el porcentaje de eosinófilos como consecuencia de la pinealectomía.

Al medir parámetros incluidos dentro de la cuenta roja celular, como el hematócrito, se observó que este no se modificó en ninguno de los grupos tratados con MEL en esas dosis 2.5 ($\bar{x} = 49.0 \pm 2.0$; $p > 0.1$), 5.0 ($\bar{x} = 49.0 \pm 2.0$; $p > 0.07$) y 10.0 ($\bar{x} = 50.0 \pm 1.2$; $p = 0.3$) mg/ kg (Gráfica 11).

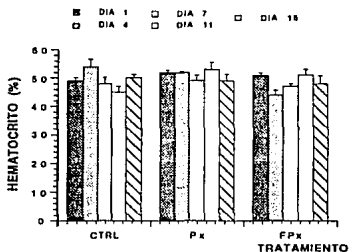
El hematócrito determinado en los grupos con pinealectomía (51 ± 1.6 ; $p < 0.3$) y falsa pinealectomía ($\bar{x} = 48.0 \pm 2.0$; $p = 0.4$) no fue diferente significativamente del encontrado en el grupo control ($\bar{x} = 49.0 \pm 2.0$) (Gráfica 12).

La concentración de hemoglobina, se mostró disminuída en los animales que recibieron alguna de las dosis administradas de MEL a 2.5 ($\bar{x} = 13.6 \pm 0.36$; $p < 0.05$), 5.0 ($\bar{x} = 14.8 \pm 0.48$; $p < 0.05$) y 10.0 ($\bar{x} = 13.0 \pm 0.58$; $p < 0.01$) mg/kg (Gráfica 13).

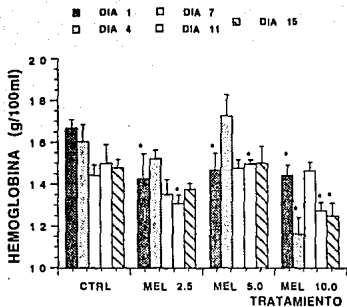
Lo mismo ocurrió con los animales sometidos a la pinealectomía ($\bar{X} = 13.09 \pm 0.82$; $p > 0.03$) y la falsa pinealectomía ($\bar{X} = 13.8 \pm 0.76$) aunque en este último caso, sólo se observaron cambios significativos en el día 4 con respecto al grupo control ($\bar{X} = 15.41 \pm 0.9$) (Gráfica 14).



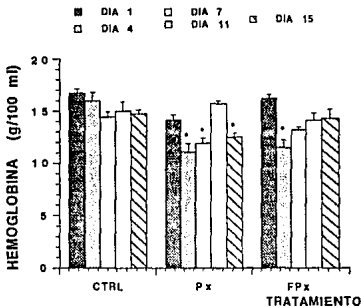
Gráfica 11. En esta gráfica se representa el valor del hematocrito, el cual no se modificó, con la administración de MEL.



Gráfica 12. Esta gráfica muestra que ni la pinealectomía ni la falsa pinealectomía, provocaron efectos sobre los valores de hematocrito correspondientes.

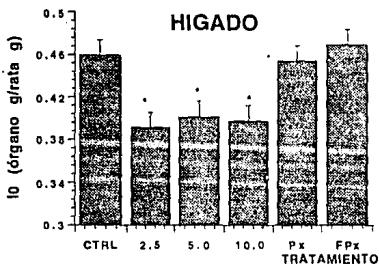


Gráfica 13. La concentración de Hb (g/100ml), representada en esta gráfica para los grupos tratados con MEL, se observó disminuída significativamente, al compararla con el grupo control.



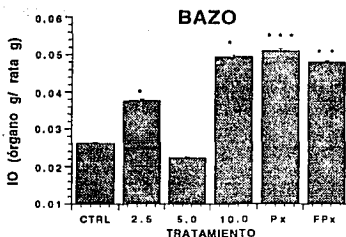
Gráfica 14. Esta gráfica muestra que la concentración de Hb en animales pinealectomizados disminuyó al compararlos con el grupo control.

El análisis de los órganos linfoides Timo, Bazo e Hígado mediante el índice organosómico (peso del órgano/peso de la rata x 10) mostró que el peso del hígado de las ratas a las que se les administró MEL disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a las dosis de 2.5 ($\bar{x} = 0.3911 \pm 0.01$), 5.0 ($\bar{x} = 0.3959 \pm 0.01$), y 10.0 ($\bar{x} = 0.3910 \pm 0.01$) mg/kg respecto al grupo control ($\bar{x} = 0.4596 \pm 0.03$). En lo que se refiere a los grupos con pinealectomía y falsa pinealectomía no se observó modificación ($\bar{x} = 0.46 \pm 0.02$) en este índice con respecto al hígado de los animales del grupo control ($\bar{x} = 0.4596 \pm 0.03$) (Gráfica 15).



Gráfica 15. En esta gráfica se muestra el índice organosómico del hígado en animales tratados con MEL, así como en animales pinealectomizados, con falsa pinealectomía y controles; el cual se observó disminuído en forma significativa únicamente en los animales que recibieron dosis de 2.5, 5.0 y 10.0 mg/kg de MEL.

El índice organosómico del bazo, uno de los órganos secundarios del sistema inmune, aumento en los animales que recibieron una administración de 2.5 ($\bar{x} = 0.0376 \pm 0.07$; $p < 0.05$) y 10.0 mg/kg ($\bar{x} = 0.0493 \pm 0.007$; $p < 0.05$); pero en la administración de 5.0 mg/kg ($\bar{x} = 0.0206 \pm 0.002$) se observó una disminución aunque ésta no fue significativa, al compararlo con el valor respectivo del grupo control ($\bar{x} = 0.02618 \pm 0.02$).

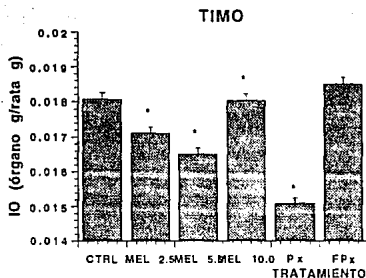


Gráfica 16. El índice organosómico del bazo se representa en esta gráfica, la cual muestra un incremento en los grupos con 2.5 y 10mg/kg de MEL y en los dos grupos con manipulación quirúrgica (Px y FPx). ***= $p < 0.0001$

En el grupo de animales a los que se les disminuyó la concentración de MEL endógena (ratas pinealectomizadas) el índice organosómico del bazo ($\bar{x} = 0.0510 \pm 0.0035$; $p < 0.0005$) se incrementó de una forma muy marcada; de igual manera sucede con las ratas con falsa pinealectomía ($\bar{x} = 0.0479 \pm 0.006$; $p < 0.01$) al

compararlas con el grupo control ($\bar{x} = 0.02618 \pm 0.02$) (Gráfica 16).

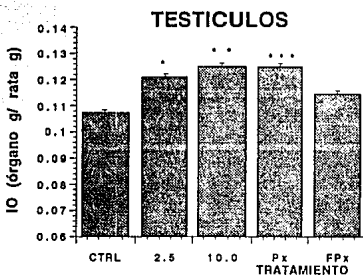
Otro de los principales órganos que participan en las funciones inmunes del organismo es el timo, el índice organosómico de este tejido se modificó en todos los grupos a los que se les administró MEL, hormona que produjo un decremento significativo ($p < 0.05$) a 2.5 ($\bar{x} = 0.01802 \pm 0.001$), 5.0 ($\bar{x} = 0.0164 \pm 0.0006$) y 10.0 ($\bar{x} = 0.0181 \pm 0.001$) mg/kg en comparación con los animales control ($\bar{x} = 0.01801 \pm 0.003$). Además en los animales pinealectomizados este órgano disminuyó considerablemente ($\bar{x} = 0.0150 \pm 0.0013$; $p < 0.05$) (Gráfica 17).



Gráfica 17. En esta gráfica se observa el índice organosómico del timo el cual está disminuido tanto en los grupos con tratamiento de MEL como en los pinealectomizados.

En lo que se refiere al índice organosómico de testículos, éste se vio incrementado por la administración de MEL. De esta manera se mostró un aumento

significativo en la dosis de 2.5 ($\bar{X} = 0.1211 \pm 0.0049$, $p < 0.05$) y a la de 10.0 ($\bar{X} = 0.1250 \pm 0.0031$, $p < 0.005$). En animales con pinealectomía también se produjo un incremento ($\bar{X} = 0.1253 \pm 0.0024$, $p < 0.0005$) con respecto al grupo control ($\bar{X} = 0.10582 \pm 0.0059$), no así con el grupo de falsa pinealectomía (Gráfica 18).



Gráfica 18. Esta gráfica muestra un incremento significativo en el índice organosómico de los testículos en los grupos tratados con MEL al igual que en el grupo con pinealectomía.

El análisis estadístico empleado en la interpretación de los resultados, consistió en una prueba inferencial de Análisis de Varianza (ANOVA). Previamente a ella, siempre se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas conocida como prueba F de Fisher. Si el análisis realizado por ANOVA mostraba diferencias significativas, se procedía entonces a realizar una prueba de Tukey para identificar a los grupos que mostraron tal diferencia.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Varios estudios muestran que las respuestas neuroendocrinas provocados por la exposición a estímulos ambientales pueden desencadenar un efecto directo sobre el sistema inmune (20,22,31). Tales hallazgos sugieren que los elementos del sistema inmune constituyen órganos sensibles capaces de responder a ciertos estímulos ambientales lo que implica un proceso adaptativo por excelencia (5).

Recientemente se asoció a la GP con la regulación del sistema inmune; por su capacidad de traducir la información de la luz ambiental en señales que modulan las funciones neuroendócrinas, reproductoras e inmunes por la acción de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (31).

A pesar de que por mucho tiempo se ha sospechado de la interacción entre la GP y el sistema inmune, únicamente en años recientes se acumularon evidencias sobre la existencia de tal relación. Múltiples modelos experimentales tanto "in vivo" como "in vitro" se utilizaron para demostrar tal conexión y el mecanismo por el cual ésta se lleva a cabo (19).

En el presente estudio utilizamos un modelo experimental encaminado hacia el análisis del efecto fisiológico de la función de la GP en el proceso de modulación de la respuesta inmune. Decidimos no utilizar animales inmunocomprometidos para evaluar tal interacción, debido a que en estos sujetos la susceptibilidad y características del sistema inmune no se corresponde con una situación fisiológica.

Los resultados obtenidos muestran que la cuenta total de leucocitos en los sujetos

que recibieron administraciones diarias de alguna dosis de MEL (2.5, 5.0 ó 10.0 mg/kg) no se modificó significativamente, tal situación también se observó en los grupos de animales con pinealectomía y falsa pinealectomía. Estos resultados indicaron que la MEL, no modificó el número total de células inmunes que se encuentran en sangre. Tal observación es significativa si analizamos el hecho de que la permanencia en la sangre de estas células es sólo un período muy pequeño en la vida de la mayoría de las células estudiadas. Tal hallazgo entonces, no es un indicador de un incremento en la síntesis, vida media o destrucción tisular de algunas de estas células inmunes (33). Por lo que no descartamos un efecto de la melatonina sobre alguno de estos parámetros.

La MEL es una hormona que se sintetiza y libera siguiendo un patrón fotoperiódico; de igual forma los sistemas inmune y hematopoyético en todos sus componentes, están caracterizados por mostrar un ritmo de frecuencia circadiana en la proliferación y función celular (24,56). Este ritmo posee una alta reproducibilidad en los elementos circulantes, no sólo en el número sino también en la reactividad de las células, y varía predeciblemente como una función del tiempo (24). Muchos de estos ritmos son endógenos y genéticamente determinados; aunque están continuamente modulados por factores ambientales y ajustados por los llamados "sincronizadores" circádicos (entidad capaz de regular e integrar las respuestas a estímulos ambientales, en períodos de tiempo determinados)(1,3). El número de células mononucleares (linfocitos T y B, además de monocitos) en los sujetos sin

manipulación experimental muestra una fluctuación caracterizada por una disminución linfocitaria y monocitaria por la mañana y un incremento por la tarde, con un pico a las 02:00 hrs. (4,56). También se mostraron ritmos circádicos similares en la concentración de linfocitos sanguíneos en el hombre y ratón; además en el hombre también se han descrito ritmos para los eosinófilos y neutrófilos. Toda esta información muestra que la MEL en el organismo es sintetizada en sincronía con las células inmunes. Los ritmos y sus interacciones funcionales determinan la respuesta del organismo a estímulos internos y externos. Una modificación en estos ritmos puede alterar la integridad anatómica y fisiológica del individuo (1,3).

En nuestro estudio observamos que la MEL, no modifica la concentración total de leucocitos, lo que sugeriría que la pineal no modula el ritmo circadiano de estas células en la sangre. Sin embargo, en nuestro diseño experimental sólo aplicamos esta neurohormona en un horario vespertino. Por tal razón para concluir una integración de esta glándula sobre el ritmo circadiano de estas células; sería necesario incrementar los grupos experimentales, para realizar aplicaciones en varios horarios y tomas de muestra sanguínea también en otros horarios. Esta posibilidad deberá ser implicada en futuros estudios antes de concluir una participación de la pineal de esa índole.

Aunque, la administración de MEL no alteró la concentración total de las células sanguíneas blancas, sí modificó la cuenta diferencial. Así, observamos que el porcentaje de linfocitos disminuyó con la administración de MEL exógena (2.5 ó 10.0

mg/kg de peso). Además con las mismas dosis de MEL utilizadas, observamos un incremento en el porcentaje de neutrófilos de MEL utilizada, se observó un incremento en porcentaje de neutrófilos (gráfica 5), una disminución en el porcentaje de monocitos y de eosinófilos, sólo a los días cuarto y décimoprimeros con 10 mg/kg de MEL.

Tales resultados indican una sensibilidad importante de las células inmunes localizadas en la sangre hacia las acciones de las hormonas de la pineal. Además en nuestros resultados observamos que la pinealectomía y falsa pinealectomía disminuyen el porcentaje de linfocitos y eosinófilos, incrementa en forma significativa el porcentaje de neutrófilos y monocitos, cual es otro fuerte indicio de la existencia de una mayor sensibilidad de las células inmunes a los efectos de la pineal.

La finalidad de realizar una pinealectomía consistió en reducir las concentraciones endógenas de MEL. Por esta razón, esperabamos que los efectos encontrados en los sujetos pinealectomizados fuesen opuestos a los observados en los sujetos que recibieron varias administraciones de MEL. Sin embargo, con excepción del número de monocitos en donde observamos un antagonismo total, las acciones de la MEL y la pinealectomía fueron similares en todas las observaciones realizadas. Estos efectos observados por la administración de MEL o de la pinealectomía, son difíciles de catalogar dentro de un efecto inmunosupresor o inmunoestimulante. En otras palabras el resultado inmunológico de incrementar alguna célula inmune dentro de la sangre, es muy difícil de predecir. Principalmente, porque estas células sólo

utilizan la sangre como un medio de transporte; por lo que una concentración elevada de las mismas en sangre, podría significar un incremento de células activas (efecto inmunoestimulador); pero también una reducción de las células que abandonan la circulación para efectuar una acción inmunológica (efecto inmunosupresor). Por esta misma situación no es posible determinar un antagonismo o sinergismo funcional inmunológico en relación a los efectos provocados por la MEL y la pinealectomía (9,38).

La MEL, se postuló como un "inmunomodulador" con base en los resultados de estudios que utilizaron varios modelos experimentales. Por ejemplo al administrar fármacos como el propanolol (PRO, un antagonista beta-adrenérgico que bloquea la síntesis de MEL, y el fármaco p-Cloro-fenilalanina (p-CPA, inhibidor de la síntesis de indoles) a una hora determinada del día, reducen el título de anticuerpos en la sangre en presencia de un antígeno T dependiente; efecto que es bloqueado por la administración de MEL en un horario vespertino, esto no sucede si la administración de MEL se hace en la mañana (46,47). Así, la MEL exógena es capaz de corregir la depresión inmunológica causada por la pinealectomía farmacológica (PRO y pCPA).

Estos y otros estudios (33,55), muestran las acciones de la MEL sobre la producción de anticuerpos por los linfocitos en presencia de un antígeno T dependiente. Sin embargo se desconoce si este mismo efecto ocurre en ausencia de este antígeno T; es decir en animales no inmunocomprometidos. Los datos observados en nuestro modelo experimental muestran que la melatonina tiene

acciones sobre la concentración de linfocitos en animales que no están inmunocomprometidos. Si estos efectos representan una mayor o menor actividad inmunológica es algo que no es posible dilucidar con nuestros resultados. Los linfocitos son células que se derivan de otras células pluripotenciales hematopoyéticas de la médula ósea. Una vez maduras, estas penetran continuamente hacia y del sistema circulatorio a los órganos linfoides lo que provoca una circulación constante a través de los tejidos. Por lo tanto una modificación en su concentración sanguínea, como la provocada por la MEL implicaría una migración aumentada hacia los tejidos para su diferenciación y posterior función.

Dentro de la serie leucocitaria, además de los linfocitos, existen los granulocitos, los cuales incluyen neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Estas células, sobre todo los neutrófilos, son de gran interés, ya que participan activamente en lo que se conoce como la "primera línea de defensa del organismo", básicamente por su propiedad para actuar como fagocitos. En nuestro estudio encontramos que la administración de MEL provocó un aumento en el porcentaje de neutrófilos en la circulación. Esto indica que estas células también son influenciadas por esta hormona. Si esto representa una acción sobre un patrón cíclico es algo aún por determinarse. Estos hallazgos coinciden con los resultados de algunos estudios (13,24); los cuales muestran que existe una máxima concentración en la proliferación de unidades formadoras de colonias para neutrófilos y macrófagos (CFU-GM), la cual está sincronizada con el pico de MEL (24,42). También se mostró que la disminución en la

concentración de esta hormona, provocada por la pinealectomía quirúrgica o farmacológica, afectaba marcadamente la proliferación de progenitores de médula ósea dirigidos a la formación de granulocitos y macrófagos (42).

Entonces puede pensarse que esta interacción entre MEL y CFU-GM, puede dar lugar a un aumento en la concentración de neutrófilos, como observamos en el presente estudio.

La disminución de linfocitos y eosinófilos en sangre observada en el presente trabajo puede relacionarse con el aumento de neutrófilos, en el sentido de que el porcentaje de cada una de estas células en sangre es diferente; mientras que los neutrófilos se encuentran en mayor proporción los eosinófilos y los linfocitos deben estar en menor cantidad, entonces si la MEL provoca un aumento de un tipo celular, resultaría lógico pensar que las otras disminuyan.

Estos resultados sugieren que la liberación circadiana de MEL puede determinar directamente el proceso de síntesis y liberación de las células inmunes; lo que resultaría una relación muy estrecha entre la GP, la médula ósea y el sistema inmune. Por otra parte hemos encontrado que la administración de MEL a las tres dosis empleadas (2.5, 5.0 ó 10.0 mg/kg de peso) provocó una disminución de Hb. El efecto sobre este parámetro señala una relación entre la MEL y los Glóbulos Rojos que hasta el momento no ha sido documentada. Por lo tanto desconocemos el posible mecanismo de acción mediante el cual la MEL provoca dicho efecto. Este efecto el cual fue dependiente de la dosis, no se asoció con algún cambio significativo en el

hematócrito, lo que indica una disminución en la concentración globular media de hemoglobina. Esto sugiere una acción de la MEL sobre los sistemas hematopoyéticos de la médula ósea. Es necesario, sin embargo, realizar otros estudios encaminados a describir estos efectos con mayor profundidad.

Autores como Milcu y Pitis encontraron que la administración de extractos de pineal durante tiempos prolongados, originaba un incremento en el peso total del timo; el cual se acompañaba de hiperplasia en ambas zonas, cortical y medular (19). Veinte años después, se mostró que la pinealectomía neonatal en ratones provocaba una disminución en la respuesta inmune, expresada como una reducción en la producción de anticuerpos. Recientemente se descubrió que los animales pinealectomizados muestran una atrofia de la corteza del timo y de la pulpa blanca del bazo (59). Sugiriéndose una acción directa de la GP sobre los tejidos productores de células inmunes. En el presente trabajo observamos que la MEL ejerce efectos en los órganos linfoides estudiados, timo, bazo e hígado. Aunque la dirección de estos efectos en el caso del timo son opuestos a los reportados por otros autores. Algunos estudios indican que la involución del timo provocada por lesiones en el área hipotalámica anterior (9,35) y por el estrés (30,41) (mediante inmovilización del animal), es neutralizada por la administración vespertina de MEL, que es antagonizado por un bloqueador de receptores opioides. El aumento del tamaño del timo provocado por la administración de MEL exógena ha sido interpretado como un efecto inmunoestimulador. En estos trabajos se menciona un incremento en el número

de las células de la corteza de timo (19) sin cambios importantes en la medula de la misma glándula. En nuestro estudio observamos un decremento en el peso de la glándula, pero el análisis histológico no mostró algún cambio atrófico o degenerativo en alguna de las dos porciones tímicas. La diferencia básica en cuanto al efecto reportado por otros autores y los presentes estudios, reside en el hecho de que los resultados que muestran un incremento en el tamaño del timo fueron realizados en animales inmunocomprometidos. En ellos la respuesta y grado de sensibilidad del sistema inmune son muy diferentes a los encontrados en animales cuyo sistema inmune no está comprometido (47).

Tanto en animales que recibieron MEL, así como en los Pinealectomizados se generó un incremento del índice somático del bazo respecto a los sujetos controles (Gráfica 10). Este efecto, el cual ha sido reportado por otros autores (59) es un indicio de una acción directa de la MEL sobre este órgano linfóideo. Esta acción puede ser resultado de la estimulación hematopoyética extramedular que resulta de la aplicación de MEL; y que también se observa cuando se modifica el patrón de iluminación ambiental. Aunque en nuestro estudio no observamos un cambio en la cantidad de hematíes en sangre referida como el hematócrito (Gráfica 11 y 12). Por el contrario observamos una disminución significativa en la concentración de hemoglobina. También una diferencia de esta índole puede explicarse por definición en el modelo experimental empleado. Cabe mencionar que el análisis histológico de este órgano no mostró una modificación aparente que pudiese ser resultado de la

administración de MEL o de la pinealectomía. La MEL también mostró efectos sobre el hígado, su acción particular fue un decremento (Gráfica 15) en el índice organosómico lo que se traduce como una disminución en su tamaño. Este efecto puede ser resultado de acciones metabólicas provocadas por esta neurohormona. Por ejemplo su administración provoca producción significativa de la N-acetil-transferasa hepática (56). Estos efectos son de tal intensidad que provocan alteraciones metabólicas sistémicas, situación que no fue observada en nuestros sujetos experimentales (26).

Finalmente los efectos que observamos sobre el índice organosómico de los testículos el cual fue de un incremento, nos indica que la administración de MEL ejerció los efectos farmacológicos característicos. Por lo que nuestro modelo experimental, mostró la respuesta clásica a esta neurohormona. En el hámster, la aplicación de la MEL provoca cambios hipotróficos en este órgano sexual (18,32). Mientras que en la rata el efecto no es necesariamente antigonadotrópico, sino que es en algunas épocas del año el mismo que el de la primavera, los efectos son básicamente gonadotrópicos (32). A pesar del incremento en el tamaño la citoarquitectura del testículo no mostró alguna modificación de su patrón normal. Tomados en su conjunto estos resultados son indicativos de la existencia de una interacción entre la Glándula Pineal y el Sistema Inmune. Estos resultados apoyan una acción inmunomoduladora de la MEL.

Aunque aún el significado fisiológico y patológico de tal interacción es desconocido. Existen todavía muchas preguntas que responden sobre este tópico.

desconocido. Existen todavía muchas preguntas que responden sobre este tópico. Las más vigentes en relación con los efectos de esta hormona sobre las variaciones cíclicas de estas células. También es importante definir el efecto que indoles o incluso otros péptidos de la pineal están jugando en la acción neuromoduladora de esta glándula (1,3,23).

IX Referencias

1. Abo, T. and Kawate, T. Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B and K cell traffic in the peripheral blood. *J.Immunol.* 126:1360-1363, 1980.
2. Ader, R. *Psychoneuroimmunology*, New York:Academic Press, 1981. pp. 540-553.
3. Angeli, A., Gatti, G., Masera, R., Sartori, M.L. and Carignola, R. Chronobiological aspects of neuroendocrine-immune interactions. *Int.J.Neurosci.* 51:341-343, 1990.
4. Aschoff, J. Circadian rhythms: General Features and endocrinological aspects. In: *Endocrine Rhythms*, edited by Krieger, D.T. New York: Raven Press, 1979, p. 1-61.
5. Blalock, J.E. The immune system as a sensory organ. *J.Immunol.* 132:1067-1073, 1984.
6. Boeckmann, D. Morphological investigation of the deep pineal of the rat. *Cell Tissue.Res.* 210:283-294, 1980.
7. Bone, F.J. *Anatomy and Physiology*, Virginia:Reston Inc., 1982. Ed. 2 pp. 522-530.
8. Boranic, M., Pericic, D., Poljak-Blazi, M. and Sverko, V. Suppression of the immune response by drugs interfering with the metabolism of serotonin. *Experientia.* 40:1153-1155, 1984.
9. Cardarelli, N.F. The role of a thymus-pineal axis in an immune mechanism of aging. *J.Theor.Biol.* 145:397-405, 1990.
10. Crowlax, F.W. and Huller, G.J. *The episodic secretion of hormones*, Londres: Churchill Livingstone., 1987. pp. 149-159.
11. Datta, P.C. and King, M.G. Melatonin: effects on brain and behavior. *Neurosci. Biobehav.Rev.* 4:451-458, 1980.
12. DevoIno, L. and Eliseeva, L. 5-Hydroxytryptophan effect on the development of the immune response: IgM and IgG antibodies and resette. *Eur.J.Immunol.*

5:394-399, 1975.

13. Finocchiaro, L.M. and Nahmod, V.E. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem.J.* 280:727-731., 1991.
14. Foley, P.B., Cairncross, K.D. and Foldes, A. Pineal indoles: significance and measurement. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 10:273-293, 1986.
15. Fox, B.H. Impact of Psychoneuroendocrine systems in cancer and immunity. In: *Cancer and Immunity*, edited by NewBerry, B.H. New York: C.J. Hogrfe Inc., 1984, p. 345-367.
16. Fraschini, F., Scaglione, F., Franco, P., Demartini, G., Lucini, V. and Stankov, B. Melatonin and immunity. *Acta Oncol.* 29:775-776, 1990.
17. Ganon, W.F. *Fisiología Médica*, México, D.F.:El Manual Moderno, 1986. Ed. 10 pp. 435-452.
18. Grosse, J., Maywood, E.S., Ebling, F.J. and Hastings, M.H. Testicular regression in pinealectomized Syrian hamsters following infusions of melatonin delivered on non-circadian schedules. *Biol.Reprod.* 49:666-674, 1993.
19. Guerrero, J.M. and Reiter, R.J. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr.Res.* 18:91-113, 1992.
20. Gupta, D. The pineal gland. Its immunomodulatory role. *Adv.Pin.Res.* 4:243-250, 1990.
21. Guyton, A.C. *Fisiología Humana*, México, D.F.:Interamericana., 1991. Ed. 8 pp. 405-530.
22. Hansson, I., Holmdahl, R. and Mattsson, R. Constant darkness enhances autoimmunity to type II collagen and exaggerates development of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *J.Neuroimmunol.* 27:79-84, 1990.
23. Hastings, M.H., Vance, G. and Maywood, E. Some reflections on the phylogeny and function of the pineal. *Experientia.* 45:903-909, 1989.
24. Haus, E., Lakatua, D.J., Swoyer, J. and Sackett-Lundeen, L. Chronobiology in hematology and immunology. *Am.J.Anat.* 168:467-517, 1983.

25. Henry, J.B. *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*, Barcelona.: Salvat Eds., 1988. Ed. 8 pp. 730-765.
26. Houd, R.A., Seo, K.S. and Wurtman, R.J. Rat liver N-acetyltransferase: inhibition by melatonin. *Biochem.Pharmacol.* 25:977-978, 1976.
27. Jay, T. *Fisiología Metabólica y Endócrina*, México,D.F.:Interamericana, 1980. Ed. 3 pp. 61-63.
28. Jensen, D. *Fisiología*, México, D.F.:Interamericana, 1980. Ed. 6 pp. 1126-1128.
29. Kennaway, D.J. and Hugel, H.M. Melatonin binding sites: are they receptors? *Mol.Cell.Endocrinol.* 88:C1-C9, 1992.
30. Khan, R., Daya, S. and Polgieter, B. Evidence for a modulation of the stress response by the pineal gland. *Experientia.* 46:860-862, 1990.
31. Klein, D.C. The Pineal Gland: A model of neuroendocrine regulation. In: *The hypothalamus*, edited by Reichlin, S., Baldessarini, R.J. and Marti, J.B. New York: Raven Press, 1978, p. 303-325.
32. Knovil, E.N. The Physiology of Reproduction. In: *Reproduction*, edited by Becker, J. New York: Raven Press., 1988, p. 1800-1803.
33. Kuci, S., Becker, J., Velt, G., et al. Circadian variations in the immunomodulatory role of the pineal gland. *Neuroendocrinol.Lett.* 10:65-78, 1988.
34. Lapin, V. and Frowein, A. Effects of growing tumours on pineal melatonin levels in male rats. *J.Neural.Transm.* 52:123-136, 1981.
35. Lesnikov, V.A., Korneva, E.A., Dall'Ara, A. and Pierpaoli, W. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging: II. Thyrotropin-releasing hormone and melatonin forestall involution and promote reconstitution of the thymus in anterior hypothalamic area (AHA)-lesioned mice. *Int.J.Neurosci.* 62:141-153, 1992.
36. Maestroni, G.J. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J.Pineal.Res.* 14:1-10, 1993.
37. Maestroni, G.J. and Conti, A. The pineal-immuno-opioid network. Mechanisms and significance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 650:56-59, 1992.

38. Maestroni, G.J., Conti, A. and Pierpaoli, W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J.Neuroimmunol.* 13:19-30, 1986.
39. Maestroni, G.J., Conti, A. and Pierpaoli, W. The pineal gland and the circadian, opiateergic, immunoregulatory role of melatonin. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 496:67-77, 1987.
40. Maestroni, G.J., Conti, A. and Pierpaoli, W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody responses via an opiateergic mechanisms. *Clin.Exp.Immunol.* 68:384-391, 1987.
41. Maestroni, G.J., Conti, A. and Pierpaoli, W. Role of the pineal gland in immunity: III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiateergic mechanism. *Immunol.* 63:465-469, 1988.
42. McNulty, J.A., Relfson, M., Fox, L.M., Kus, L., Handa, R.J. and Schneider, G.B. Circadian analysis of mononuclear cells in the rat following pinealectomy and superior cervical ganglionectomy. *Brain.Behav.Immun.* 4:292-307, 1990.
43. Miale, J.B. Hematología. Medicina del laboratorio. In: , España.: Reverté eds., 1985, p. 1-39.
44. Orta, S., Hernández, B., Cordova, Y. and Benitez, D. Estudio hematológico de la rata Wistar. *Rev.Fac.Med.UNAM.* 32:189-192, 1989.
45. Phillips, J.A. and Howes, K.A. The pineal complex, aggressive behavior and thermoregulation in curly-tailed lizards, *Leloecephalus carinatus*. *Physiol.Behav.* 42:103-108, 1988.
46. Pierpaoli, W. and Maestroni, G.J.M Pharmacologic control of the hormonally modulated immune response. III Prolongation of allogeneic skin graft rejection and prevention of runt disease by a combination of drugs acting on neuroendocrine functions. *J.Immunol.* 120:1600-1604, 1978.
47. Pierpaoli, W. and Maestroni, G.J.M. Pharmacologic control of the hormonally modulated immune response. II Blockade of antibody production by a combination of drugs acting on neuroendocrine functions. Its prevention by gonadotropins and corticotrophin. *Immunol.* 34:419-430, 1978.

48. Plotnikoff, N.P., Faith, B.E. and Murgo, A.J. Enkephalins and Endorphins. In: *Stress and the Immune System*, edited by Good, R.A. New York.: Plenum Press, 1986, p. 123-145.
49. Rappaport, S.I. *Introducción a la Hematología*, España:Salvat Eds., 1988. Ed. 2 pp. 218-226.
50. Reiter, R.J. Pineal control of a seasonal reproductive rhythm in male golden hamster exposed to natural day light and temperature. *Endocrinol.* 92:423-443, 1973.
51. Reiter, R.J. Anatomy of the pineal gland of the Mammals. In: *The Pineal*, edited by Reiter, R.J. Chicago.: Eden Press., 1981, p. 14-40.
52. Rellein, R. *The Pineal Gland*, Chicago.:Blomedical Press., 1983. pp. 1-311.
53. Roitt, I. *Essential Immunology*, Ney York:Scientific Publications., 1991. Ed. 7 pp. 231-265.
54. Romijn, H.J. The pineal, a tranquillizing organ? *Life.Sci.* 23:2257-2273, 1978.
55. Smith, E.M. and Blalock, J.E. A molecular basis for interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Intern.J.Neurosci.* 38:455-464, 1988.
56. Smith, J.A., Helliwell, P.S., Isdale, A., Astbury, C., Padwick, D.J. and Bird, H.A. Human nocturnal blood melatonin and liver acetylation status. *J.Pineal.Res.* 10:14-17, 1991.
57. Steel, R.G.D. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*, México,D.F.:McGraw Hill., 1986. Ed. 2 pp. 123-134.
58. Sugden, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 45:922-932, 1989.
59. Vaughan, M.K., Hubbard, G.B., Champney, T.H., Vaughan, G.M., Little, J.C. and Reiter, R.J. Splenic hypertrophy and extramedullary hematopoiesis induced in male Syrian hamsters by short photoperiod or melatonin injections and reversed by melatonin pellets or pinealectomy. *Am.J.Anat.* 179:131-136, 1987.
60. Veck, M. Innervation of the pineal. In: *Innervationm of vertebrate pineal*, edited

by Kappers, J. New York: Raven Press., 1979, p. 48-88.

61. Williams, J.W. and Beutler, E. *Hematología*, España.:Mars Ed., 1983. Ed. 3 pp. 843-856.
62. Wintay, F.R.B. *Fisiología Humana*, Barcelona.:Jims ed., 1970. pp. 45-65.