

00524  
184



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONCENTRACION  
DE PEPTIDOS OPIOIDES EN CELULAS DEL SISTEMA INMUNE  
DE LA RATA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Marcela Valdes Tovar

FECHA: 20-febrero-2003

FIRMA: [Firma]

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
MARCELA VALDES TOVAR



MÉXICO D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2003

A



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. Marina Gavilanes Ruiz
Vocal	Dr. Fernando García Tarnayo
Secretario	Dr. Miguel Asai Camacho
1er. Suplente	Dr. Arturo Víctor Rosales Olivares
2o. Suplente	Dr. Alberto Gómez Gutiérrez

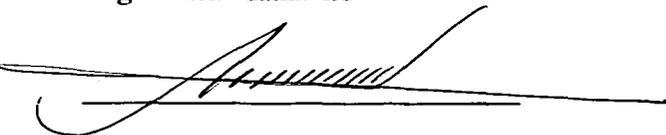
**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz". Laboratorio de Análisis Químicos. División de Investigaciones en Neurociencias.

Calzada México-Xochimilco #101 Col. Ejidos de Huipulco. CP.14370  
Edificio Investigaciones en Neurociencias 1er. Piso.

**Nombre completo y firma del asesor del tema:**

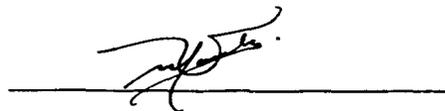
Miguel Asai Camacho



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel Asai Camacho', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the right.

**Nombre completo y firma de la sustentante:**

Marcela Valdés Tovar



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marcela Valdés Tovar', is written over a horizontal line. The signature is cursive and somewhat compact.

**GRACIAS**

**A mis padres, por la vida.**

**Y a la vida, por darme todo y a todos los que me hacen feliz.**

**Marcela.**

**ÍNDICE**

<b>Capítulo I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 La melatonina: su síntesis.....	3
1.2 Mecanismos de acción de la melatonina.....	7
1.3 Metabolismo y excreción de la melatonina.....	8
1.4 Principales funciones de la melatonina.....	8
1.5 Anatomía y fisiología del sistema linfoide.....	9
1.6 Efectos de la melatonina sobre el sistema inmune.....	16
1.7 Los péptidos opioides: su síntesis.....	19
1.8 Receptores opioides.....	22
1.9 Los péptidos opioides en el sistema inmune.....	23
1.10 Hipótesis.....	25
1.11 Objetivo.....	25
<b>Capítulo II. Materiales y Métodos.....</b>	<b>26</b>
2.1 Diseño experimental.....	26
2.2 Animales.....	28
2.3 Disección de los órganos linfoides.....	29
2.4 Obtención de extractos de timo y bazo completos.....	30
2.5 Obtención de suspensiones celulares a partir de bazo y timo de rata para posterior separación de células mononucleares.....	31
2.6 Separación de células mononucleares por centrifugación con Ficoll-Paque.....	31
2.7 Obtención de extractos de células mononucleares de timo y bazo de rata.....	33
2.8 Determinación de proteínas.....	33
2.9 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100.....	34
2.10 Radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de las encefalinas.....	35
2.11 Análisis estadístico.....	41

---

Capítulo III. Resultados.....	42
3.1 Curva patrón para la determinación de proteínas mediante la técnica de Lowry.....	42
3.2 Caracterización de la columna de Sephadex G-100.....	43
3.3 Curva patrón para la cuantificación de encefalinas mediante radioinmunoensayo.....	44
3.4 Cuantificación de Met-encefalina en extractos concentrados de células mononucleares del bazo y el timo de la rata.....	45
3.5 Cuantificación de Leu-encefalina y Synencefalina en las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100.....	46
3.6 Cuantificación de encefalinas en el timo y en el bazo de la rata.....	50
Capítulo IV. Discusión.....	58
Capítulo V. Bibliografía.....	65
Apéndice I.....	75
Glosario.....	80
Lista de abreviaturas.....	83

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos estamos sujetos a las condiciones del medio ambiente que nos rodea. Uno de los factores ambientales que está presente de manera regular y predecible es el ciclo de luz-oscuridad. Las diversas civilizaciones de todas las épocas, han establecido una relación cosmogónica con el sol, la luz y las estaciones del año. La mayoría de las culturas concibe deidades que representan al Sol y atribuyen a éstas propiedades tales como la sabiduría, la iluminación interior y el conocimiento. La filosofía de la civilización hindú del año 2000 a.C.<sup>(7)</sup> describe un tercer ojo como un centro psíquico situado entre las cejas, en el que se manifiestan y proyectan las energías cósmicas. Anatómicamente, la posición de este tercer ojo corresponde a la ubicación de la glándula pineal <sup>(26)</sup>. Por ser una estructura sin par ubicada en el centro de un cerebro simétrico, los griegos del siglo IV a.C. y posteriormente René Descartes a mediados del siglo XVII, consideraron a la pineal, el lugar en donde residía el alma <sup>(7)</sup>.

Esta glándula está presente desde hace 400 millones de años en la escala filogenética de los vertebrados<sup>(26)</sup>. A través de la evolución, la glándula pineal ha cambiado su ubicación desde la superficie del hueso parietal, hasta introducirse y localizarse justo bajo el techo del tercer ventrículo cerebral. Asimismo, en los mamíferos, la pineal ha perdido su capacidad de recibir la luz directamente. Dicho carácter de fotorreceptor directo persiste en el órgano parapineal, que se conoce como el tercer ojo de los anfibios y los reptiles. La glándula pineal junto con el órgano parapineal constituyen el complejo pineal, que está presente en los vertebrados con excepción de los mamíferos y las aves<sup>(26)</sup>.

La luz que recibimos del sol tiene diversos efectos sobre el organismo animal, entre ellos, es de particular importancia el control de los ritmos biológicos <sup>(67, 93)</sup>. La duración del periodo de luz y de oscuridad, la intensidad de la luz y la temperatura del ambiente son factores que indican al organismo en qué hora del día y en qué estación del año se encuentra. Funciones biológicas como el sueño, la temperatura corporal, el consumo de alimentos y agua, la reproducción y la actividad física se presentan de manera cíclica, con

un ritmo establecido para las diferentes especies animales<sup>(11)</sup>. Diversas hormonas y enzimas, y en consecuencia las funciones en las que están involucradas, están sometidas a una ritmicidad circadiana y/o circanual. Es reconocido que el control de los ritmos biológicos está mediado por la principal hormona producida y secretada por la glándula pineal: la melatonina <sup>(11, 67, 93)</sup>.

La producción y secreción de melatonina está sujeta a un ritmo circadiano, cuyo nivel máximo ocurre aproximadamente a la mitad de la fase de oscuridad, en diferentes especies animales incluyendo al hombre <sup>(11, 67)</sup>.

Se ha demostrado que la fisiología de la melatonina está involucrada en la sincronización de la actividad celular con el fotoperiodo, y a su vez en la regulación de los diversos sistemas del organismo. Así, es reconocida su participación en el sueño, en la reproducción, en la hibernación, en la termorregulación, y de manera muy particular, en el sistema inmune <sup>(67)</sup>.

El sistema inmune constituye la defensa que posee el organismo contra los innumerables antígenos que entran en contacto con él. En la mayoría de los casos, con excepción de la hipersensibilidad y de la autoinmunidad que van en detrimento de la salud, la respuesta del sistema inmune nos permite sobrevivir ante la amenaza de diversas enfermedades infecciosas o neoplásicas, así como de diversas toxinas que pueden causar la muerte.

La comunidad científica ha reconocido la existencia funcional del eje o sistema neuro-endocrino-inmunológico, en el que la fisiología de dichos sistemas ya no se puede concebir de manera aislada e individual, sino como una red en la que existe una comunicación compleja que a su vez deriva en su regulación. La investigación biomédica básica se ha interesado en dilucidar los mecanismos que están involucrados con la fisiología integral del eje neuro-endocrino-inmunológico y su participación en diversas patologías que aquejan al ser humano como por ejemplo el cáncer, el SIDA y las enfermedades neurodegenerativas.

Entre los mensajeros químicos que actúan como mediadores en la comunicación bidireccional entre el Sistema Nervioso Central (SNC) y el sistema inmune, se encuentra el sistema de opioides endógenos <sup>(87)</sup>. Las células de ambos sistemas poseen la maquinaria bioquímica necesaria para comunicarse a través de los péptidos opioides y de las citocinas. Evidencias experimentales de nuestro grupo de trabajo sugieren que en el SNC, la síntesis y la liberación de los péptidos opioides está controlada por la melatonina <sup>(4)</sup>.

Dada la ubicuidad de la melatonina y las evidencias de su acción inmunomoduladora, así como la capacidad de las células del sistema inmune de producir péptidos opioides que podrían ejercer su influencia de manera autocrina y/o paracrina sobre las funciones de este sistema, el interés particular de este trabajo de investigación es estudiar el efecto de la melatonina sobre la concentración de péptidos opioides en órganos representativos del sistema inmune de la rata.

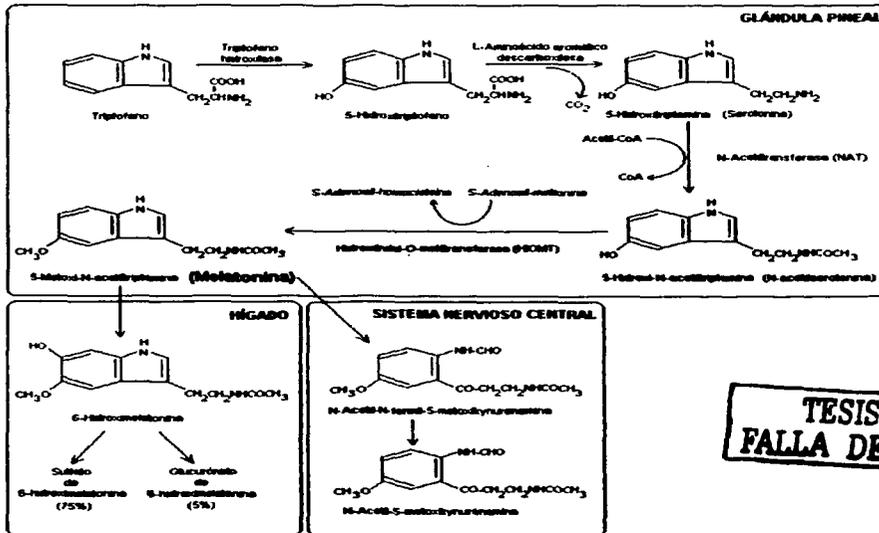
### 1.1 La melatonina: su síntesis.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona producida y secretada principalmente por la glándula pineal en los vertebrados. En 1958, el dermatólogo Aarón B. Lerner, estaba interesado en estudiar los cambios en la pigmentación de la piel de los anfibios y de los peces <sup>(36)</sup>. Cuando la intensidad de la luz disminuye, los melanóforos de estos animales se contraen causando un aclaramiento de la piel. En presencia de luz ocurre el efecto contrario, es decir, el oscurecimiento de la piel como una respuesta adaptativa útil para proteger los órganos internos de la radiación del sol <sup>(85)</sup>. En su búsqueda por encontrar la molécula responsable de estos cambios de pigmentación, con la idea de encontrar una cura para el vitiligo, Lerner aisló por primera vez la melatonina a partir de glándulas pineales de bovino <sup>(36)</sup>. Por su acción sobre las células que producen melanina y por tratarse de un compuesto derivado de la serotonina la nombró melatonina (*mela*: melanina, *tonina*: proveniente de la serotonina).

La melatonina (MEL) se considera una hormona ubicua. Se ha demostrado su producción en diversos órganos y tejidos de los vertebrados como la retina, el intestino

delgado, los leucocitos mononucleares, las plaquetas, los eritrocitos y de particular importancia en los roedores en la glándula de Harder<sup>(26)</sup>. Además, esta indolamina está presente en organismos unicelulares procariontes y eucariontes, en varias familias de algas, en plantas angiospermas y en invertebrados. En varios de estos organismos, entre los que destaca la especie *Euglena gracilis*, se ha encontrado que la concentración de MEL es mayor, en varios órdenes de magnitud, que en la circulación de los vertebrados<sup>(27)</sup>. Estas evidencias indican que la MEL cumple con diversas funciones vitales en organismos de características muy distintas. Entre las principales funciones que atribuibles a la MEL están la protección celular frente a los procesos oxidativos inducidos por la luz visible y UV, así como el ser un mensajero químico que indica cuáles son las condiciones de luz y de temperatura del medio<sup>(27)</sup>.

La ruta biosintética y metabólica de la MEL se muestra a continuación:



**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

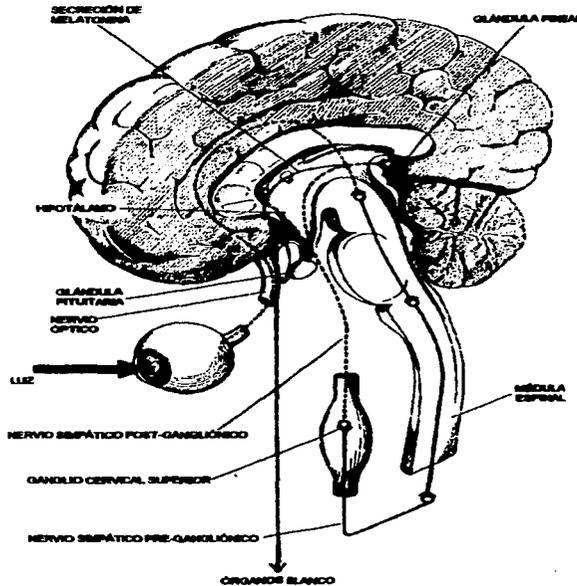
Figura 1.1 Ruta de síntesis y metabolismo de la melatonina. [Adaptado de CARDINALI D.P., *Endocrine Reviews* (2):327-346 (1981).]

La MEL se sintetiza a partir de la serotonina (5-hidroxitriptamina) por acción secuencial de las enzimas N-acetiltransferasa (NAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) que se encuentran en la glándula pineal <sup>(11)</sup>.

Cuando se capta la luz a través del tracto retino-hipotalámico, se envía una señal al núcleo supraquiasmático (NSQ), que tiene la función de ser un reloj biológico (Figura 1.2). El NSQ, ubicado en el hipotálamo anterior, proyecta fibras nerviosas eferentes hacia la médula espinal. Las neuronas de la médula espinal inervan los ganglios cervicales superiores (GCS) y a partir de éstos se proyectan las neuronas postgangliónicas simpáticas que inervan la glándula pineal (Figura 1.3). Así, el NSQ transmite el estímulo hacia la pineal para la producción de MEL cuando empieza la fase de oscuridad <sup>(67)</sup>.



**Figura 1.2** La luz es la señal del medio ambiente que se capta a través de la retina, viaja por el nervio óptico y llega al núcleo supraquiasmático ubicado en la región anterior del hipotálamo. A partir de este núcleo, se envía la señal de manera indirecta hasta la glándula pineal para inhibir la producción de melatonina durante el día. [Adaptado de YOUNG M.W., *Sci Am* 282 (3):46-53 (2000)]



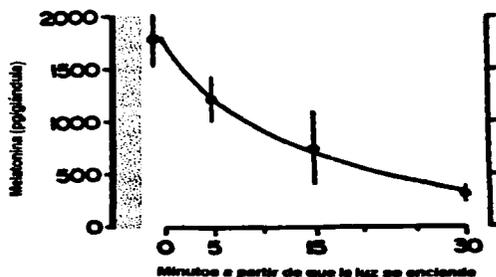
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Figura 1.3** La vía neuronal que sigue la señal de luz captada por la retina incluye el nervio óptico, el núcleo supraquiasmático, la médula espinal, el nervio simpático pre-gangliónico, el ganglio cervical superior, el nervio simpático post-gangliónico y finalmente la glándula pineal. [Adaptado de WURTMAN R.J., *Sci Am* 233 (1):68-77 (1975)].

Las terminales post-gangliónicas simpáticas que inervan la glándula pineal liberan noradrenalina (NA). Este neurotransmisor se une a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana del pinealocito, y provoca un incremento en los niveles intracelulares de adenosina-monofosfato cíclico (AMPC). Este segundo mensajero activa a la NAT, que actúa sobre la serotonina produciendo N-acetilserotonina. Esta molécula es transformada a melatonina por acción de la HIOMT. La unión de NA a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos,

que tiene como consecuencia un incremento en la concentración intracelular de calcio, favorece la respuesta a la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos <sup>(21)</sup>.

En los mamíferos, la actividad enzimática de la N-acetiltransferasa, y en consecuencia la producción y secreción de MEL presentan un ritmo circádico, en el que los niveles máximos se presentan en la noche independientemente del patrón de actividad de la especie <sup>(11, 67)</sup>. La exposición a la luz visible es un factor ambiental que inhibe inmediatamente los mecanismos enzimáticos requeridos para la producción de MEL. La intensidad y la longitud de onda de la luz requerida para esta inhibición varía según la especie, y es reconocido que los animales de actividad nocturna son más sensibles a estos cambios <sup>(67)</sup>.



**Figura 1.4** La exposición a la luz durante la noche, incluso por un lapso de un segundo, produce una disminución drástica del nivel de melatonina en la glándula pineal de la rata. A los 10 minutos, el contenido de la hormona disminuye en un 50% y a los 20-30 minutos se alcanza la concentración que prevalece durante el día. [Adaptado de REITER R.J., *Experientia* 49:654-664 (1993).]

## 1.2 Mecanismos de acción de la melatonina.

Los efectos de la MEL están mediados por dos mecanismos de acción principalmente:

**1.2.1 Unión a receptores ubicados en la membrana plasmática o en el núcleo celular:** Se han caracterizado dos subtipos de receptores de membrana: MT1 ( $Mel_{1a}$ ) y MT2 ( $Mel_{1b}$ ), que pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. La transducción de la señal de la unión al receptor MT1 incluye la inhibición de la adenilato ciclasa y la activación de la fosfolipasa C beta. De igual manera, la unión al receptor MT2

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

produce inhibición de la adenilato ciclasa así como de la ruta de la guanilato ciclasa <sup>(88)</sup>. Por otra parte, la MEL es un ligando natural de los receptores retinoidales Z (RZR alfa, RZR beta) localizados en el núcleo celular. Se ha documentado la presencia de este tipo de receptores en el cerebro y en órganos periféricos <sup>(81)</sup>.

**1.2.2 Difusión libre a través de la membrana plasmática:** Por su carácter lipofílico, esta hormona atraviesa libremente la membrana plasmática y modula la actividad de proteínas de unión a calcio como la calmodulina (CaM) y la proteína cinasa C (PKC). Este mecanismo de acción de la MEL está involucrado en la organización estructural del citoesqueleto, que a su vez se asocia a funciones celulares básicas tales como el mantenimiento de la morfología celular, la división celular, la locomoción, la endocitosis y la exocitosis, el proceso de transporte axónico y la liberación de los neurotransmisores <sup>(89)</sup>.

### **1.3 Metabolismo y excreción de la melatonina.**

La MEL se biotransforma principalmente en el hígado para su posterior excreción por la vía urinaria. La primera transformación enzimática que ocurre es la hidroxilación en la posición 6 del anillo indólico. Posteriormente tiene lugar una reacción de conjugación con un grupo sulfato o un grupo glucuronato, lo que resulta en los siguientes compuestos: la 6-sulfatoximelatonina y el glucurónido de la 6-hidroximelatonina. En el cerebro se forman los metabolitos N-acetil-N-formil-5-metoxikinurenamina y N-acetil-5-metoxikinurenamina <sup>(7)</sup>. Ver figura 1.1.

### **1.4 Principales funciones de la melatonina.**

La glándula pineal funciona como un transductor fotoneuroendocrino, que a través de la MEL, es capaz de sincronizar la actividad celular con el fotoperiodo. En la mayoría de las especies de los mamíferos, la MEL regula los ciclos de reproducción, alimentación, termorregulación e hibernación de acuerdo a las estaciones del año <sup>(85)</sup>. Además, se ha sugerido que la melatonina está implicada en la regulación de la excitabilidad del sistema

nervioso central (SNC), al modificar los patrones de síntesis, liberación y recaptura de diversos neurotransmisores (7, 21). Por otra parte, por su naturaleza química, la MEL es capaz de secuestrar radicales libres derivados del oxígeno, o bien de estimular la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (69). De este modo, la MEL actúa directa o indirectamente como protector intracelular ante el estrés oxidativo que se presenta durante el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas (7, 68, 69).

Al regular la excitabilidad del SNC, la MEL puede ser responsable de efectos tales como la reducción de la actividad locomotora, el aumento del umbral del dolor, el efecto anti-convulsivo y en la prevención de alteraciones conductuales y estados de depresión (21). Existen evidencias de que la secreción de la MEL está alterada (disminuida o no sincronizada) y que la administración de la misma tiene eficacia terapéutica en diversos trastornos del sueño, en enfermedades psiquiátricas como son la depresión mayor, la esquizofrenia, el trastorno obsesivo-compulsivo, y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y la epilepsia (7).

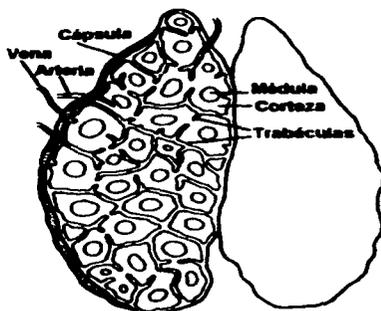
Actualmente es reconocida la comunicación bidireccional que existe entre el SNC y el sistema inmune, que además está sujeto a la influencia de diversas hormonas. Evidencias experimentales indican que la MEL está involucrada en la regulación de la respuesta inmune humoral y celular, así como en los mecanismos de inmunidad innata. Con base en esta información, diversos grupos de investigación han propuesto la aplicación terapéutica de esta hormona en pacientes con cáncer, o bien su inhibición en el caso de enfermedades autoinmunes. Por tal motivo, resulta de particular importancia destacar la función inmunomoduladora que ejerce la MEL.

## 1.5 Anatomía y fisiología del sistema linfóide

Las células que participan en la respuesta inmune se organizan en un conjunto de órganos y tejidos que se denomina sistema linfóide. Este sistema está conformado por

órganos primarios o centrales, y secundarios o periféricos. En los órganos linfoides primarios, que son la médula ósea y el timo, se lleva a cabo la linfopoyesis, es decir, la maduración y diferenciación de las células inmunocompetentes a partir de células precursoras pluripotenciales. Los órganos linfoides secundarios son el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas (mucous associated lymphoid tissue: MALT). En estos órganos se generan las células efectoras de las respuestas humoral y celular, así como las células de memoria <sup>(71)</sup>.

El timo es un órgano bilobulado que se localiza en la cavidad torácica, por encima del extremo superior del corazón. Los dos lóbulos se dividen a su vez en lobulillos separados por tabiques de tejido conjuntivo denominados trabéculas. Los timocitos se distribuyen formando un gradiente de diferenciación desde la corteza tímica, en donde se ubican las células T inmaduras, hasta la médula tímica en donde se encuentran las células T maduras y funcionalmente competentes <sup>(5, 71)</sup>. En los lobulillos tímicos existen tres tipos de células epiteliales (nodrizas, corticales y medulares), así como células interdigitadas y macrófagos. Estas células expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex: MHC) que contribuyen a la diferenciación y a la selección de los linfocitos T que son tolerantes a los autoantígenos <sup>(71)</sup>. El timo produce hormonas peptídicas, entre ellas la timulina, la timopoyetina, la timosina y el factor humoral tímico, que contribuyen a la maduración de los linfocitos T <sup>(83)</sup>. En los mamíferos, el timo involuciona con la edad. Esta involución comienza desde la corteza y está relacionada con la sensibilidad de las células frente a los corticosteroides. Por esta razón, los procesos que implican un aumento de los esteroides, como son la pubertad, el embarazo y el estrés, contribuyen a que aumente la tasa de linfocitos T que mueren por apoptosis dentro del timo <sup>(71)</sup>.

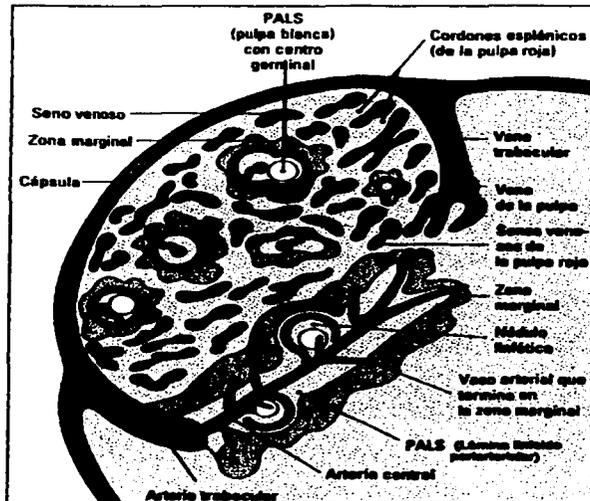


**Figura 1.5** Organización tisular del bazo.  
 [Adaptado de AUSTYN J.M., WOOD K.J., Principles of Cellular and Molecular Immunology; Oxford University Press; Hong Kong, pág. 55-61 (1993)]

TESIS 2021  
 FALLA DE ORIGEN

El bazo se localiza en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, por debajo del diafragma. La estructura de este órgano incluye una cápsula constituida por fibras de colágeno que penetran al interior formando trabéculas que sirven de sostén al parénquima esplénico. El parénquima está constituido por dos tipos de tejido: la pulpa roja y la pulpa blanca. La pulpa roja se compone de tejido reticular organizado en senos venosos y cordones esplénicos; en ella se destruyen las plaquetas y los eritrocitos viejos. En caso necesario, la pulpa roja es capaz de generar eritrocitos, granulocitos y plaquetas que pueden salir rápidamente a la circulación <sup>(60, 71)</sup>. La pulpa blanca está compuesta por tejido linfoide que se organiza alrededor de una arteriola central. A esta organización se le denomina lámina linfoide periarteriolar (periarteriolar lymphatic sheath: PALS). En la PALS, las células T se encuentran en la zona que circunda inmediatamente la arteriola central y las células B se ubican en folículos primarios o secundarios. Los folículos secundarios poseen un centro germinal en donde se encuentran células dendríticas y macrófagos. El área en torno a la PALS se denomina zona marginal y en ella se encuentran macrófagos especializados, que junto con las células dendríticas foliculares

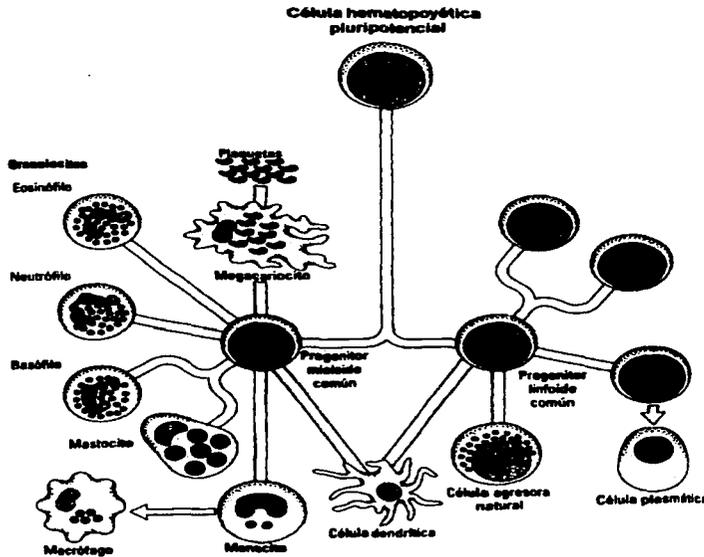
tienen la función de presentar los antígenos a las células B. En la zona de células T se encuentran células interdigitadas que presentan los antígenos en forma de péptidos asociados a moléculas MHC <sup>(5, 71)</sup>. La sangre penetra en el tejido esplénico a través de la arteria trabecular, que posteriormente se ramifica y forma las arteriolas centrales, rodeadas por la PALS, que finalmente se abren en los cordones de la pulpa roja. En ésta, las plaquetas y los eritrocitos anormales, lesionados o envejecidos, así como microorganismos que puedan estar en la sangre son identificados y fagocitados, mientras que las células sanguíneas en buen estado cruzan las paredes de los senos venosos, los cuales drenan la sangre hacia las venas de la pulpa y luego hacia las venas trabeculares. Existe también una red de vasos linfáticos eferentes que se generan en la pulpa blanca y que se entrecruzan creando un sistema de comunicación celular entre las PALS que están anatómicamente separadas <sup>(60)</sup>.



TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN

**Figura 1.6** Organización tisular del bazo. [Adaptado de ROITT I.M., BROSTOFF J., MALE D.K., *Inmunología*; 3a. edición; Ediciones Científicas y Técnicas S.A.; España, Capítulo 3. (1994)]

Todas las células del sistema inmune se generan en la médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas (hematopoietic stem cell: HSC), que se diferencian para dar lugar a los precursores de dos linajes celulares principales: el mieloide y el linfoide. El progenitor mieloide da lugar a las plaquetas, los granulocitos polimorfonucleares (basófilos, eosinófilos, neutrófilos), a los mastocitos (células cebadas) y a los monocitos, que más tarde se diferenciarán a macrófagos. De la célula progenitora linfoide se derivan los linfocitos T, los linfocitos B y probablemente las células asesinas naturales (natural killer: NK) <sup>(83)</sup>. Las células dendríticas pueden derivarse tanto del progenitor mieloide como del progenitor linfoide <sup>(12)</sup>.



TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**Figura 1.7** Origen de las células del sistema inmune. [Adaptado de ROITT I.M., BROSTOFF J., MALE D.K., *Inmunología*; 3a. edición; Ediciones Científicas y Técnicas S.A.; España, Capítulo 2. (1994).]

Los neutrófilos y los monocitos-macrófagos, son fagocitos por naturaleza. Los neutrófilos se encuentran principalmente en la circulación y son atraídos a zonas particulares a través de factores quimiotácticos que se liberan cuando existe una lesión o una infección. Como respuesta a estos estímulos quimiotácticos, los neutrófilos se pueden adherir a las células endoteliales y atravesar las paredes capilares por un proceso conocido como diapedesis. Los gránulos que se encuentran en el interior de los neutrófilos contienen enzimas que degradan a los microorganismos que son fagocitados <sup>(71)</sup>.

Los monocitos están en circulación durante aproximadamente un día, después del cual se ubican en diferentes órganos y se diferencian para convertirse en macrófagos e incorporarse a los distintos tejidos, en los que conforman lo que se conoce como sistema fagocitario mononuclear <sup>(71, 83)</sup>. Según el órgano en el que residen, los macrófagos reciben nombres particulares, por ejemplo: células de Kupffer en el hígado, microglia en el cerebro, osteoclastos en los huesos, células mesangiales glomerulares en el riñón, células de Langerhans en la piel, entre otros <sup>(71, 83)</sup>. Al recibir estímulos como el contacto directo con microorganismos, partículas inertes, algunos componentes del sistema del complemento, o el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de algunas bacterias, los macrófagos llevan a cabo el proceso de activación, que incluye un aumento en su metabolismo, en su motilidad y en su actividad fagocítica. Por su tamaño, los macrófagos activados pueden fagocitar células lesionadas o envejecidas y en general, blancos más grandes que los fagocitados por los neutrófilos <sup>(71)</sup>. En el sitio de una lesión, los macrófagos, los granulocitos, y las células cebadas liberan sustancias vasoactivas como la histamina, los leucotrienos, y diversos agentes quimiotácticos que junto con la infiltración de neutrófilos en la zona producen un cuadro típico de enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor. Esto es lo que se conoce como respuesta inflamatoria aguda <sup>(83)</sup>.

Además de su papel en la inmunidad innata como primera línea de defensa, los macrófagos activados liberan citocinas entre las que se encuentran: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina-1 (IL-1), la IL-6 y la IL-12. Estas citocinas son capaces de inducir la proliferación y diferenciación de los linfocitos y por lo tanto el

desarrollo de la inmunidad adaptativa, es decir, las respuestas humoral y celular. Además, los macrófagos son células presentadoras de antígeno (antigen presenting cell: APC), ya que tienen la capacidad de digerir los antígenos, procesarlos y presentarlos en el exterior de su membrana plasmática en asociación a moléculas MHC para que sean reconocidos por los linfocitos <sup>(83)</sup>.

Los linfocitos B reconocen a los antígenos en su forma nativa o polimerizada, a través de las inmunoglobulinas (IgM/IgD) ubicadas en la superficie de su membrana plasmática, también llamadas receptores de células B (BCR). Los antígenos pueden ser llevados al interior del linfocito B por un proceso denominado endocitosis mediada por receptor. El linfocito B procesa y presenta en su superficie el antígeno asociado a moléculas MHC clase II. Este complejo es reconocido por las células T cooperadoras ( $T_H$ ) a través del receptor de células T (TCR). Este reconocimiento da lugar a la activación de las células T y a la secreción de citocinas que coactivan a las células B. La activación de los linfocitos B induce su expansión clonal y su diferenciación hacia células plasmáticas, productoras de anticuerpos específicos contra el antígeno en cuestión. Es decir, las células plasmáticas son las efectoras de la respuesta inmune humoral. Además, se generan células B de memoria que permanecen en el estadio  $G_0$  del ciclo celular <sup>(83)</sup>.

La activación de los linfocitos T y por lo tanto el desarrollo de la respuesta inmune celular, requiere el reconocimiento del antígeno presentado por una APC. Las señales coestimulatorias dadas por las moléculas accesorias en la presentación del antígeno, así como la secreción de IL-1 por parte de los macrófagos son necesarias para inducir la proliferación de los linfocitos  $T_H$ . La clona derivada de cada linfocito  $T_H$  activado se diferencia de acuerdo a las interleucinas presentes en el medio, en linfocitos  $T_{H1}$  y linfocitos  $T_{H2}$ . La primera vía se favorece cuando existe IL-12 en el medio mientras que la segunda se favorece cuando existe IL-4. El patrón de citocinas liberadas por los linfocitos  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$  es distinto y va encaminado también a diferentes funciones. Así, los linfocitos  $T_{H1}$  liberan principalmente IL-2, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y TNF- $\beta$ , cuya función es favorecer la respuesta contra microorganismos intracelulares. Por su parte, los

linfocitos  $T_H2$  liberan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, cuya función es la quimioatracción de eosinófilos, basófilos, células cebadas y células B para la defensa contra microorganismos y/o parásitos extracelulares. Estas vías se inhiben mutuamente <sup>(83)</sup>. Los linfocitos T citotóxicos ( $T_C$ ) reconocen al antígeno asociado a moléculas MHC de clase I. Como respuesta a este reconocimiento lisan a la célula que posee al antígeno mediante la liberación de perforinas y granzimas. Su función es especialmente relevante en las infecciones virales, en algunas infecciones bacterianas intracelulares y en la vigilancia inmunológica frente a los procesos neoplásicos <sup>(83)</sup>.

Las células NK tienen gránulos citoplásmicos que contienen perforinas y granzimas. Estas enzimas se liberan de manera espontánea para producir la lisis de células tumorales y células infectadas con virus. Para este proceso no se requiere una sensibilización previa a los antígenos de la célula blanco <sup>(83)</sup>.

En los humanos, el timo contiene un 99% de linfocitos T, y el bazo tiene de 30 a 40% de linfocitos T, 50 a 60% de linfocitos B y de 1 a 5% de células NK <sup>(83)</sup>.

La fisiología del sistema inmune está regulada por diversos y complejos mecanismos que actualmente están en estudio y que no se han dilucidado en su totalidad. Entre estos mecanismos destaca la regulación hormonal, en la que la MEL tiene un papel importante.

## 1.6 Efectos de la melatonina sobre el sistema inmune.

La contribución fisiológica de la MEL es la de mantener la homeostasis celular en todos los sistemas que conforman el organismo, entre ellos el sistema inmune.

El funcionamiento del sistema inmune está sujeto a un ritmo circádico, así como a cambios estacionales. En el bazo de la rata, el máximo número de células se presenta durante el día y en la primavera, mientras que en el timo se presenta durante la noche y en el otoño <sup>(37)</sup>. La proliferación de esplenocitos de ratón *in vivo* e *in vitro*, es estimulada en presencia de MEL endógena o exógena. El luzindol (*N*-acetil-2-benciltriptamina), un antagonista competitivo de los receptores de MEL, disminuye este efecto <sup>(19)</sup>.

Evidencias experimentales demuestran que la administración oral de melatonina en la dieta incrementa significativamente la proliferación de monocitos y células NK en la médula ósea y en el bazo. La acción de estas células se considera una parte de los mecanismos de inmunidad innata (no-específica) y constituyen la primera línea de defensa contra infecciones virales y neoplasias. Esto, aunado a evidencias clínicas sugieren que es factible el uso terapéutico de la MEL en casos de cáncer <sup>(18, 49)</sup>. Por otra parte, se ha reportado que en linfocitos B humanos, la unión de MEL a sus receptores nucleares (RZR alfa) inhibe la expresión del gen de la 5-lipooxigenasa, enzima involucrada en la síntesis de leucotrienos. Estos últimos son mediadores de la respuesta inflamatoria aguda, lo que sugiere un papel modulador de la MEL en este rubro <sup>(81)</sup>.

En el timo y el bazo de la rata se ha demostrado la expresión génica de receptores membranales de MEL, principalmente del tipo MT1 (Mel<sub>1a</sub>) <sup>(62)</sup>. En el bazo, estudios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-yodomelatonina han demostrado que existen variaciones durante el periodo luz-oscuridad que indican que la MEL ejerce una regulación negativa (down-regulation) de sus propios receptores. En concordancia con este hecho, en animales pinealectomizados o bien sometidos a condiciones de luz continua, se observa que la unión a los receptores aumenta <sup>(64)</sup>. Asimismo, se ha descrito la presencia de receptores específicos para MEL de tipo RZR/ROR (Retinoid Z Receptor/Retinoid Orphan Receptor), en núcleos celulares purificados provenientes del bazo y del timo de la rata <sup>(65)</sup>. La afinidad de estos receptores es del orden de picomoles, de tal manera que reconocen la concentración fisiológica de la hormona (0.1 nM a 1 nM) <sup>(27, 65)</sup>.

Como se mencionó previamente, una función esencial del sistema inmune es el desarrollo de la respuesta humoral, es decir, la producción de anticuerpos. La MEL puede estar involucrada en la regulación de este proceso. Los estudios del grupo del Dr. Maestroni y col. demuestran que la inhibición farmacológica de la síntesis de MEL, generada por la administración vespertina de antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, o de inhibidores de la síntesis de serotonina, disminuye la respuesta humoral primaria ante un estímulo antigénico <sup>(44, 45)</sup>. Asimismo, la administración exógena de MEL contrarresta los

efectos inmunosupresores inducidos por la corticosterona y por el estrés agudo sobre la respuesta humoral primaria y sobre el tamaño del timo <sup>(46)</sup>.

Se ha demostrado que la MEL participa en la respuesta inmune celular a través de sus receptores localizados en la membrana y en el núcleo de los monocitos y de los linfocitos <sup>(6, 22, 51)</sup>. La dinámica de este proceso estimulado por la MEL, incluye la activación de los monocitos, la estimulación de su actividad citotóxica, la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno y la liberación de IL-1 e IL-12 <sup>(24, 56)</sup>. La liberación de IL-12 promueve a su vez la diferenciación de los linfocitos T<sub>H</sub>1 <sup>(24)</sup>. En estos últimos, la MEL induce la liberación de IL-2 e IFN- $\gamma$ , cuya función es la de proteger al organismo contra la presencia de microorganismos intracelulares <sup>(22, 51)</sup>.

En células mononucleares de sangre periférica humana, el grupo del Dr. García-Maurino y cois. reportaron que la unión de agonistas específicos de los receptores nucleares de MEL de tipo RZR/ROR alfa produce un aumento en la producción de IL-6 e IL-2 <sup>(23)</sup>. El mismo efecto se reportó en líneas celulares humanas monocíticas y linfocíticas respectivamente, al unirse la MEL a receptores nucleares de los tipos RZR alfa, ROR alfa1 y ROR alfa2 <sup>(25)</sup>. Además, evidencias experimentales sugieren un mecanismo sinérgico de la estimulación de los receptores de la MEL ubicados en la membrana plasmática y de los receptores nucleares, para la producción de dichas linfocinas <sup>(23, 25)</sup>.

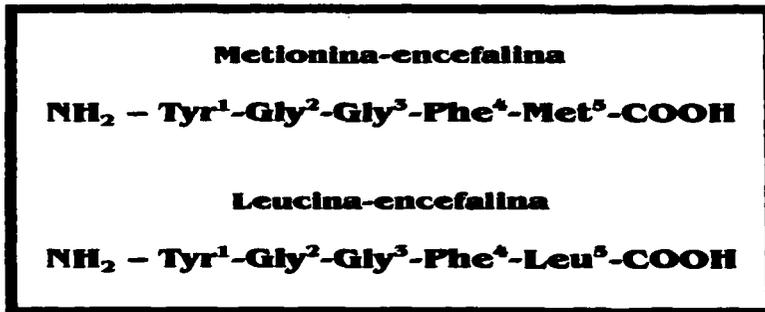
Los efectos de la MEL no están restringidos a los linfocitos T<sub>H</sub>1. Se han encontrado sitios de unión de alta afinidad a esta hormona en linfocitos T<sub>H</sub>2 en la médula ósea. La presencia de MEL en una concentración experimental de 0.1 nM, es capaz de provocar un aumento en la síntesis de IL-4, la cual a su vez induce la producción de factores de crecimiento hematopoyético como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF) <sup>(48, 50)</sup>. Evidencias experimentales demuestran que a través de esta vía, la MEL evita que las células sanguíneas sufran la apoptosis inducida *in vivo* o *in vitro* por la quimioterapia

contra el cáncer <sup>(48, 49)</sup>. Además, en los experimentos realizados en ratones se ha observado que el evitar que las células sanguíneas mueran por apoptosis, no disminuye la acción anticancerígena de los medicamentos <sup>(49, 50)</sup>.

En el esfuerzo por dilucidar el mecanismo de acción de la MEL en la regulación de las funciones inmunes, el grupo de Maestroni y col. demostró que el efecto inmunoestimulante que ejerce la MEL sobre la respuesta humoral es revertido por la administración exógena de antagonistas de los receptores opioides como la naltrexona. La evidencias en este rubro sugieren que la participación de la hormona en el sistema inmune está mediada por los péptidos opioides <sup>(46, 47)</sup>.

### 1.7 Los péptidos opioides: su síntesis.

Los péptidos opioides reciben su nombre por ser compuestos endógenos capaces de interactuar con los receptores del opio en las membranas celulares <sup>(1)</sup>. Los primeros péptidos opioides que fueron descubiertos fueron la Metionina-Encefalina (ME) y la Leucina-Encefalina (LE). La secuencia de estos pentapéptidos fue publicada por Hughes y Kosterlitz en 1975 <sup>(31)</sup>. Como se puede notar en el recuadro siguiente, la secuencia de los primeros cuatro aminoácidos es idéntica en ambos péptidos y sólo difieren en el aminoácido carboxilo-terminal.



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Existen tres precursores proteicos que dan lugar a los péptidos biológicamente activos: la Proopiomelanocortina (POMC), la Proencefalina A (PEA) y la Prodinorfina (PDNF). El procesamiento postraduccional de estos precursores consiste en el rompimiento secuencial a nivel de pares de aminoácidos básicos (Lys, Arg) a través de las enzimas prohormona convertasa 1 y 2 (PC1 y PC2), que pertenecen a la familia de la subtilisina. La PC1 se activa en el retículo endoplásmico mientras que la PC2 se activa en la región trans del aparato de Golgi <sup>(73, 80)</sup>.

Del procesamiento de la POMC se obtiene la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), las isoformas alfa, beta y gamma de la hormona estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH), la beta-lipotropina ( $\beta$ -LPH) y la beta-endorfina ( $\beta$ -End). De éstos péptidos sólo la  $\beta$ -endorfina tiene actividad opioide <sup>(3)</sup>.

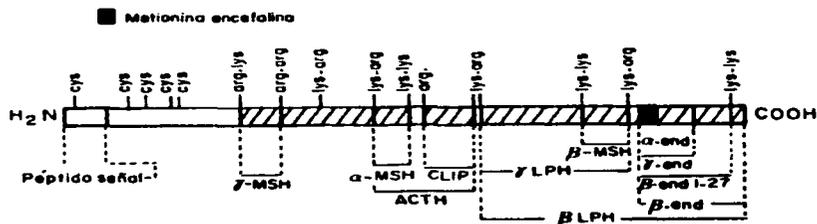


Figura 1.8 Proopiomelanocortina

El precursor PDNF, también llamado Proencefalina-B, da lugar a varios péptidos opioides muy potentes conocidos como dinorfinas A y B <sup>(1, 3)</sup>. Contiene copias de LE insertas en la secuencia de las dinorfinas, por lo que éstas podrían ser precursoras de la LE. No tiene copias de la secuencia de la ME.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

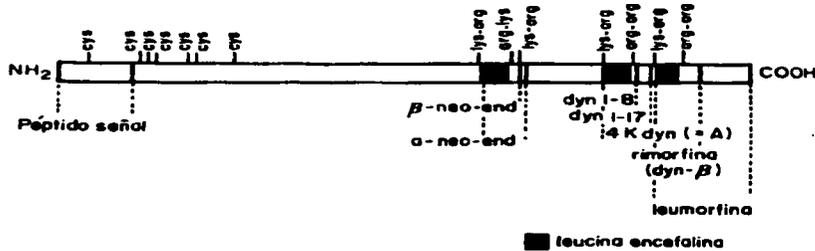


Figura 1.9 Prodinorfina

Por su parte, la PEA produce cuatro copias de ME, una copia de LE, una copia del Heptapéptido ME-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> y una copia del Octapéptido ME-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>. La porción no opioide de la PEA se denomina Synencefalina (Syn) y está constituida por los aminoácidos 1-72 de la PEA <sup>(3,40)</sup>.

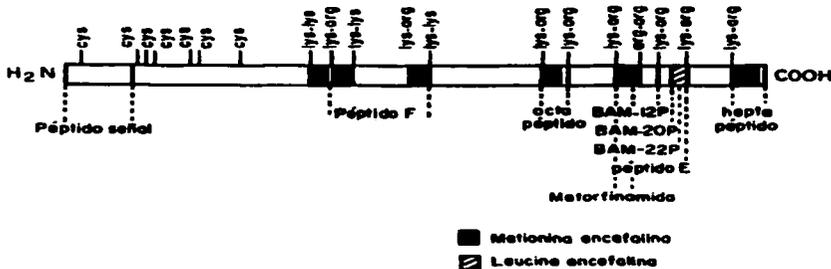


Figura 1.10 Proencefalina A

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.8 Receptores opioides

Los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Su descubrimiento desencadenó el estudio del sistema endógeno opioide, pues se pensó que al haber receptores celulares específicos para una sustancia exógena como la morfina, posiblemente existirían moléculas análogas que fueran los ligandos endógenos de dichos receptores. La búsqueda de moléculas endógenas con estructura química similar a la morfina resultaron infructuosas, hasta que en el año 1974 los estudios del grupo del Dr. Lars Terenius y col. sugirieron que la naturaleza bioquímica de los ligandos endógenos es peptídica <sup>(3)</sup>. El conocimiento actual de los agonistas y antagonistas específicos de los receptores opioides ha permitido su caracterización farmacológica.

Se han descrito varios tipos de receptores opioides:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\zeta$ . La unión al receptor  $\mu$  produce analgesia y aumenta el tono muscular, además produce oliguria, depresión respiratoria y dependencia física intensa. Los agonistas del receptor  $\delta$  producen analgesia en menor grado que los receptores  $\mu$ , pero tienen mayor afinidad por las encefalinas endógenas que por la morfina. El receptor  $\kappa$  es altamente selectivo para la dinorfina y es el mediador de los efectos atáxicos y sedantes. Los agonistas del receptor  $\epsilon$ , como la  $\beta$ -endorfina, producen también analgesia. Por otra parte, el receptor  $\sigma$  a dosis bajas produce analgesia, pero a dosis altas sus efectos son sedación, embriaguez y psicosis. Finalmente, el receptor  $\zeta$  se ha descrito como un modulador de la proliferación celular en el sistema nervioso <sup>(3)</sup>.

Los péptidos opioides y sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en todo el organismo, por lo que se ha sugerido que están implicados en la regulación de los procesos fisiológicos que conllevan a la homeostasis del organismo. Olson y col. <sup>(59)</sup> han propuesto diversas funciones en las que participan los péptidos opioides como son: la tolerancia y la dependencia a fármacos, la ingesta de alimentos y líquidos, el aprendizaje, la memoria, el funcionamiento gastrointestinal, renal y cardiovascular, la termorregulación,

la respiración, el envejecimiento, el embarazo, el desarrollo, el movimiento, la percepción del dolor, y en algunas patologías como la depresión, la epilepsia y el cáncer <sup>(3, 59)</sup>.

Dada la comunicación neuroendocrino-inmunológica en la que está involucrado el sistema endógeno opioide, es de particular importancia mencionar su participación en las funciones del sistema inmune, por lo que varias evidencias a este respecto se describen a continuación.

### **1.9 Los péptidos opioides en el sistema inmune.**

Las células del sistema inmune son capaces de producir y liberar péptidos opioides, los cuales están involucrados en la comunicación bidireccional entre los sistemas inmune y neuroendocrino <sup>(87)</sup>. Se ha reportado la expresión del precursor de las encefalinas -la Proencefalina A (PEA)- y la presencia de los péptidos derivados en los linfocitos de la rata <sup>(72)</sup>, así como la liberación de dichos péptidos inducida por la activación mitogénica de linfocitos humanos <sup>(33, 61)</sup>. Además, las células polimorfonucleares también producen y liberan péptidos derivados de la PEA. Se ha sugerido que dichos péptidos participan en el proceso inflamatorio al inducir un efecto analgésico local en las zonas afectadas <sup>(63, 86)</sup>. Estudios similares han demostrado que el ARNm de la PEA y de la POMC se expresa en células de tejido inflamado, y que las células que se infiltran en la zona contienen  $\beta$ -endorfina y Met-encefalina <sup>(63)</sup>.

Se ha determinado la presencia de los receptores opioides  $\delta$ ,  $\mu$ , y  $\kappa$  en linfocitos y su efecto inductivo en la proliferación celular *in vitro* <sup>(35)</sup>. En sujetos sanos, así como en pacientes con lepra o tuberculosis, se conoce que la Met-encefalina induce la proliferación de linfocitos T *in vivo* <sup>(52)</sup>. A propósito de este hecho se han realizado estudios farmacológicos *in vitro* utilizando análogos de dicho pentapéptido y antagonistas específicos de los receptores opioides  $\delta$ ,  $\mu$ , y  $\kappa$ . Estos estudios han demostrado que la acción moduladora de la ME en el sistema inmune está mediada principalmente por los receptores tipo  $\delta$  <sup>(52, 79)</sup>. Las células mononucleares (monocitos-macrófagos y linfocitos)

de varios tejidos linfoides expresan receptores opioides  $\delta$ . La estimulación de estos receptores repercute en la modulación de funciones inmunes tales como la proliferación de los linfocitos T, la producción de citocinas, la movilización del calcio, la quimiotaxis y la actividad de las células NK <sup>(30, 76, 77)</sup>. En particular, la síntesis de IL-2 se incrementa a través de la inducción del componente AP-1 del factor de transcripción NF-AT/AP-1 en linfocitos T humanos <sup>(29)</sup>.

La activación de los linfocitos T *in vivo* o *in vitro* induce la expresión de los receptores opioides  $\delta$  <sup>(76, 77)</sup>. Esta inducción está estrictamente mediada por la señal coestimuladora producida por la unión a moléculas como CD28 en la membrana del linfocito, durante su activación <sup>(58)</sup>.

Se ha sugerido una posible aplicación terapéutica antiviral de los opioides en los pacientes HIV positivos, ya que la estimulación de los receptores  $\delta$  mediante el agonista específico SNC-80 en células T CD4+ infectadas con el virus HIV-1, reprime la expresión del antígeno viral p24 <sup>(78)</sup>.

En las células B se han hallado evidencias que pudieran parecer contradictorias, sin embargo es necesario considerar el contexto fisiológico en el que se analiza el efecto de los opioides. Por una parte, los datos sugieren que la estimulación de los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$ , y  $\kappa$  en los linfocitos B, ejerce una regulación a la baja de la respuesta inmune humoral <sup>(55)</sup>. El control que ejercen los agonistas opioides sobre la producción de anticuerpos puede manifestarse también de manera indirecta a través de la inhibición de la síntesis de las citocinas que estimulan la respuesta de los linfocitos B, como es la IL-6 de monocitos-macrófagos <sup>(55)</sup>. La regulación a la baja de la producción de anticuerpos ocurre de manera normal una vez que se ha montado la respuesta primaria contra un antígeno en particular y sólo se estimula si el organismo vuelve a entrar en contacto con dicho antígeno. Por otra parte, en situaciones que alteran la fisiología del organismo como pueden ser infecciones, estrés agudo o tratamientos con corticosteroides, los opioides tienen un papel importante en la estimulación de la respuesta inmune humoral <sup>(44, 45, 46, 66)</sup>.

En conjunto, existen evidencias de que tanto la MEL como los péptidos opioides ejercen funciones inmunomoduladoras. En el SNC de la rata se ha establecido una relación entre la MEL y los péptidos opioides. En estos estudios se demostró que la ausencia endógena de la MEL, rompe el ritmo circádico de las encefalinas y disminuye significativamente su contenido tisular, lo que sugiere que esta hormona está implicada en la síntesis y liberación de los péptidos opioides <sup>(4)</sup>. Hasta donde sabemos no se ha establecido una relación entre la presencia de MEL y la concentración de opioides en el sistema inmune.

### **1.10 Hipótesis**

Si los péptidos opioides están involucrados en la comunicación bidireccional entre los sistemas inmune y neuroendocrino, y la ausencia de melatonina endógena abate la concentración tisular de encefalinas en el SNC, es factible que en el sistema inmune la maquinaria biosintética de los péptidos opioides también se encuentre inhibida.

### **1.11 Objetivo**

El objetivo del presente trabajo es establecer si la ausencia y presencia de melatonina modifica el contenido tisular de encefalinas en dos órganos linfoides: el bazo y el timo de la rata, cuyas funciones son representativas de la fisiología del sistema inmune.

## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Diseño experimental

- a. Control *naïve* : ratas macho de la cepa Wistar se sometieron a un ciclo luz-oscuridad de 12 x 12 h, en el que la melatonina se sintetiza y se secreta con un ritmo circádico cuya concentración plasmática máxima se encuentra a la 01:00 h. La fase luminosa comenzó a las 06:00 h.
- b. Ausencia de melatonina endógena: la estrategia metodológica para reducir la concentración plasmática de melatonina (sin usar inhibidores farmacológicos), consistió en someter a los animales a un periodo de 15 días con luz continua. Esta condición inhibe la actividad de la enzima N-acetiltransferasa (NAT) y como consecuencia la síntesis endógena de MEL<sup>(67)</sup>. La intensidad de luz utilizada fue  $\leq 50$  lux, con el fin de no provocar estrés en los animales.
- c. Administración de melatonina exógena: si en los animales sometidos a la luz continua, la concentración de opioides se reduce, entonces la administración de una dosis alta y única de melatonina (800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.c.), podría reestablecer la concentración basal de encefalinas.
- d. Administración del vehículo a los animales control: dado que la MEL no es soluble en agua, se disuelve en la mínima cantidad de etanol y posteriormente se lleva al volumen deseado con solución salina isotónica (SSI). La administración subcutánea de etanol provoca dolor, lo que puede promover la liberación de péptidos opioides. Para descartar que el efecto observado en la concentración de encefalinas sea debido al dolor causado por la administración de etanol, fue necesario administrar el vehículo en el que se disuelve la MEL (etanol al 1% en SSI) a un grupo de animales control.
- e. Efecto de la oscuridad: la oscuridad promueve la síntesis de la MEL en la glándula pineal al activar la enzima NAT. Con el propósito de reestablecer la concentración de

melatonina, un grupo de ratas sometidas a luz continua durante 15 días, fueron colocadas en un cuarto oscuro por un lapso de 4 h antes de ser sacrificadas.

- f. **Administración exógena de melatonina a los animales control:** Es reconocido que la concentración plasmática de MEL es mínima durante la fase de luz. Por lo tanto en los animales control, fue necesario analizar si un exceso de la hormona modifica la concentración de opioides. Con este propósito se administró una dosis de MEL de 800 µg/kg por vía subcutánea.

La estructura de este trabajo se divide en tres partes principales:

- 1) **La obtención de extractos concentrados de células mononucleares de dos órganos linfoides representativos: el bazo y el timo de la rata.** Para ello se concentraron los extractos obtenidos de diez muestras individuales de células mononucleares de cada uno de los órganos mencionados. Para la separación de las células mononucleares se utilizó la técnica de centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech). En esta parte se trabajó con tres grupos de animales: el grupo control *naive*, el grupo de luz continua y el grupo de luz continua al que se administró MEL exógena (n=10, cada grupo). En estas muestras se determinó la cantidad de Met-enkefalina mediante la técnica del radioinmunoensayo (RIA). Asimismo, se determinó la cantidad de proteínas en las muestras mediante la técnica de Lowry, con el objetivo de expresar la cantidad de Met-enkefalina por miligramo de proteína.
- 2) **Las encefalinas provienen de un precursor de naturaleza proteica, que es la Proencefalina A (PEA), la cual se somete a un procesamiento enzimático postraducciona**l que consiste en una serie de rompimientos secuenciales a nivel de pares de aminoácidos básicos. Un criterio de evaluación del procesamiento postraducciona**l de la PEA, es el análisis del perfil cromatográfico de la Synencefalina**<sup>(15, 41, 75, 82)</sup>. Con este objetivo se utilizó como herramienta analítica la cromatografía de exclusión molecular en gel de Sephadex G-100. Las muestras que

se sometieron a dicho proceso fueron los extractos concentrados de células mononucleares del bazo y el timo de la rata. Las muestras aplicadas en la columna fueron las equivalentes a 1.5 mg de proteína en un volumen total de 1 mL. En esta parte se trabajó únicamente con las muestras de los grupos control *naive* y luz continua. En las fracciones que eluyeron de la columna de Sephadex se cuantificó mediante RIA la Synencefalina y en el caso de las muestras de timo también se cuantificó la Leu-encefalina, para obtener los perfiles cromatográficos correspondientes.

- 3) La tercera parte de este trabajo consiste en la cuantificación por RIA, de los cuatro péptidos opioides derivados de la PEA: Met-encefalina, Leu-encefalina, Heptapéptido y Octapéptido, en extractos individuales del bazo y del timo de la rata. En esta parte se trabajó con los seis grupos de animales propuestos es decir: control *naive*, control + MEL, control + Vehículo, luz continua, luz continua + MEL y luz continua + oscuridad (n=10, en cada grupo). Se determinó la cantidad de proteína en las muestras de este bloque experimental mediante la técnica de Lowry.

Los procedimientos detallados de las técnicas antes mencionadas se describen más adelante en este capítulo.

## 2.2 Animales

Sesenta ratas macho cepa Wistar, 200-250 g de peso, fueron colocadas en un cuarto con temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Este grupo fue subdividido en seis grupos:

- a. Control *naive*. sometido a un ciclo luz-oscuridad de 12 x 12 horas. La fase de luz comenzó a las 06:00 h.
- b. Experimental: sometido a luz continua durante 15 días con una intensidad de luz  $\leq 50$  lux.

- c. **Experimental + MEL exógena:** sometido a luz continua durante 15 días. Administración de MEL 800 µg/kg por vía subcutánea.
- d. **Control + Vehículo:** sometido a un ciclo luz-oscuridad de 12 x 12 horas. La fase de luz comenzó a las 6:00 h. Administración del vehículo en el que se disuelve la MEL (etanol 1% en solución salina isotónica), vía subcutánea.
- e. **Experimental + Oscuridad:** sometido a luz continua durante 15 días. Se colocó a los animales en oscuridad total durante 4 h. Una vez transcurrido este tiempo se sacrificó a los animales en oscuridad con luz roja.
- f. **Control + MEL exógena:** sometido a un ciclo luz-oscuridad de 12 x 12 horas. La fase de luz comenzó a las 6:00 h. Administración subcutánea de MEL 800 µg/kg de peso corporal.

Los animales de los grupos c, d, y f, fueron sacrificados por decapitación 4 h después de la administración de MEL o del vehículo.

### **2.3 Disección de los órganos linfoides**

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se humedeció el pelaje con etanol al 70% para evitar que los órganos a diseccionar entraran en contacto con el pelo.

#### **a) Disección del bazo**

Se realizó una incisión en el costado izquierdo del abdomen de la rata y se localizó el bazo. Éste se sostuvo con unas pinzas y con ayuda de unas tijeras de punta afilada se desprendieron los vasos sanguíneos y el tejido conectivo. El bazo se colocó en una caja de Petri con disolución salina balanceada (BSS) pH = 7.3, para su posterior disgregación.

(Ver preparación de las disoluciones de trabajo en el Apéndice I).

### b) Disección del timo

Se realizó una incisión en el tórax de la rata, justo al nivel del esternón. Con unas tijeras se cortaron las costillas al ras del borde derecho del esternón y se abrió la caja torácica con ayuda de unas pinzas. El timo es un órgano bilobulado de color blanquecino, localizado justo arriba del corazón. El timo se comenzó a desprender desde su periferia con ayuda de un cotonete húmedo en BSS y unas tijeras de punta afilada. Se tuvo cuidado de no perforar o cortar los vasos sanguíneos que se encuentran en

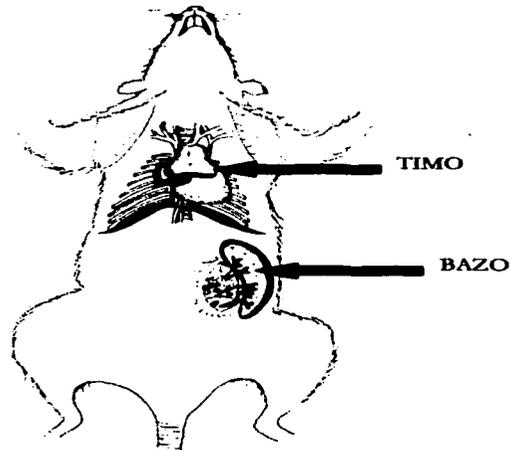


Figura 2.1 Esquema de disección del bazo y el timo.

el área, dado que la presencia excesiva de sangre dificulta la disección. El timo se colocó en una caja Petri con BSS para su posterior disgregación.

### 2.4 Obtención de extractos de timo y bazo completos.

- a. Inmediatamente después de la disección, el timo y el bazo se colocaron en tubos de ensayo con 5 mL de ácido acético 2 M. Se hirvieron en baño María durante 15 minutos y después se colocaron en un baño de hielo.
- b. El siguiente paso fue homogeneizar los órganos utilizando un homogeneizador de émbolo.
- c. Los homogenados de timo y de bazo se sometieron a centrifugación a 20,000 rpm , a 4°C, durante una hora. El sobrenadante fue recuperado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

d. Para su purificación, los extractos obtenidos se hicieron pasar a través de columnas de vidrio con Amberlita XAD-2 (0.5 x 12 cm) . Para ello, se agregaron los siguientes disolventes:

- 1) 20 mL HCl 0.1 M
- 2) 40 mL H<sub>2</sub>O destilada
- 3) 20 mL Metanol (En este último paso se recuperó la muestra en su tubo correspondiente).

Finalmente, las muestras se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada para la posterior cuantificación de péptidos opioides.

## **2.5 Obtención de suspensiones celulares a partir de bazo y timo de rata para posterior separación de células mononucleares.**

- a. El primer paso fue la disgregación de los órganos correspondientes sobre cajas Petri con aproximadamente 10 mL de BSS. Se utilizó un colador de acero inoxidable de malla cerrada (aproximadamente 200 mesh) y se ejerció presión sobre el tejido con el émbolo de una jeringa.
- b. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos de ensayo de plástico y se dejaron reposar en posición vertical de dos a tres minutos a temperatura ambiente. Los trozos de tejido remanente se sedimentaron en el fondo del tubo y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de ensayo.

## **2.6 Separación de células mononucleares por centrifugación con Ficoll-Paque.**

- a. La suspensión celular se centrifugó dos veces con BSS a 1500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante entre cada lavado. Después del segundo lavado, el botón celular de bazo se resuspendió en 20 mL de BSS y el botón celular de timo en 10 mL de BSS.
- b. El paso siguiente fue la separación de las células mononucleares mediante centrifugación por gradiente de densidad. Se utilizó Ficoll-Paque (Amersham

Pharmacia Biotech) que contiene Ficoll<sup>®</sup> 400 en una concentración de 5.7% y diatrizoato de sodio al 9.0%. El Ficoll<sup>®</sup> 400 es un polisacárido cuya función es la agregación de los eritrocitos para permitir su sedimentación. Los granulocitos, en las condiciones de osmolaridad del Ficoll-Paque, adquieren la densidad necesaria para migrar a través de él. De este modo, la baja viscosidad, la osmolaridad y la densidad del Ficoll-Paque (1.077 g/mL) permiten el aislamiento de las células mononucleares (linfocitos, monocitos y macrófagos) en un solo paso, mediante una centrifugación corta y a baja velocidad.

- c. Por cada 3 mL de Ficoll-Paque se estratificaron de 8 a 10 mL de la suspensión celular. La suspensión celular se agregó lentamente sobre el Ficoll-Paque, haciéndola resbalar por la pared del tubo de ensayo, el cual se colocó en posición inclinada al principio y poco a poco se colocó en posición vertical.
- d. Se sometió a centrifugación durante 45 minutos a 1500 rpm.
- e. El resultado se muestra en la figura 2.2:

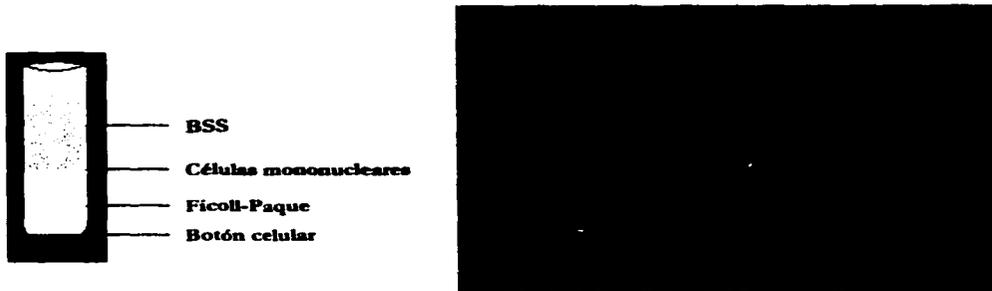


Figura 2.2 Esquema y fotografía de la separación de células mononucleares por centrifugación con Ficoll-Paque.

- f. Con una pipeta Pasteur se recuperó la capa de células mononucleares ubicada en la interfase, mediante movimientos rotatorios desde la orilla del tubo hacia el centro.

- g. La suspensión de células mononucleares obtenida de cada tubo, se colocó en un tubo de ensayo de plástico, se resuspendió en BSS y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado.

### **2.7 Obtención de extractos de células mononucleares de timo y bazo de rata.**

- a. Las células mononucleares obtenidas mediante centrifugación con Ficoll-Paque, se resuspendieron en aproximadamente 1 mL de BSS.
- b. Posteriormente se agregó a las muestras 2 mL de ácido acético 2M y se agitó. Se hirvieron en baño María durante 15 minutos e inmediatamente después se colocaron en baño de hielo.
- c. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante fue recuperado.
- d. Diez muestras individuales se juntaron para obtener un extracto concentrado de células mononucleares de cada órgano analizado.
- e. El extracto se evaporó a sequedad dos veces y finalmente se resuspendió en 2 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

### **2.8 Determinación de proteínas.**

La cuantificación de la cantidad de proteínas en las muestras se llevó a cabo mediante la técnica de Lowry <sup>(42)</sup>. El límite de sensibilidad de esta técnica es de 5 µg. La determinación espectrofotométrica se llevó a cabo a 700 nm en un instrumento Gilford 300-N. La preparación de las disoluciones y reactivos de trabajo se describen en el Apéndice 1.

Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (SIGMA) preparada a partir de una disolución acuosa con una concentración de 1 mg/mL.

Las cantidades y la secuencia en la que se añadieron los reactivos se indica en la siguiente tabla:

Tubos	0	1	2	3	4	5	6	7	8
H <sub>2</sub> O (μL)	150	145	140	135	130	110	90	70	50
BSA (μL)	0	5	10	15	20	40	60	80	100
A partir de este paso se agregaron los reactivos tanto a la curva como a las muestras problema									
NaOH (μL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo A (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Se esperó 15 minutos									
Reactivo B (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Se agitó inmediatamente después de agregar el reactivo B. Se esperó 30 minutos y se tomaron las lecturas en el espectrofotómetro Gilford 300-N a $\lambda = 700$ nm.									

## 2.9 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100

Como se mencionó anteriormente en el diseño experimental, esta técnica se utilizó como una herramienta analítica para la evaluación del procesamiento postraduccional de la PEA. Para ello se montó una columna con gel de Sephadex G-100 (Farmacia Fine Chemicals) activado durante dos días con agua desionizada. Para evitar la contaminación y proliferación de hongos, se añadió azida de sodio al 0.02%.

El Sephadex es un gel de dextran que consiste en un conjunto de esferas con poros de un tamaño específico. El dextran es un polímero de anhidroglucosa producido por diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides* cultivadas en medios azucarados. Dado que las cadenas de polisacáridos tienen gran cantidad de grupos hidroxilo, el Sephadex es altamente hidrofílico y se expande al absorber agua o soluciones electrolíticas.

El Sephadex es un material para cromatografía capaz de separar sustancias de acuerdo al tamaño de las moléculas. Las moléculas más grandes fluyen a lo largo de la columna, mientras que las moléculas pequeñas se separan al quedar retenidas temporalmente por las partículas de gel. El número en las series G de Sephadex, representa el volumen de agua que pueden contener las partículas de gel sin considerar el agua a su alrededor. Así el Sephadex G-25 puede contener 2.5 ml de agua por gramo de

gel seco. Además, dicho número indica cuál es límite de masa molecular que pueden retener las partículas de Sephadex, por ejemplo: el gel de Sephadex G-100 es capaz de retener y separar proteínas hasta de 100 kDa.

Se montó una columna de vidrio con las siguientes características:

- Dimensiones: 85 cm longitud x 1.5 cm diámetro.
- Matriz: Gel de Sephadex G-100
- Eluyente: H<sub>2</sub>O desionizada con azida de sodio (Na<sub>3</sub>N) al 0.02% como agente antimicrobiano. El eluyente se filtró y desgasificó por lo menos cada 48 h.
- Flujo de elución: 0.2 mL/min

Para mantener el flujo constante se utilizó una bomba peristáltica (Buchler Multistatic Pump) y para recolectar las fracciones se utilizó el equipo Fraction Collector Frac-100 (Pharmacia Fine Chemicals).

Las muestras que se eluyeron en esta columna fueron los extractos concentrados de células mononucleares del timo y del bazo. De estos extractos se aplicó la cantidad fija de 1.5 mg de proteínas en un volumen total de 1 mL.

Entre cada corrida se permitió un lavado de 72 h a flujo constante de 0.2 mL/min.

## **2.10 Radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de las encefalinas.**

El radioinmunoensayo es una técnica analítica que se basa en la especificidad y la sensibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo. En esta técnica se establece una competencia entre dos antígenos, uno de ellos marcado radiactivamente, por los sitios de reconocimiento de una cantidad constante de anticuerpos. En este caso particular el ensayo se realizó en fase líquida y los antígenos en competencia fueron: las encefalinas utilizadas como sustancias patrón marcadas con <sup>125</sup>I, y las encefalinas contenidas en los extractos del bazo y del timo de la rata.

Los anticuerpos utilizados en el análisis fueron anticuerpos policlonales preparados en conejo, en el Laboratorio de Análisis Químicos. Sus características de reactividad cruzada se han reportado previamente <sup>(70)</sup> y se presentan en el Apéndice I.

La metodología del radioinmunoensayo se compone de tres partes principales que son:

- 1) El marcaje de los péptidos puros que se utilizan como sustancias patrón y la purificación de los péptidos monoyodados mediante cromatografía en capa fina y autorradiografía. En el caso particular de la Synencefalina, la purificación del péptido monoyodado se realiza mediante su aplicación a una columna de Amberlita XAD-2.
- 2) La elaboración de las correspondientes curvas patrón con al menos 8 diferentes concentraciones de los péptidos puros.
- 3) El análisis de las muestras problema.

#### 2.10.1 Reacción de yodación

- Para la yodación de las encefalinas (Peninsula Laboratories) con el radioisótopo <sup>125</sup>I (Amersham Pharmacia Biotech), se tomaron 2 µg de cada péptido en microtubos y se añadieron 200 µCi de <sup>125</sup>I. Se agitó brevemente.
- Se añadieron 5 µL de una solución de Cloramina T (2 mg/mL). Se agitó durante 30 segundos exactos. Para detener la reacción se agregaron 10 µL de la solución de metabisulfito de sodio (4 mg/mL) y 60 µL de HCl 0.1 M.

#### 2.10.2 Cromatografía en capa fina

- Se utilizaron placas de aluminio recubiertas con sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Dimensiones 20 x 20 cm, espesor de capa 0.2 mm.
- Se marcaron con lápiz cinco carriles de 1 cm y la línea de aplicación a 2 cm del borde.
- Se aplicó el péptido marcado en los carriles correspondientes, utilizando una micropipeta o una jeringa Hamilton, sobre la línea de aplicación.

- Una vez que la muestra se hubo adsorbido completamente, se colocó la placa dentro de una cuba previamente nivelada que contenía el siguiente sistema de disolventes como fase móvil:
  - Butanol : Ácido acético : H<sub>2</sub>O 4:1:1 para Met-enkefalina, Leu-enkefalina y el Octapéptido
  - Butanol : Ácido acético : Acetato de etilo : H<sub>2</sub>O 1:1:2:1 para el Heptapéptido.
- Cuando la fase móvil sobrepasó los 12 cm a partir de la línea de aplicación, se sacó la cromatoplaque de la cuba, se marcó con un lápiz el frente del disolvente y se dejó secar.

### 2.10.3 Autorradiografía

- Se colocó la cromatoplaque y sobre ella una película Kodak TMAX-100 en una caja cerrada diseñada para este fin. Se trabajó en oscuridad.
- Se expuso la película a la radiación de 15 a 30 minutos.
- Se retiró la película y se reveló. Para ello se sumergió en una charola que contenía revelador Kodak (Dektol developer) durante 3 minutos, se enjuagó en una charola con agua durante 1 minuto e inmediatamente después se sumergió en una charola que contenía fijador Kodak (Rapid fixer) durante 3 minutos. Finalmente se volvió a enjuagar con agua durante 1 minuto. Se secó al aire.
- Con el fin de calcular el factor de retención (R.f.) del péptido radiactivo, se colocó la película fotográfica sobre la cromatoplaque y se indicó con un marcador la línea de aplicación y el frente del disolvente.
- Se calculó el factor de retención (R.f.), dividiendo la distancia recorrida por cada muestra desde el punto de aplicación entre la distancia del punto de aplicación al frente del disolvente. El R.f. calculado se comparó con los que se han obtenido para los péptidos monoyodados utilizando el sistema de disolventes mencionado y que se mencionan en el Apéndice I.

#### 2.10.4 Extracción del péptido marcado

- Se marca sobre la cromatoplaque el sitio en el que se encuentra el péptido monoyodado, de acuerdo al R.f. obtenido en la autorradiografía.
- Se recorta la cromatoplaque con tijeras y se coloca en un tubo de ensayo de plástico.
- Se agregan 4 mL de una solución metanol:agua 1:1 y se agita vigorosamente durante 20 minutos.
- Se somete a centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Se recupera el sobrenadante en otro tubo de ensayo de plástico debidamente rotulado.
- Se repite la extracción.
- El contenido del tubo rotulado se evapora a sequedad y se resuspende en 1 mL de agua destilada.
- Se toma una alícuota de 10  $\mu$ L del péptido marcado y se lleva al contador de radiación gamma para determinar el número de cuentas por minuto (cpm).
- Con base en dicha determinación, si es conveniente se diluye el péptido.

#### 2.10.5 Purificación de $^{125}\text{I}$ – Synencefalina

- El péptido recién marcado se hizo pasar por una columna de Amberlita XAD-2 agregando los siguientes disolventes:
  - 1) 20 mL HCl 0.1 M
  - 2) 120 mL  $\text{H}_2\text{O}$
  - 3) 10 mL mezcla 1:1 Acetonitrilo : Disolución Ácido Acético 1M + HCl 0.02 M
- Después de agregar el último disolvente, se recuperó el péptido purificado en un tubo de plástico rotulado.
- El contenido del tubo se evaporó a sequedad y se resuspendió en 1 mL de agua destilada.

2.10.6 Curvas patrón

Se prepararon diluciones al medio a partir de una solución de concentración conocida de un péptido en particular. Las curvas de Met-enkefalina, Leu-enkefalina, Heptapéptido y Octapéptido constan de 11 diluciones, mientras que la curva de Synencefalina consta de 8 diluciones. Las cantidades de péptido en cada punto de las curvas correspondientes se muestran a continuación:

<b>Met-enkefalina</b>		<b>Leu-enkefalina</b>		<b>Heptapéptido</b>	
<b>ng</b>	<b>pmol</b>	<b>ng</b>	<b>pmol</b>	<b>ng</b>	<b>pmol</b>
20	34.9	20	35.97	20	22.82
10	17.45	10	17.98	10	11.41
5	8.72	5	8.99	5	5.70
2.5	4.36	2.5	4.49	2.5	2.85
1.25	2.18	1.25	2.24	1.25	1.42
0.62	1.09	0.62	1.12	0.62	0.70
0.31	0.54	0.31	0.56	0.31	0.353
0.15	0.27	0.15	0.28	0.15	0.171
0.07	0.13	0.07	0.14	0.07	0.079
0.03	0.06	0.03	0.07	0.03	0.034
0.01	0.03	0.01	0.035	0.01	0.011

<b>Octapéptido</b>		<b>Synencefalina</b>	
<b>ng</b>	<b>pmol</b>	<b>ng</b>	<b>pmol</b>
20	20.20	2	1.84
10	10.1	1	0.92
5	5.05	0.5	0.46
2.5	2.52	0.25	0.23
1.25	1.26	0.125	0.11
0.62	0.63	0.062	0.052
0.31	0.31	0.031	0.028
0.15	0.15	0.015	0.014
0.07	0.07		
0.03	0.035		
0.01	0.017		

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

2.10.7 Procedimiento para el RIA

- a. Se utilizaron tubos de vidrio desechables, numerados. Se trabajó cada tubo por triplicado. La preparación de las disoluciones de trabajo se detalla en el Apéndice I.
- b. Se preparó una dilución del péptido radiactivo con disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M de tal manera que cada 100 µL contuvieran aproximadamente 10,000 cpm (cuentas por minuto). Para determinar la intensidad de radiación en cpm, se utilizó el contador de radiación gamma Isomedic 4-600 (ICN).
- c. Se preparó una dilución del anticuerpo de tal manera que el porcentaje de unión total fuera de 25 a 30%.
- d. A cada tubo se agregaron los reactivos en el siguiente orden de izquierda a derecha:

Tubos	Disolución de Fosfatos 0.05 M		<sup>125</sup> I – Péptido	Anticuerpo	Carbón activado*
100%	350 µL	100 µL H <sub>2</sub> O	100 µL	-	-
Unión inespecífica	350 µL	100 µL H <sub>2</sub> O	100 µL	-	200 µL
Unión total	250 µL	100 µL H <sub>2</sub> O	100 µL	100 µL	200 µL
Curva patrón	250 µL	100 µL curva	100 µL	100 µL	200 µL
Muestras	250 µL	100 µL muestra	100 µL	100 µL	200 µL

- e. Después de agregar el anticuerpo los tubos se agitaron suavemente y se incubaron a 4°C durante por lo menos 18 h.
- f. \*El carbón activado se agitó durante una hora y se agregó a los tubos correspondientes.
- g. Los tubos se agitaron suavemente y se sometieron a centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos.
- h. Se recuperó el sobrenadante por decantación.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

- i. Los tubos se llevaron al contador de radiación gamma Isomedic 4/600 (ICN) para determinar la las cuentas por minuto (cpm) en cada tubo.
- j. Se transformaron las cpm obtenidas a unidades de masa (pmol) mediante un programa de cómputo. En este programa se introduce la información relativa a la curva patrón y éste realiza los cálculos necesarios para interpolar los valores de las muestras, arrojando finalmente el contenido de inmuno-reactividad en pmol/tubo.

La inmuno-reactividad (IR) para los péptidos analizados fue expresado como pmol del péptido por miligramo de proteína.

### **2.11 Análisis Estadístico**

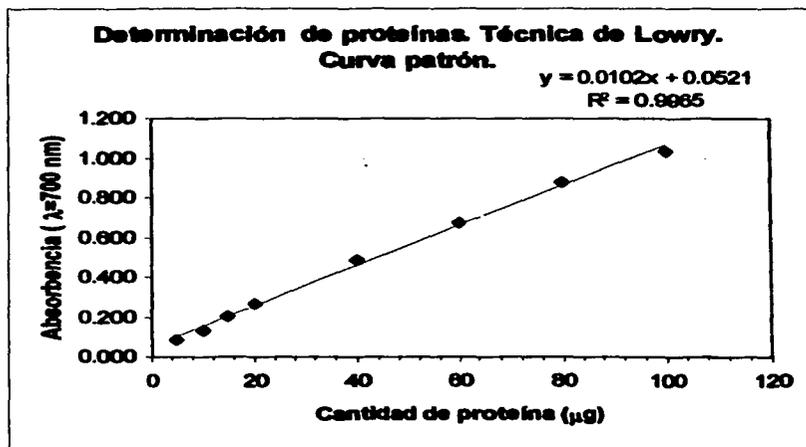
Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron calculadas utilizando la Prueba de "t" de Student. El valor de la significancia utilizada en este trabajo fue de  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO III. RESULTADOS

Este capítulo aborda los resultados del presente trabajo organizados de la siguiente manera: en primer lugar se describen los resultados pertinentes a la caracterización y las curvas patrón de las técnicas analíticas utilizadas, como son la determinación de proteínas, la cromatografía en Sephadex G-100 y el radioinmunoensayo. Posteriormente se detallan los resultados de la cuantificación de encefalinas en los extractos de células mononucleares y de muestras individuales del bazo y el timo de la rata.

### 3.1 Curva patrón para la determinación de proteínas mediante la técnica de Lowry.

A continuación se muestra la representación gráfica de una curva patrón de BSA, obtenida mediante la técnica de Lowry<sup>(42)</sup> previamente descrita. El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) es superior a 0.990 por lo que se considera una curva confiable para la cuantificación de las proteínas contenidas en las muestras de este trabajo.



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Figura 3.1 Representación gráfica de una curva patrón utilizada para la determinación de proteínas mediante la técnica de Lowry

### 3.2 Caracterización de la columna de Sephadex G-100.

El primer paso para caracterizar la columna de Sephadex G-100 fue la determinación del volumen muerto. Con este objetivo se aplicó 1 mg de Azul Dextran, que es un polisacárido de 2000 kDa. La determinación espectrofotométrica del volumen de elución del Azul Dextrán se realizó a  $\lambda=700$  nm. El volumen muerto ( $V_0$ ) de la columna de Sephadex G-100 fue de 81 mL.

Posteriormente se procedió a determinar los volúmenes de elución de cinco proteínas de peso molecular conocido. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Proteína	Masa molecular	Volumen de elución ( $V_e$ )
BSA	67 kDa	94.8 mL
Quimiotripsinógeno	25 kDa	138.3 mL
Ribonucleasa A	13.7 kDa	156 mL
Insulina	5.7 kDa	189.6 mL
$\beta$ -endorfina	3 kDa	212 mL

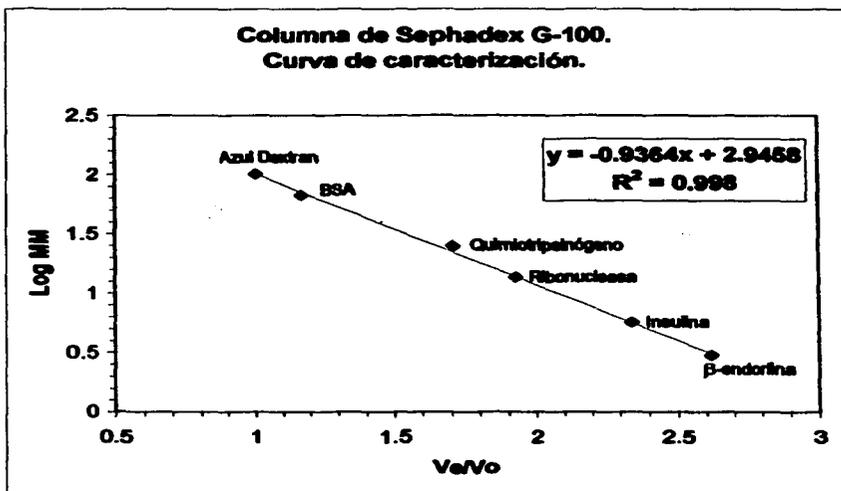


Figura 3.2 Curva de caracterización de la columna de Sephadex G-100.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### 3.3 Curva patrón para la cuantificación de encefalinas mediante radioinmunoensayo.

Como un ejemplo de las curvas patrón que se obtienen a partir del procedimiento descrito anteriormente para el radioinmunoensayo, se presenta una curva patrón para la cuantificación de Met-encefalina. El límite de sensibilidad de este ensayo es de 0.13 pmol.

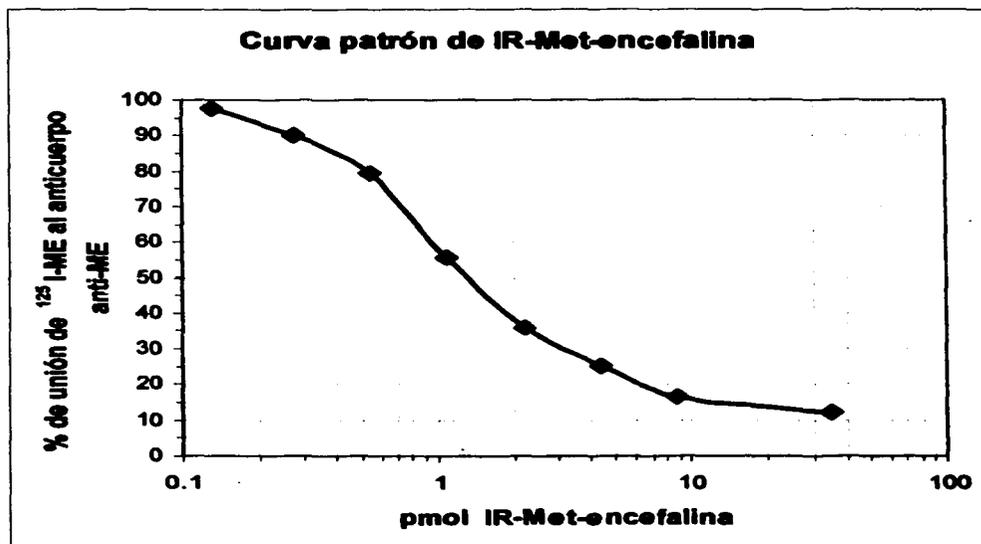


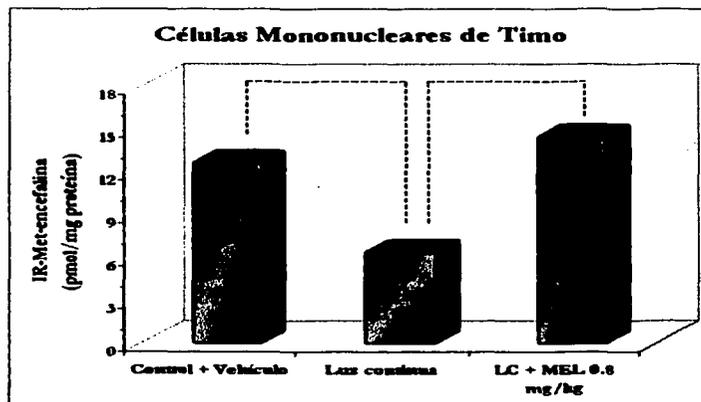
Figura 3.3 Curva patrón para la cuantificación de IR-Met-encefalina por radioinmunoensayo, utilizando los anticuerpos policlonales anti-ME.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.4 Cuantificación de Met-enkefalina en extractos concentrados de células mononucleares del bazo y el timo de la rata.

Para contar con una referencia inicial del contenido de péptidos opioides en los extractos de las células mononucleares del bazo y el timo de la rata, se determinó el contenido de Met-enkefalina (IR-ME), en un concentrado proveniente de diez muestras individuales de ambos órganos. Para esta primera aproximación se consideraron tres grupos de animales: Control + Vehículo, Luz Continua (LC) y LC + MEL 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

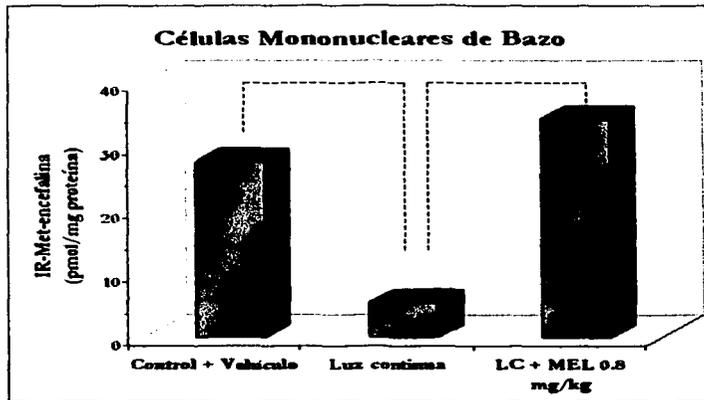
En la figura 3.4, se muestra el contenido de IR-ME en los extractos concentrados de células mononucleares del timo de la rata. En el grupo de animales que fue sometido a LC se observa una disminución del 50% en el contenido de IR-ME con respecto al grupo Control + Vehículo. Por su parte, en el grupo LC al que se administró MEL, hubo un incremento del 129% en el contenido de IR-ME con respecto al grupo de luz continua. Es decir, en este grupo de animales se observó el restablecimiento del nivel basal de enkefalina en un lapso de 4 horas.



**Figura 3.4** Contenido de IR-ME en células mononucleares de timo de rata. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Las muestras fueron extractos concentrados de  $n=10$ .

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

En la figura 3.5, se muestra el contenido de IR-ME en los extractos de células mononucleares del bazo de la rata. La tendencia en el comportamiento de este péptido en el bazo es similar que en el timo, sin embargo el efecto observado es más drástico, como se describe a continuación. En el grupo de animales que fue sometido a LC se observa una disminución del 80% en el contenido de IR-ME con respecto al grupo Control + Vehículo. Por su parte, en el grupo LC al que se administró MEL, hubo un incremento del 533% en el contenido de IR-ME con respecto al grupo de luz continua, en un lapso de 4 horas.



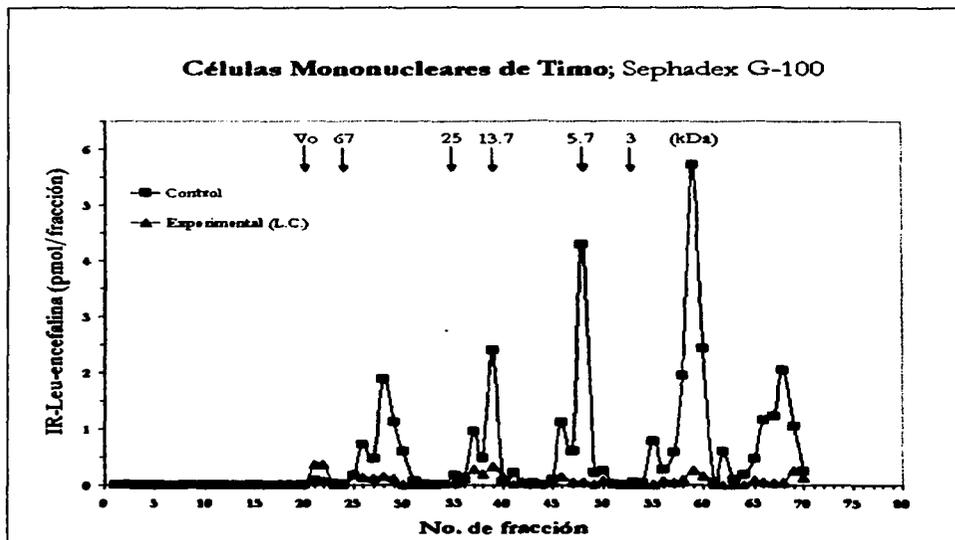
**Figura 3.5** Contenido de IR-ME en células mononucleares de bazo de rata. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Las muestras fueron extractos concentrados de n=10.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.5 Cuantificación de Leu-enkefalina y Synencefalina en las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100.

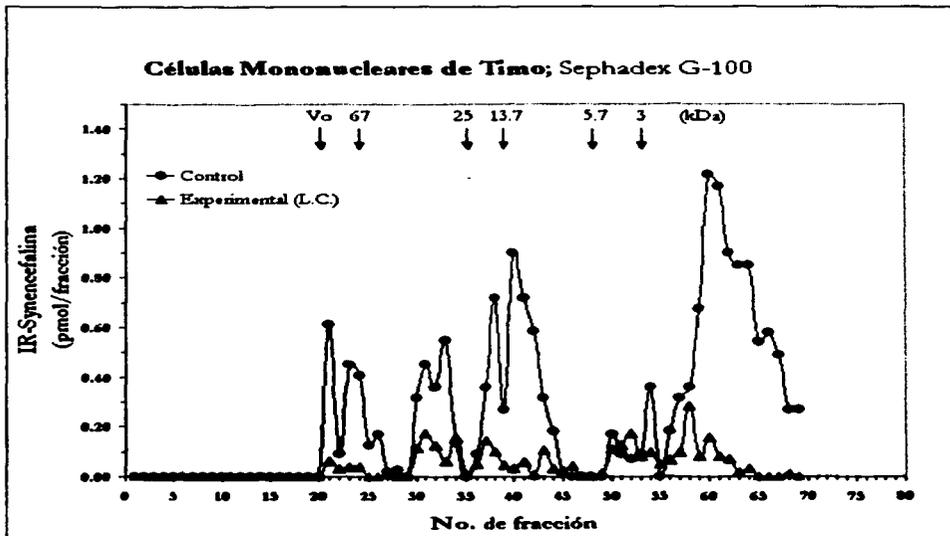
Con base en los resultados anteriores se analizó el perfil de los precursores bioquímicos de las encefalinas en el grupo Control *naive* y en el grupo de luz continua. Para ello se utilizaron como muestras los extractos concentrados de células mononucleares de diez timos y bazos de rata, que se sometieron a un proceso de

cromatografía de exclusión molecular. Se analizó la concentración de IR-LE en las fracciones que eluyeron de la columna de Sephadex G-100. Asimismo se analizó la concentración de Synencefalina, que es la porción no opioide de la PEA, como indicador del procesamiento postranscripcional de dicho precursor. En la figura 3.6 se muestra el perfil cromatográfico de la IR-LE y sus precursores bioquímicos en células mononucleares del timo de la rata. En los cromatogramas tanto del grupo control como del grupo de luz continua, se observan cinco picos principales, que pueden corresponder a los precursores de mayor peso molecular y al péptido biológicamente activo. La concentración de IR-LE es significativamente menor en el grupo de luz continua con respecto al grupo control *naive*.



**Figura 3.6** Perfil cromatográfico de la IR-LE en células mononucleares del timo de la rata. Los resultados se expresan como pmol/fracción. Se trabajaron los grupos control *naive* y luz continua. Las muestras corresponden a extractos concentrados de  $n=10$ .

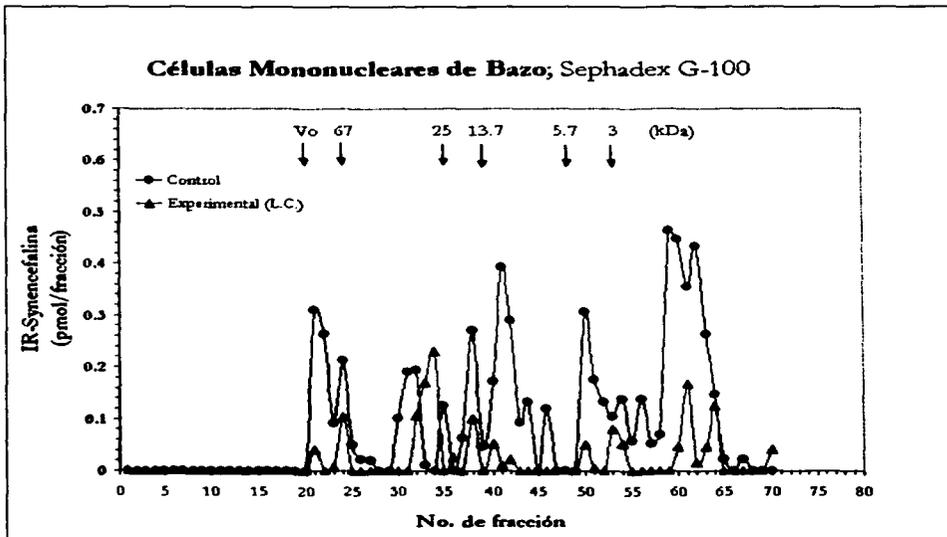
En la figura 3.7 se muestra el perfil cromatográfico de la IR-Synencefalina (IR-Syn) y de sus posibles precursores bioquímicos, en los extractos de células mononucleares del timo. En los cromatogramas, tanto del grupo control como de luz continua, se observan cinco picos principales que pueden corresponder a las moléculas precursoras de la synencefalina. La concentración de IR-Syn es significativamente menor en el grupo de luz continua con respecto al grupo control *naive*.



**Figura 3.7** Perfil cromatográfico de la IR-Syn en células mononucleares del timo de la rata. Los resultados se expresan como pmol/fracción. Se trabajaron los grupos control *naive* y luz continua. Las muestras corresponden a extractos concentrados de  $n=10$ .

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

En la figura 3.8 se presenta el perfil cromatográfico de la IR-Syn, en los extractos de células mononucleares del bazo. De manera similar que en el timo, se observan cinco picos principales en los cromatogramas, que pueden corresponder a las moléculas precursoras de la synencefalina. La concentración de IR-Syn es menor en el grupo de luz continua con respecto al grupo control *naive*, excepto en la zona del cromatograma ubicada entre las fracciones 30 y 35.

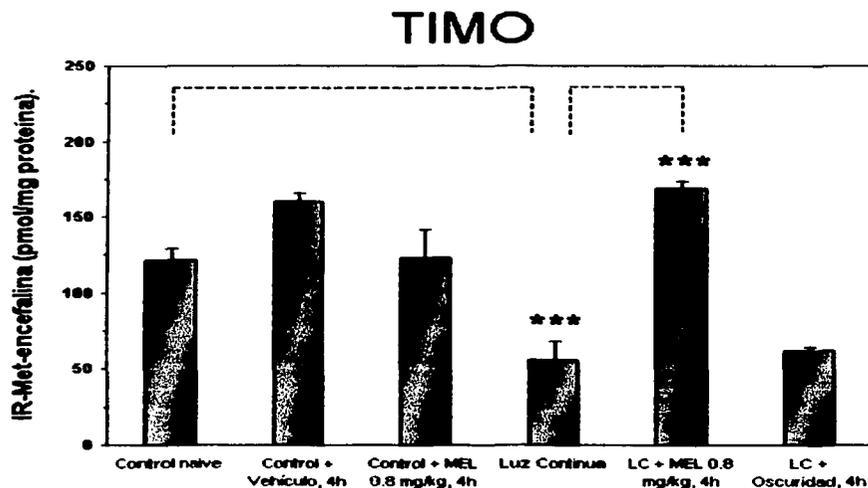


**Figura 3.8** Perfil cromatográfico de la IR-Syn en células mononucleares del bazo de la rata. Los resultados se expresan como pmol/fracción. Se trabajaron los grupos control *naive* y luz continua. Las muestras corresponden a extractos concentrados de n=10.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

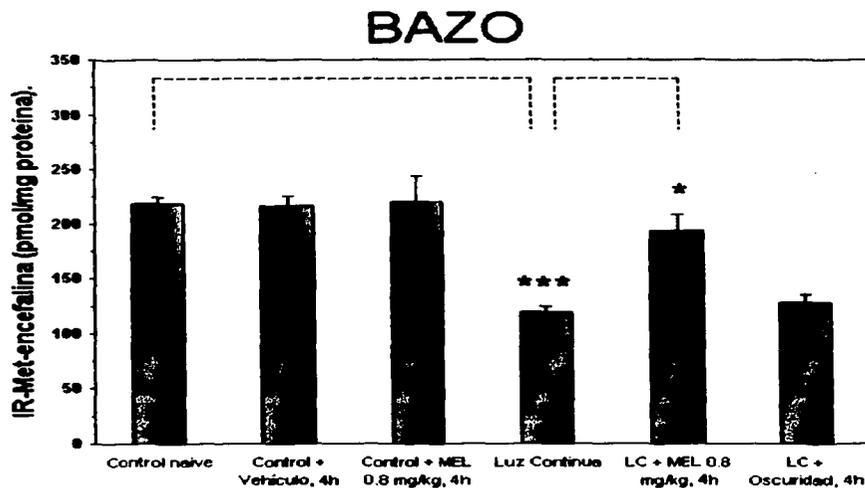
### 3.6 Cuantificación de encefalinas en el timo y en el bazo de la rata.

En la figura 3.9, se muestra la concentración de IR-ME en el timo de la rata. En los grupos con un ciclo de luz oscuridad de 12 x 12 h, que fueron inyectados con el vehículo y con la dosis de MEL (800 µg/kg), la concentración de IR-ME no se modificó con respecto al control *naive*. Sin embargo, el grupo de animales sometidos a 15 días con luz continua mostró una disminución del 54% con respecto al control *naive* ( $p < 0.001$ ). Por su parte, en los animales a los que les fue administrada la hormona en forma exógena (800 µg/kg), y que habían permanecido en la luz continua, se encontró un incremento en el contenido de IR-ME del 185% con respecto al grupo de luz continua ( $p < 0.0001$ ). El grupo sometido a la oscuridad durante 4 h, la concentración de IR-ME no mostró cambios significativos con respecto al grupo de luz continua.



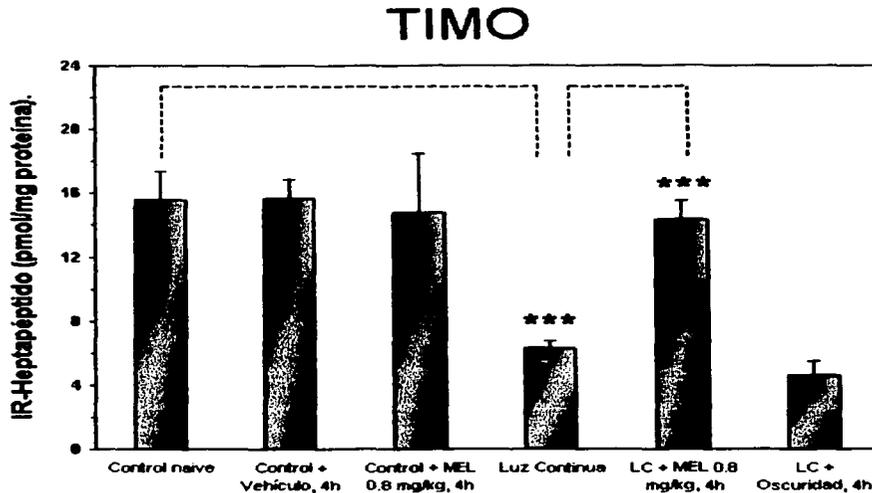
**Figura 3.9** En la figura se muestra el contenido de IR-Met-enkefalina en el timo. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio  $\pm$  error estándar (e.e.). (n=7). Los niveles de significancia fueron calculados con la prueba de "t" de Student. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

En la figura 3.10, se muestra el contenido de IR-ME en el bazo de la rata. El comportamiento de este péptido fue similar con respecto al timo. En los grupos control tratados con el vehículo y con la dosis en exceso de melatonina, el contenido de IR-ME no se modificó con respecto al control *naive*. El grupo sometido a la luz continua presentó una disminución del 45% con respecto al control *naive* ( $p < 0.0001$ ), y cuando se le administró melatonina en forma exógena, la concentración de IR-ME aumentó en un 63% aproximadamente, con respecto al grupo de luz continua ( $p < 0.024$ ). El grupo de oscuridad no presentó cambios en el contenido de la met-enkefalina con respecto al grupo de luz continua.



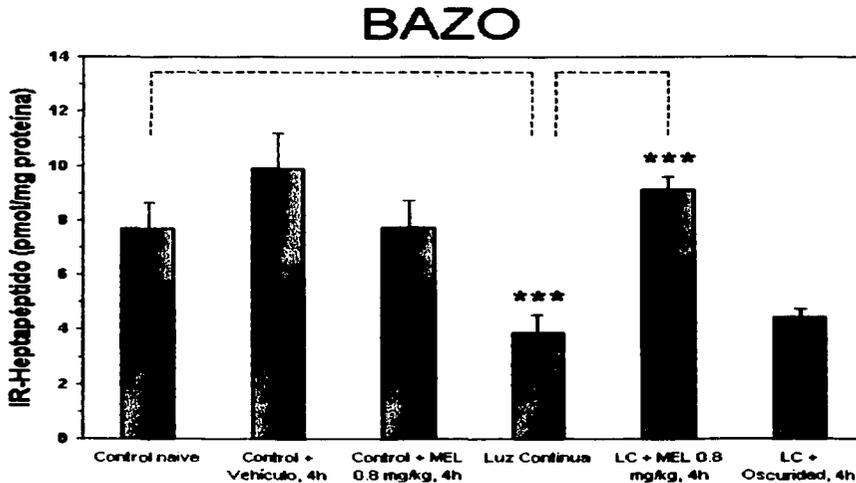
**Figura 3.10** En la figura se muestra el contenido de IR-Met-enkefalina en el bazo. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio  $\pm$  e.e. ( $n=7$ ). Los niveles de significancia fueron calculados con la prueba de "t" de Student. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

En la figura 3.11 se observa el contenido de IR-HE en el timo de la rata. Este péptido derivado de la Proencefalina A, muestra un patrón de distribución similar a la IR-ME, toda vez que su contenido en los animales sometidos a la luz continua se redujo significativamente con respecto al control *naive* ( $p < 0.0001$ ). La administración del vehículo y de la melatonina exógena en los animales control no produjo cambios en la concentración del péptido, al compararlo con el control *naive*. Sin embargo, en aquellos animales carentes de la hormona por estar sometidos al efecto de la luz continua, la administración de MEL en forma exógena, produjo un incremento del 129% en el contenido de IR-HE ( $p < 0.001$ ). El grupo de oscuridad no se modificó con respecto al grupo de luz continua.



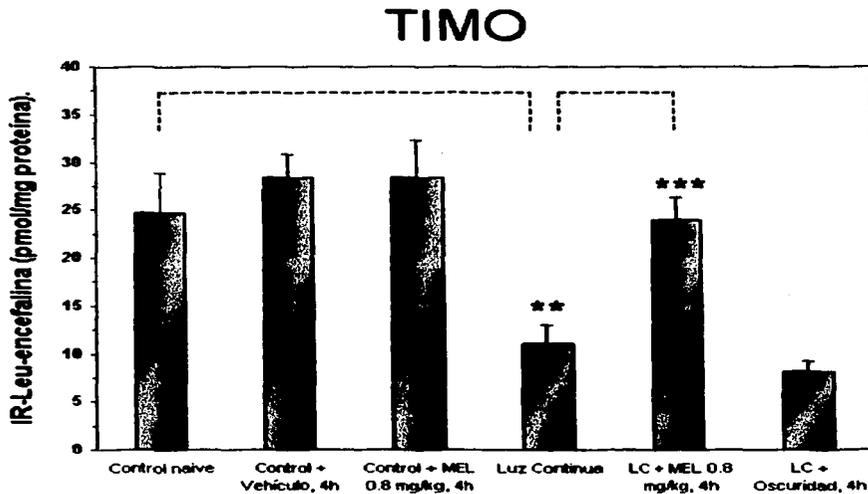
**Figura 3.11** En la figura se muestra el contenido de IR-Heptapéptido en el timo. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio  $\pm$  e.e. ( $n=8$ ). Los niveles de significancia fueron calculados con la prueba de "t" de Student. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

La figura 3.12, corresponde al contenido de IR-HE en el bazo. En estos resultados se observa que en el grupo control al cual se le administró el vehículo, existe un incremento no significativo en la concentración de IR-HE. En el grupo control al cual se le administró melatonina no se obtuvieron modificaciones con respecto al control *naive*. En forma similar a la IR-ME, el heptapéptido redujo su concentración en un 50% en el grupo de luz continua ( $p < 0.005$ ), para incrementarse en más de 130% después de la administración exógena de melatonina ( $p < 0.0001$ ). La oscuridad no modificó el contenido de este péptido.



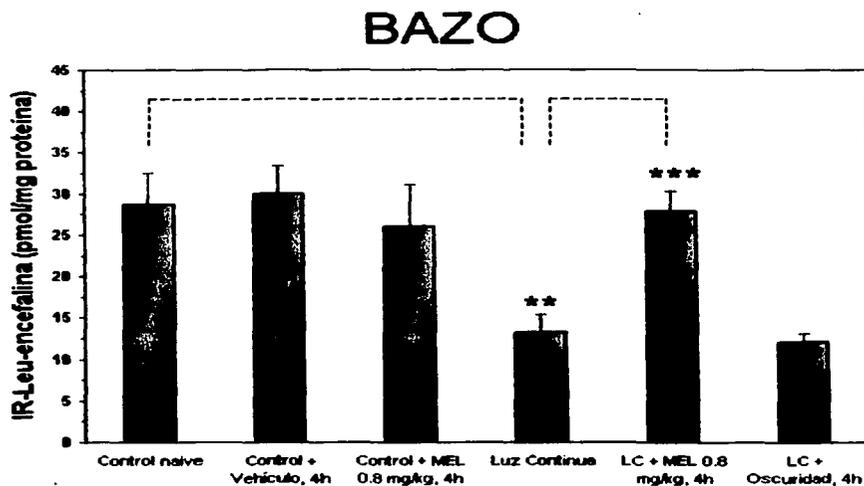
**Figura 3.12** En la figura se muestra el contenido de IR-Heptapéptido en el bazo. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio  $\pm$  e.e. ( $n=8$ ). Los niveles de significancia fueron calculados con la prueba de "t" de Student. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

En la figura 3.13, se muestra el contenido de IR-LE en el timo de la rata. En forma semejante a los dos péptidos descritos, el efecto del vehículo y de la hormona en exceso no modificó la concentración de leu-encefalina con respecto al grupo control *naive*. El grupo sometido a la luz continua, redujo la concentración de IR-LE en un 55% con respecto al control *naive* ( $p < 0.01$ ). Cuando se le administró MEL por vía exógena al grupo sometido a la luz continua, el contenido de IR-LE aumentó significativamente ( $> 116\%$ ), con respecto al grupo de luz continua ( $p < 0.001$ ). El grupo sometido a la oscuridad durante 4 h, no sufrió cambios con respecto al grupo de la luz continua.



**Figura 3.13** En la figura se muestra el contenido de IR-Leu-encefalina en el timo. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio  $\pm$  e.e. ( $n=8$ ). Los niveles de significancia fueron calculados con la prueba de "t" de Student. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

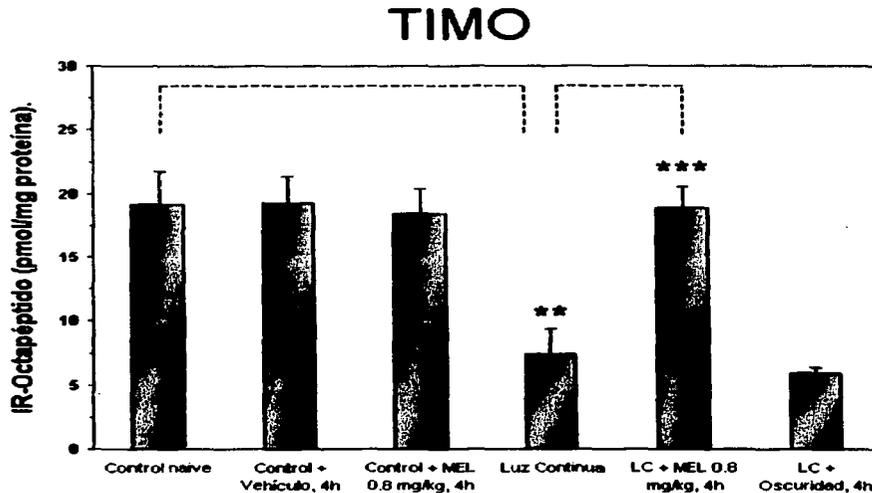
En la figura 3.14, que corresponde al bazo, el comportamiento de la concentración de IR-LE fue similar al del timo. Tanto el decremento en los animales con luz continua, como el aumento producido por la administración de MEL fueron del orden de 54% ( $p < 0.003$ ) y 112% ( $p < 0.0001$ ) respectivamente. En el grupo sometido a la oscuridad no hubo cambios con respecto a la luz continua. Los grupos control a los que se administró melatonina o el vehículo, tampoco se modificaron.



**Figura 3.14** En la figura se muestra el contenido de IR-Leu-encefalina en el bazo. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio  $\pm$  e.e. ( $n=8$ ). Los niveles de significancia fueron calculados con la prueba de "t" de Student. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

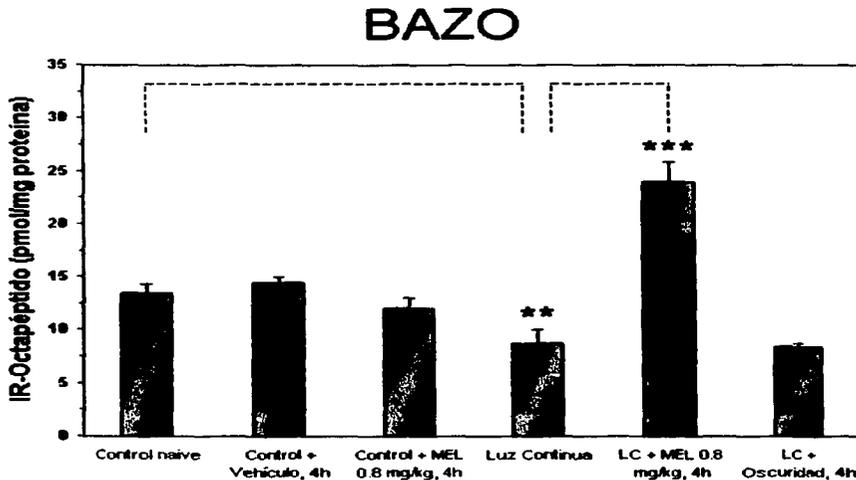
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la figura 3.15, se muestra el contenido de IR-OC en el timo de la rata. El comportamiento de este péptido es similar al descrito para IR-ME, IR-HE e IR-LE, con una disminución del 60% en el contenido tisular de IR-OC en el grupo de luz continua con respecto al control *naive* ( $p < 0.003$ ), y un incremento mayor al 150% en el grupo de animales de luz continua al que se administró melatonina exógena, con respecto a los animales en luz continua ( $p < 0.001$ ). En este órgano se observó que la administración de MEL y del vehículo a los animales control no modificó la concentración de IR-OC. Asimismo, en los animales sometidos a oscuridad durante 4 horas no se observaron cambios en el contenido de IR-OC con respecto al grupo en luz continua.



**Figura 3.15** En la figura se muestra el contenido de IR-Octapéptido en el timo. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio  $\pm$  e.e. ( $n=8$ ). Los niveles de significancia fueron calculados con la prueba de "t" de Student. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Finalmente en el bazo, al que corresponde la figura 3.16, el contenido de IR-OC disminuyó un 40% en el grupo de luz continua comparado con el control *naive* ( $p < 0.01$ ), y los animales a los que se administró MEL exógena después de un periodo de 15 de luz continua mostraron un incremento del 182% en el contenido de dicho péptido comparado con los animales que no recibieron la dosis de la hormona ( $p < 0.0001$ ). Al igual que en el timo, se observó que la administración de MEL y del vehículo a los animales control no modificó la concentración de IR-OC. Asimismo, en los animales sometidos a oscuridad durante 4 horas no se observaron cambios en el contenido de IR-OC con respecto al grupo en luz continua.



**Figura 3.16** En la figura se muestra el contenido de IR-Octapéptido en el bazo. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteína. Cada valor es el promedio  $\pm$  e.e. ( $n=8$ ). Los niveles de significancia fueron calculados con la prueba de "t" de Student. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Los resultados más relevantes del presente trabajo son los siguientes: 1) La falta de MEL endógena redujo el contenido tisular de encefalinas en órganos linfoides de la rata. 2) Una dosis alta y única de melatonina exógena en los animales carentes de la hormona incrementó significativamente el contenido de encefalinas en dichos órganos después de un lapso de cuatro horas. Estos datos sugieren que la presencia de la hormona está involucrada en la síntesis *de novo* de las encefalinas.

Hasta la fecha, una de las funciones más estudiadas de la MEL es la del control de los ritmos biológicos de varias hormonas y neurotransmisores en el SNC<sup>(11, 93)</sup>. Más aún, se ha demostrado que regulación de la síntesis, liberación y recaptura de varios neurotransmisores en el SNC está mediada por la MEL<sup>(7, 21)</sup>. La hipótesis de que esta hormona está involucrada en la síntesis de las encefalinas en el sistema inmune encuentra sustento en nuestros experimentos realizados a partir de los extractos concentrados de las células mononucleares tanto del timo como del bazo de la rata. En estos extractos, la concentración de IR-ME presenta el comportamiento ya descrito, es decir, la disminución del contenido de encefalina en los animales sometidos a la luz continua y el posterior incremento en un lapso de 4 h después de administrar la MEL en forma exógena. El efecto observado es mayor en el bazo que en el timo, y esto puede deberse a que la composición celular de cada uno de estos órganos es distinta. El timo está compuesto en un 99% por linfocitos T, mientras que el bazo contiene linfocitos T (30-40%), linfocitos B (50-60%) y células NK (1-5%)<sup>(83)</sup>. Asimismo, el timo es un órgano linfoide primario, conformado por células T en distintas etapas de maduración, mientras que el bazo es un órgano linfoide secundario que está constituido por células diferenciadas, maduras e inmunocompetentes. Las evidencias del Dr. Wajs y col. sugieren que la regulación que ejerce la MEL sobre la expresión del gen de la POMC, puede estar mediada por un mecanismo dependiente de las células B<sup>(89)</sup>. Por otra parte, se sabe que sólo las células de secreción regulada como son los macrófagos, son capaces de almacenar productos de

secreción biológicamente activos como los péptidos opioides <sup>(75)</sup>. Los linfocitos y los monocitos son células de secreción constitutiva, que producen y liberan péptidos derivados de la Proencefalina A (PEA) principalmente cuando están activados mediante agentes mitógenos <sup>(72, 75)</sup>. Los macrófagos se encuentran en mayor proporción en el bazo que en el timo, por lo que su contribución podría ser fundamental en la diferencia que se observa en el contenido tisular de IR-ME en ambos órganos linfoides.

Aunado a este conjunto de evidencias, en el bazo se ha demostrado que los receptores específicos de MEL ubicados en la membrana plasmática, presentan una mayor avidez por su ligando natural después de que los animales han sido pinealectomizados o bien sometidos a un periodo de luz continua<sup>(64)</sup>. Por lo tanto, es probable que los linfocitos B o los macrófagos sean más sensibles a la ausencia o presencia de MEL, que los linfocitos T. Nuestros resultados sugieren que la ausencia de MEL pudo haber inhibido la síntesis de péptidos opioides en el bazo y provocado un desequilibrio en la homeostasis celular, tal que las células después de haber sido sometidas a un periodo de quince días en luz continua presenten una mayor avidez por la MEL y como consecuencia se observe un aumento del 500% en la producción de encefalinas en un periodo de cuatro horas después de la administración de la hormona.

Un criterio de evaluación del procesamiento postraduccional de la PEA, es el análisis cuantitativo y/o cromatográfico de la Synencefalina<sup>(15, 41, 75, 82)</sup>. Este péptido, que es la porción no opioide de dicho precursor, comprende los aminoácidos 1 a 72 y no contiene la secuencia de las encefalinas <sup>(40)</sup>. Originalmente se observó, mediante estudios inmunohistoquímicos, que la Synencefalina muestra un patrón de distribución subcelular y anatómica similar a la Met-encefalina <sup>(40)</sup> y al utilizar la técnica del radioinmunoensayo se descubrió que ambos péptidos pueden ser liberados simultáneamente de las terminales nerviosas<sup>(41)</sup>. Sin embargo, a diferencia de las encefalinas, la Synencefalina no es degradada tan rápidamente por las enzimas extracelulares, de manera que su cuantificación se considera un parámetro más confiable para evaluar el procesamiento postraduccional de la PEA y la liberación de las encefalinas <sup>(15, 41, 75, 82)</sup>. Por lo tanto, en este trabajo se analizó

el perfil cromatográfico de la Synencefalina mediante la técnica de filtración molecular. Nuestros resultados indican que este péptido, así como sus posibles precursores bioquímicos de mayor peso molecular, se encuentran en menor concentración en las células mononucleares del timo y del bazo de las ratas deficientes de MEL. El perfil cromatográfico de la Synencefalina obtenido de ambos órganos linfoides es similar, y la mayor concentración de IR-Syn se observa en la región que corresponde a un peso molecular menor a 3.0 kDa. Esto es coherente con lo reportado por Saravia y cols.<sup>(75)</sup>, quienes describen el procesamiento postraducciona l de la porción opioide y no opioide de la PEA en células mononucleares del bazo y de la médula ósea. Sus evidencias demuestran la presencia de tres péptidos (<3.0 kDa) derivados de la Synencefalina en el bazo<sup>(75)</sup>.

En cuanto a la parte opioide de la PEA, la concentración de IR-LE y de sus posibles precursores bioquímicos en todo el perfil cromatográfico obtenido del timo, mostró también un decremento significativo en condiciones de falta de MEL. En conjunto, los datos arrojados por el procedimiento de cromatografía en columna de Sephadex G-100, apoyan la hipótesis de que la presencia de MEL está asociada a la síntesis de la PEA y su procesamiento postraducciona l hasta los péptidos biológicamente activos, en las células mononucleares provenientes de órganos linfoides como son el bazo y el timo.

Como una estrategia para apoyar la hipótesis antes mencionada, es preciso analizar los resultados obtenidos acerca del contenido tisular de los cuatro principales péptidos opioides derivados de la PEA, en muestras individuales de timo y de bazo. En primer lugar observamos que los grupos control *naive*, control + vehículo y control + MEL no presentaron cambios significativos en la concentración de los cuatro péptidos analizados. La información obtenida del grupo control que fue administrado con el vehículo permite descartar el hecho de que el dolor asociado a la inyección subcutánea de una sustancia disuelta en un mínimo porcentaje de etanol, produzca un aumento significativo en el contenido tisular de opioides en el sistema inmune. Por otra parte, los datos del grupo

control que recibió una dosis en exceso de MEL, sugieren que si el organismo tiene la concentración fisiológica de la hormona, un exceso de esta última no producirá efecto alguno sobre el contenido de los opioides en el sistema inmune, es decir que la homeostasis celular no se altera. Esto es coherente con los resultados de Mocchegiani y col. <sup>(54)</sup>, quienes en su estudio acerca de la participación del zinc y de la MEL en el restablecimiento de las funciones inmunes de animales pinealectomizados, reportan que la administración de MEL no presenta efectos nocivos en las funciones inmunes de los ratones falsos-operados, los cuales tienen la concentración fisiológica de la hormona <sup>(54)</sup>.

En segundo lugar se tiene la información obtenida de los animales sometidos a un periodo de 15 días con luz continua, en los que el contenido plasmático de la MEL se reduce significativamente durante las 24 horas del día <sup>(67)</sup>. Como se observa en las figuras 3.6 a 3.13 de los resultados, el contenido de IR-ME, IR-HE, IR-LE e IR-OC, se redujo significativamente ante la ausencia de melatonina endógena en los dos órganos linfoides analizados. Estos datos son similares a los reportados en el Sistema Nervioso Central, en el que la falta de melatonina endógena disminuyó el contenido y la liberación de las encefalinas en varias estructuras cerebrales <sup>(4)</sup>.

En el grupo de animales sometido a un periodo de cuatro horas de oscuridad después de 15 días con luz continua, no se observaron cambios significativos en los péptidos analizados. Dado que la disminución de la intensidad de luz induce la actividad de la enzima limitante en la síntesis de MEL, la N-acetiltransferasa <sup>(67)</sup>, se esperaba que la contribución de la MEL endógena producida durante cuatro horas de oscuridad provocara un aumento en el contenido de encefalinas en el sistema inmune, en similitud a lo observado en el SNC, en donde dicho lapso de oscuridad restablece el nivel basal de encefalinas <sup>(4)</sup>. Es posible que el periodo de cuatro horas no haya sido suficiente para que la síntesis *de novo* de las encefalinas en el sistema inmune se pudiera completar. Sería necesario realizar los experimentos pertinentes con lapsos mayores de oscuridad para determinar cuánto tiempo se requiere para observar el efecto del restablecimiento de la síntesis de MEL sobre el contenido de encefalinas en los órganos linfoides.

Finalmente, se tiene que la administración exógena de MEL a los animales carentes de la hormona, produjo un incremento superior al 100% en la concentración de los cuatro péptidos en los dos órganos linfoides analizados. Este incremento se produjo en un periodo de cuatro horas posterior a la administración de la MEL. El aumento en la concentración de los péptidos opioides por la presencia de la MEL en el sistema inmune, encuentra apoyo en los resultados reportados por el grupo del Dr. Wajs y col. <sup>(69)</sup>. Estos autores encontraron que la administración de MEL es capaz de inducir la expresión del gen que codifica para la síntesis de la Proopiomelanocortina (POMC), en la médula ósea y en los nódulos linfáticos. De la POMC se derivan varias hormonas peptídicas, como la MSH, ACTH y la  $\beta$ -endorfina, entre otras. En conjunto, estos datos sugieren que la MEL no sólo tiene una función como mensajero fotoneuroendocrino, sino que puede estar involucrada en la síntesis *de novo* de los neuropéptidos tanto en el SNC como en el sistema inmune. Al relacionar a la MEL con la posible regulación de la síntesis de las encefalinas en los órganos linfoides encontramos apoyo en las evidencias experimentales del Dr. Maestroni y col., quienes sugieren que el efecto inmunoestimulante que ejerce la MEL está mediado por los péptidos opioides <sup>(44, 45, 46, 47)</sup>.

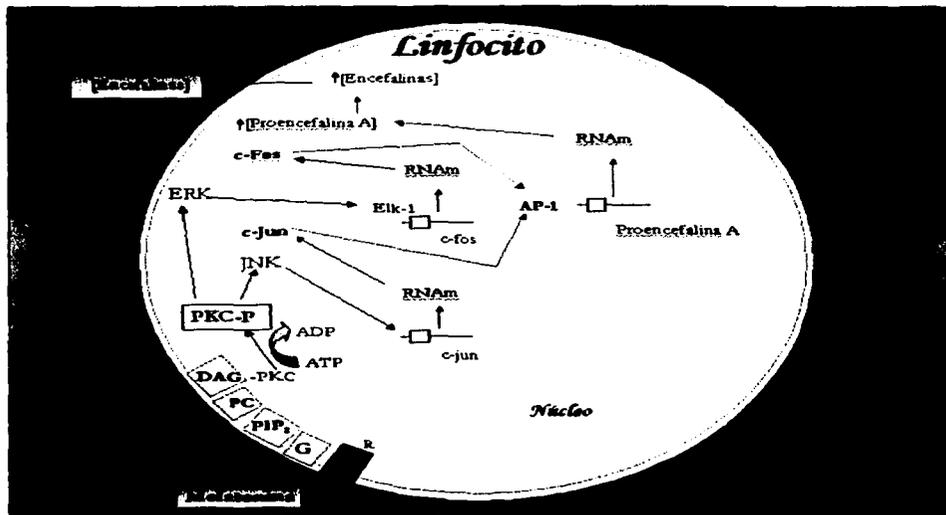
El mecanismo molecular mediante el que la MEL ejerce su efecto sobre los péptidos opioides en el sistema inmune no se ha dilucidado. Es reconocida la existencia de los receptores específicos de MEL en la membrana plasmática y en el núcleo celular, en el bazo y en el timo de la rata <sup>(62, 65)</sup>. Además, se sabe que la unión de MEL a los receptores membranales del tipo MT1 produce la activación de la fosfolipasa C (Phospholipase C: PC) <sup>(68)</sup> en el interior de la célula. Evidencias experimentales obtenidas de células de neuroblastoma N1E-115 y de neuronas hipotalámicas GT1, indican que la cascada de eventos intracelulares que se desencadenan de este modo, puede incluir el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular y la activación de la proteína cinasa C (Protein Kinase C: PKC) <sup>(2, 9, 10, 43, 74)</sup>. Las isoformas de PKC involucradas pueden variar según el tejido del que

se trate, por ejemplo, en células de neuroblastoma N1E-115 se ha demostrado que la melatonina activa la PKC- $\alpha$  <sup>(10)</sup>.

La PKC es capaz de fosforilar a otras proteínas cinasas, entre ellas las MAPK (mitogen-activated protein kinase: MAPK). De las tres familias que conforman a las MAPK (ERK, JNK y p38), se ha demostrado que varias isoformas de la PKC son capaces de activar a las cinasas ERK 1 y 2 (extracellular signal-regulated kinase: ERK) <sup>(17, 57, 74)</sup> y JNK (c-Jun N-terminal kinase: JNK) <sup>(16, 39, 53)</sup>. Estos estudios se han realizado en neuronas hipotalámicas, líneas celulares provenientes de la glándula tiroidea y de la glándula pituitaria, así como en plaquetas y en células de cáncer gástrico <sup>(16, 17, 39, 53, 57, 74)</sup>. Las enzimas ERK1/2 y JNK activan la expresión del ARN mensajero de los factores de transcripción Fos (c-fos, fra-1, fra-2) y Jun (c-jun, junB), que forman un heterodímero que se denomina AP-1 (activator protein-1: AP-1) <sup>(16, 34, 53, 74)</sup>. En particular, las proteínas ERK activadas pueden penetrar al núcleo y fosforilar al factor de transcripción Elk-1, que regula la expresión de c-Fos <sup>(32, 36)</sup>. Se ha demostrado que el factor de transcripción AP-1 induce la expresión del gen de la PEA <sup>(20, 34, 90, 91, 92, 95)</sup> en diversas estructuras y células del sistema nervioso central.

Aunado a este conjunto de evidencias, el grupo de Chan y col. ha demostrado que la estimulación de los receptores MT1 de la MEL están asociados a la activación de la JNK y la ERK <sup>(14)</sup>. Por su parte, Urata y col. han descrito que la MEL estimula la actividad de unión al ADN de la proteína AP-1 <sup>(84)</sup>. Finalmente, Kim y col. han asociado la fosforilación de la JNK con la regulación de la expresión del gen de la PEA, a través de c-Fos y c-Jun <sup>(34)</sup>. La inducción de la expresión del gen de la PEA tiene como consecuencia el aumento en el contenido tisular de las encefalinas. Con un mecanismo de acción similar al propuesto, el cual se esquematiza en la figura 4.1, sería posible explicar que la falta de MEL endógena genere una disminución significativa en el contenido de encefalinas en las células del sistema inmune.

El proyecto encaminado a explorar esta propuesta en cuanto a las posibles vías de señalización implicadas en la acción de la melatonina sobre la síntesis de los precursores opioides en el sistema inmune, está en puerta en nuestro laboratorio. Este proyecto deberá incluir, en primera instancia, el análisis del ARNm de la PEA mediante técnicas de biología molecular como es la RT-PCR.



**Figura 4.1** Posibles vías de señalización implicadas en el mecanismo molecular de acción de la melatonina sobre los péptidos opioides en los linfocitos.

En conclusión, en forma semejante a lo que ocurre en el Sistema Nervioso Central, la presencia de melatonina contribuye a mantener las concentraciones fisiológicas de las encefalinas en el sistema inmune. Además los resultados del presente trabajo sugieren que los cambios fisiológicos en la concentración de esta hormona están vinculados a la síntesis *de novo* de los péptidos opioides derivados de la PEA en las células del sistema inmune.

**CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFÍA**

1. AKIL H., WATSON S.J., YOUNG E., LEWIS M.E., KHACHATURIAN H., WALKER J.M., Endogenous opioids: Biology and Function. *Ann Rev Neurosci* 7:223-55 (1984).
2. ANTON-TAY F., RAMIREZ G., MARTINEZ I., BENITEZ-KING G., In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* 23(5):601-6. (1998).
3. ASAI M., GUTIÉRREZ R., Neurobiología de los péptidos opioides. *Salud Mental* 17(2): 30-41 (1994).
4. ASAI M. Efecto de la melatonina sobre el sistema endógeno opioide. XLII CNCF. (2000).
5. AUSTYN J.M., WOOD K.J., Principles of Cellular and Molecular Immunology; Oxford University Press; Hong Kong, págs. 55-61. (1993).
6. BARJAVEL M.J., MAMDOUH Z., RAGHBATE N., BAKOUCHE O., Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol* 160 (3):1191-7 (1998).
7. BENITEZ-KING G., Melatonina: del conocimiento básico a la aplicación clínica en psiquiatría. *Salud Mental* 22 : 57-61 (1999).
8. BENITEZ-KING G., El papel de la melatonina como modulador de la organización del citoesqueleto. *Salud Mental* 23(1) : 18-22 (2000).
9. BENITEZ-KING G., PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. *J Pineal Research* 29(1):8-14 (2000).
10. BENITEZ-KING G., HERNANDEZ M.E., TOVAR R., RAMIREZ G., Melatonin activates PKC-alpha but not PKC-epsilon in N1E-115 cells. *Neurochem Int* 39(2):95-102 (2001).
11. BINKLEY S., A timekeeping enzyme in the pineal gland. *Sci Am* 240(4): 50-5 (1979).
12. BLOM B., LIGTHART S.J., SCHOTTE R., SPITS H., Developmental origin of pre-DC2. *Hum Immunol* 63(12):1072-1080. (2002).

13. CARDINALI D.P., Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocrine Reviews* 2(3) : 327-346. (1981).
14. CHAN A.S., LAI F.P., LO R.K., VOYNO-YASENETSKAYA T.A., STANBRIDGE E.J., WONG Y.H., Melatonin MT1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 14(3): 249-57 (2002).
15. CHARNAY Y., LEGER L., ROSSIER J., JOUVET M., DUBOIS P.M., Evidence for synenkephalin-like immunoreactivity in pontobulbar monoaminergic neurons of the cat. *Brain Research* 335:160-164 (1985).
16. CHEN Y., WU Q., SONG S.Y., SU W.J., Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 8(6):1014-8 (2002).
17. CHOE Y., LEE B.J., KIM M., Participation of protein kinase C alpha isoform and extracellular signal-regulated kinase in neurite outgrowth of GT1 hypothalamic neurons. *J Neurochem* 83(6): 1412-22 (2002).
18. CURRIER N.L., SUN L.Z., MILLER S.C., Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J Neuroimmunol* 104(2):101-8 (2000).
19. DRAZEN D.L., BILU D., BILBO S.D., NELSON R.J., Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *AJP-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280(5): 1476-1482 (2001).
20. FU W., SHAH S.R., JIANG H., HILT D.C., DAVE H.P., JOSHI J.B., Transactivation of proenkephalin gene by HTLV-1 tax1 protein in glial cells: involvement of Fos/Jun complex at an AP-1 element in the proenkephalin gene promoter. *J Neurovirol* 3(1):16-27 (1997).
21. GARCÍA MARTÍNEZ E., La glándula pineal: un transductor fotoneuroendocrino. Precongreso Actualización en Fisiología. (1997).

22. GARCIA-MAURINO S., GONZALEZ-HABA M.G., CALVO J.R., RAFII-EL-IDRISSI M., SANCHEZ-MARGALET V., GOBERNA R., GUERRERO J.M., Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 159 (2):574-81 (1997).
23. GARCIA-MAURINO S., GONZALEZ-HABA M.G., CALVO J.R., GOBERNA R., GUERRERO J.M., Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 92(1-2):76-84 (1998).
24. GARCIA-MAURINO S., POZO D., CARRILLO-VICO A., CALVO J.R., GUERRERO J.M., Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci* 65(20):2143-50 (1999).
25. GARCIA-MAURINO S., POZO D., CALVO J.R., GUERRERO J.M., Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res* 29(3):129-37 (2000).
26. GARCÍA SEGOVIANO J.A., CAMPOS RODRÍGUEZ R., La glándula pineal y sus efectos en el sistema inmunológico.  
[www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES/ipn/academia/9/sec\\_10.htm](http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES/ipn/academia/9/sec_10.htm)
27. HARDELAND R., New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int J Biometeorol* 41:47-57 (1997).
28. HARDELAND R., Melatonin: multiple functions in signaling and protection. In: Altmeyer P., Hoffman K., Stücker M. (Eds.) *Skin Cancer and UV Radiation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 179-191. (1997).
29. HEDIN K.E., BELL M.P., KALLI K.R., HUNTOON C.J., SHARP B.M., MCKEAN D.J., Delta-opioid receptors expressed by Jurkat T cells enhance IL-2 secretion by increasing AP-1 complexes and activity of the NF-AT/AP-1-binding promoter element. *J Immunol* 159(11):5431-40 (1997).

30. HOUSE R.V., THOMAS P.T., BHARGAVA H.N., A comparative study of immunomodulation produced by in vitro exposure to delta opioid receptor agonist peptides. *Peptides* 17(1):75-81 (1996).
31. HUGHES J., KOSTERLITZ H.W., FOTHERGILL L.H., MORGAN B.A., MORRIS H., Identification of two related pentapeptides from the bovine brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 255:577 (1975).
32. ILES K.E., FORMAN H.J., Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res* 26(1-3):95-105 (2002).
33. KAVELAARS A., HEIJNEN C.J., Expression of preproenkephalin mRNA and production and secretion of enkephalins by human thymocytes. *Ann NY Acad Sci* 917 : 778-783 (2000).
34. KIM Y.H., CHOI S.S., LEE J.K., WON J.S., CHOI M.R., SUH H.W., Possible roles of JNK pathway in the regulation of hippocampal proenkephalin and immediate early gene expression induced by kainic acid. *Mol Cells* 11(2):144-50 (2001).
35. KOWALSKI J., Immunomodulatory action of class mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in mice. *Neuropeptides* 32(4):301-6 (1998).
36. KUKUSHKIN A.N., ABRAMOVA M.V., SVETLIKOVA S.B., DARIEVA Z.A., POSPELOVA T.V., POSPELOV V.A., Downregulation of c-fos gene transcription in cells transformed by E1A and cHa-ras oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at c-fos promoter. *Oncogene* 21(5): 719-30 (2002).
37. LABUNETS' I.F., Age-related changes in circadian and circannual fluctuations of the immune response and the number of cells in lymphoid organs of animals: a possible connection to thymic factors. *Fiziol Zh* 47(5): 54-62 (2001).
38. LERNER A.B., CASE J.D., TAKAHASHI Y., LEE T.H., MORE W., Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80 : 2587 (1958).
39. LEVI N.L., HANOCH T., BENARD O., ROZENBLAT M., HARRIS D., REISS N., NAOR Z., SEGER R., Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by

- gonadotropin releasing hormone in pituitary alpha T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42. *Mol Endocrinol* 12(6): 815-24 (1998).
40. LISTON D. R., VANDERHAEGHEN J. J., ROSSIER J., Presence in brain of synenkephalin, a proenkephalin-immunoreactive protein which does not contain enkephalin. *Nature* 302(3):62-65 (1983).
41. LISTON D. R., ROSSIER J., Synenkephalin is coreleased with Met-Enkephalin from neuronal terminals in vitro. *Neuroscience Letters* 48: 211-216 (1984).
42. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275 (1951).
43. LUPOWITZ Z., RIMLER A., ZISAPEL N., Evaluation of signal transduction pathways mediating the nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. *Cell Mol Life Sci* 58(14): 2129-35 (2001).
44. MAESTRONI G.J., CONTI A., PIERPAOLI W., Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin exp Immunol* 68: 384-391 (1987).
45. MAESTRONI G.J., CONTI A., PIERPAOLI W., The pineal gland and the circadian, opiate, immunoregulatory role of melatonin. *Ann NY Acad Sci* 496:67-77 (1987).
46. MAESTRONI G.J., CONTI A., PIERPAOLI W., Role of the pineal gland in immunity: III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 63 (3): 465-9 (1988).
47. MAESTRONI G.J., CONTI A., Immuno-derived opioids as mediators of the immuno-enhancing and anti-stress action of melatonin. *Acta Neurol* 13 (4):356-60 (1991).
48. MAESTRONI G.J., CONTI A., LISSONI P., Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res* 54 (17): 4740-3 (1994).
49. MAESTRONI G.J., COVACCI V., CONTI A., Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony stimulating factor induced by

- the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing, mice. *Cancer Res* 54(9):2429-32 (1994).
50. MAESTRONI G.J., T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* 18(2):84-9 (1995).
51. MAESTRONI G.J., The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol* 43(3):186-92 (1998).
52. MAZUMDER S., NATH I., DHAR M.M., Immunomodulation of human T cell responses with receptor selective enkephalins. *Immunol Lett* 35(1):33-8 (1993).
53. MITSUTAKE N., NAMBA H., SHKLYAEV S.S., TSUKAZAKI T., OHTSURU A., OHBA M., KUROKI T., AYABE H., YAMASHITA S., PKC delta mediates ionizing radiation-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase through MKK7 in human thyroid cells. *Oncogene* 20(8):989-96 (2001).
54. MOCCHEGIANI E., BULIAN D., SANTARELLI L., TIBALDI A., MUZZIOLI M., LESNIKOV V., PIERPAOLI W., FABRIS N., The zinc pool is involved in the immune-reconstituting effect of melatonin in pinealectomized mice. *J Pharmacol Exp Ther* 277(3):1200-8. (1996).
55. MORGAN E.L., Regulation of human B lymphocyte activation by opioid peptide hormones. Inhibition of IgG production by opioid receptor class ( $\mu$ -,  $\kappa$ -, and  $\delta$ -) selective agonists. *J Neuroimmunol* 65(1):21-30 (1996).
56. MORREY K.M., McLACHLAN J.A., SERKIN C.D., BAKOUCHE O., Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 153(6):2671-80 (1994).
57. NADAL-WOLLBOLD F., PAWLOWSKI M., LEVY-TOLEDANO S., BERROU E., ROSA J.P., BRYCKAERT M., Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or R-Raf. *FEBS Lett* 531(3):475-82 (2002).
58. NGUYEN K., MILLER B.C., CD28 costimulation induces delta opioid receptor expression during anti-CD3 activation of T cells. *J Immunol* 168(9):4440-5 (2002).

59. OLSON G., OLSON R., KASTIN J., Endogenous opiates: 1988 *Peptides* 10:1253-1280 (1989).
60. OPPENHEIM J.J., SHEVACH E.M., Immunophysiology, The Role of Cells and Cytokines in Immunity and Inflammation; Oxford University Press; E.U.A., págs. 34-37. (1990).
61. PADROS M.R., VINDROLA O., ZUNSZAIN P., FAINBOIN L., FINKIELMAN S., NAHMOD V.E., Mitogenic activation of the human lymphocytes induce the release of proenkephalin derived peptides. *Life Sci* 45 (19) : 1805-1811 (1989).
62. POZO D., DELGADO M., FERNÁNDEZ-SANTOS J.M., CALVO J.R., GOMARIZ R.P., MARTIN-LACAVE I., ORTIZ G.G., GUERRERO J.M., Expression of the Mella-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J* 11 (6): 466-73 (1997).
63. PRZEWLOCKI R., HASSAN A.H.S., LASON W., EPPLEN C., HERZ A., STEIN C., Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception. *Neuroscience* 48(2) : 491-500 (1992).
64. RAFII-EL-IDRISSI M., CALVO J.R., GIORDANO M., GUERRERO J.M., Specific binding of 2-[125I]iodomelatonin by rat spleen crude membranes: day-night variations and effect of pinealectomy and continuous light exposure. *J Pineal Res* 20(1):33-8 (1996).
65. RAFII-EL-IDRISSI M., CALVO J.R., HARMOUCH A., GARCIA-MAURINO S., GUERRERO J.M., Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. *J Neuroimmunol* 86(2):190-7 (1998).
66. RAY A., MEDIRATTA P.K., SEN P., Modulation by naltrexone of stress-induced changes in humoral immune responsiveness and gastric mucosal integrity in rats. *Physiol Behav* 51(2):293-6 (1992).
67. REITER R.J., The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664 (1993).

68. REITER R.J., POEGGELER B., TAN D., CHEN L., MANCHESTER L.C., GUERRERO J.M., Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 15:103-115 (1993).
69. REITER R.J., CABRERA J., SAINZ R.M., MAYO J.C., MANCHESTER L.C., TAN D.X., Melatonin as a pharmacological agent against neuronal loss in experimental models of Huntington's disease, Alzheimer's disease and parkinsonism. *Ann N Y Acad Sci* 890:471-85 (1999).
70. RODRÍGUEZ-MANZO G., ASAI M., FERNÁNDEZ-GUASTI A., Evidence for changes in brain enkephalin contents associated to male rat sexual activity. *Behavioural Brain Research* 131:47-55 (2002).
71. ROITT I.M., BROSTOFF J., MALE D.K., Inmunología; 3a. edición; Ediciones Científicas y Técnicas S.A.; España, Capítulos 2 y 3. (1994).
72. ROSEN H., BEHAR O., ABRAMSKY O., OVADIA H., Regulated expression of proenkephalin A in normal lymphocytes. *J Immunol* 143 : 3703-3707 (1989).
73. ROUILLE Y., DUGUAY S.J., LUND K., FURUTA M., GONG Q., LIPKIND G., STEINER D.F., Proteolytic processing mechanism in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Frontiers in Neuroendocrinology* 16:322-361 (1995).
74. ROY D., BELSHAM D.D., Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons. Signal transduction mechanisms. *J Biol Chem* 277(1):251-258 (2002).
75. SARAVIA F., ASE A., ALOYZ R., KLEID M.C., RODRÍGUEZ M.I., NAHMOD V.E., VINDROLA O., Differential posttranslational processing of Proenkephalin in rat bone marrow and spleen mononuclear cells: Evidence for Synenkephalin cleavage. *Endocrinology* 132(4):1431-1437. (1993).
76. SHARP B.M., MCKEAN D.J., MCALLEN K., SHAHABI N.A., Signaling through delta opioid receptors on murine splenic T cells and stably transfected Jurkat cells. *Ann N Y Acad Sci* 840:420-4 (1998).

77. SHARP B.M., LI M.D., MATTA S.G., MCALLEN K., SHAHABI N.A., Expression of delta opioid receptors and transcripts by splenic T cells. *Ann N Y Acad Sci* 917:764-70 (2000).
78. SHARP B.M., MCALLEN K., GEKKER G., SHAHABI N.A., PETERSON P.K., Immunofluorescence detection of delta opioid receptors (DOR) on human peripheral blood CD4+ T cells and DOR-dependent suppression of HIV-1 expression. *J Immunol* 167(2):1097-102 (2001).
79. SINGH V.K., BAJPAI K., NARAYAN P., YADAV V.S., DHAWAN V.C., HAQ W., MATHUR K.B., AGARWAL S.S., Delta-opioid receptor antagonist inhibits immunomodulation by Met-enkephalin analogs. *Neuroimmunomodulation* 6(5):355-60 (1999).
80. STEINER D.F., The protein convertases. *Curr Op Chem Biol* 2:31-39 (1998).
81. STEINHILBER D., BRUNGS M., WERZ O., WIESENBERG I., DANIELSSON C., KAHLEN J.P., NAYERI S., SCHRADER M., CARLBERG C., The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 270(13):7037-40 (1995).
82. STELL W.K., CHAMINADE M., METTERS K.M., ROUGEOT C., DRAY F., ROSSIER J., Detection of Synenkephalin, the amino-terminal portion of proenkephalin, by antisera directed against its carboxyl terminus. *J Neurochem* 54(2):436-443 (1990).
83. STITES D.P., TERR A.I., PARSLow T.G., Inmunología básica y clínica; 9a. edición; Editorial El Manual Moderno; México (1998).
84. URATA Y., HONMA S., GOTO S., TODOROKI S., HIDA T., CHO S., HONMA K., KOND T., Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 27(7-8)-838-47 (1999).
85. VANECEK J., Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Reviews* 78: 687-721. (1998).

86. VINDROLA O., PADRÓS M.R., STERIN-PRYNC A., ASE A., FINKIELMAN S., NAHMOD V., Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin. *J Clin Invest* 86 : 531-537 (1990).
87. VINDROLA O., PADRÓS M.R., BAUTISTA D., Opioides endógenos en la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. Precongreso Actualización en Fisiología. (1997).
88. VON GALL C., STEHLE J.H., WEAVER D.R., Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309(1):151-62 (2002).
89. WAJS E, KUTOH E, GUPTA D: Melatonin affects proopiomelanocortin gene expression in the immune organs of the rat. *Eur J Endocrinol*, 133: 754-60, (1995).
90. WON J.S., SONG D.K., KIM Y.H., HUH S.O., SUH H.W., The stimulation of rat astrocytes with phorbol-12-myristate-13-acetate increases the proenkephalin mRNA: involvement of proto-oncogenes. *Brain Res Mol Brain Res* 54(2):288-97 (1998).
91. WON J.S., SONG D.K., HUH S.O., KIM Y.H., SUH H.W., Effect of melatonin on the regulation of proenkephalin and prodynorphin mRNA levels induced by kainic acid in the rat hippocampus. *Hippocampus* 10(3):236-43 (2000).
92. WON J.S., KIM Y.H., SONG D.K., HUH S.O., LEE J.K., SUH H.W., Stimulation of astrocyte-enriched culture with arachidonic acid increases proenkephalin mRNA: involvement of proto-oncoprotein and mitogen activated protein kinases. *Brain Res Mol Brain Res* 76(2):396-406 (2000).
93. WURTMAN R.J., The effects of light on the human body. *Sci Am* 233(1):68-77 (1975).
94. YOUNG M.W., The tick-tock of the biological clock. *Sci Am* 282(3):46-53 (2000).
95. ZIOLKOWSKA B., PRZEWLOCKA B., MIKA J., LABUZ D., PRZEWLOCKI R., Evidence for Fos involvement in the regulation of proenkephalin and prodynorphin gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 54(2):243-51 (1998).

**APÉNDICE I.****PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES****Disolución salina balanceada (BSS), pH = 7.3**

Se prepara a partir de dos disoluciones acuosas concentradas (10X)

**Disolución #1.**

- Dextrosa	55.5 mM	10.0 g/L
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	4.4 mM	0.6 g/L
- $\text{NaHPO}_4$ anhidro	13.3 mM	1.89 g/L
- Rojo de fenol	0.001 %	

**Disolución #2.**

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12.6 mM	1.86 g/L
- KCl	53.6 mM	4.0 g/L
- NaCl	1.37 M	80.0 g/L
- $\text{MgCl}_2$ anhidro	10.9 mM	1.04 g/L
- $\text{MgSO}_4$ anhidro	8.1 mM	0.97 g/L

Para preparar 1 L de BSS 1X se toman 100 mL de la disolución #1 y 100 mL de la disolución #2, se mezclan y se agregan aproximadamente 600 mL de agua desionizada. Se ajusta el pH en un rango de 7.2 a 7.4 con NaOH 0.1 M. Finalmente se agrega agua desionizada hasta el volumen deseado utilizando un matraz volumétrico.

**Técnica Lowry para cuantificación espectrofotométrica de proteínas <sup>(42)</sup>**

- Disoluciones de trabajo

- a)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%

Pesar 10 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 2 g de NaOH; llevar a 500 mL de agua desionizada.

- b)  $\text{CuSO}_4$  al 1%

Pesar 5 g de  $\text{CuSO}_4$ ; llevar a 500 mL de agua desionizada.

c) Tartrato de sodio y potasio al 2 %

Pesar 10 g de tartrato de sodio y potasio; llevar a 500 mL de agua desionizada.

d) NaOH 0.4 N

- Reactivo A (reactivo alcalino de cobre) → Mantener en agitación hasta su uso.
  - 50 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%
  - 0.5 de  $\text{CuSO}_4$  al 1%
  - 0.5 mL de tartrato de sodio y potasio al 2 %
- Reactivo B
  - Fenol Folin-Ciocalteu en proporción 1:1 con agua desionizada
  - Preparar el reactivo justo antes de agregarlo a los tubos; sensible a la luz.

### **Radioinmunoensayo (RIA)**

#### Disoluciones amortiguadoras

- Disolución de Fosfatos 0.05 M pH=7.4
 

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.76 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4.26 g/L
NaCl	9.00 g/L
$\text{Na}_3\text{N}$	0.20 g/L
Gelatina	1.00 g/L (se disuelve en agua destilada caliente, se deja enfriar y se agrega a la disolución después de haber ajustado el pH).
- Carbón activado pH=7.4
 

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.76 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4.26 g/L
NaCl	9.00 g/L

Na<sub>3</sub>N                    0.20 g/L  
 Dextran                1.25 g/L  
 Carbón activado    12.5 g/L. (se agrega después de haber ajustado el pH)

Tabla de R.f. de las encefalinas monoyodadas.

<sup>125</sup> I – Péptido	Factor de retención (R.f.)
Met-encefalina	0.33
Leu-encefalina	0.71
Heptapéptido	0.61
Octapéptido	0.35

TESIS  
 FALLA DE ORIGEN

Tabla de reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados <sup>(70)</sup>.

Péptido	% Reactividad cruzada			
	Anti-ME	Anti-LE	Anti-OC	Anti-HE
Met-(o)-encefalina	100.00	<0.01	<0.01	<0.01
Met-encefalina	2.90	3.83	<0.01	<0.01
Leu-encefalina	0.01	100.00	<0.01	<0.01
Met-encefalina-Arg	0.76	0.53	<0.01	<0.01
Leu-encefalina-Arg	<0.01	4.33	<0.01	<0.01
Met-encefalina-Arg-Phe	<0.01	0.37	<0.01	100.00
Met-encefalina-Arg-Gly-Leu	<0.01	<0.01	100.00	<0.01
Dinorfina 1-8	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
α-endorfina	<0.01	<0.01	<0.01	-
β-endorfina	<0.01	<0.01	<0.01	-
γ-endorfina	<0.01	<0.01	<0.01	-

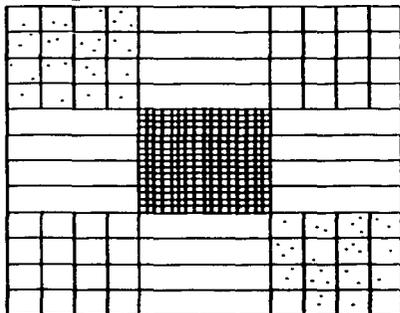
## PROCEDIMIENTOS

### Conteo de células en cámara de Neubauer

- a. A partir de la suspensión de células mononucleares se realizó una dilución adecuada para contar fácilmente en los cuadrantes para cuenta de leucocitos (exteriores). Se puede contar en los cuatro cuadrantes o bien, en dos cuadrantes que se encuentren en esquinas contrarias.
- b. Para aplicar la muestra en la cámara de Neubauer, se colocó la cámara en una superficie plana, se colocó el cubreobjetos de la cámara sobre el área en la que están grabados los cuadrantes y por un extremo del cubreobjetos se aplicaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra con una micropipeta. La cámara se llenó por capilaridad.
- c. Se enfocó en el microscopio con el objetivo 10X y posteriormente se observó con el objetivo 40 X. Se ubicaron los cuadrantes en los que se contó. Los cuadrantes para cuenta de leucocitos están divididos a su vez en 16 cuadros. Se inició por el extremo superior izquierdo y se contó hacia la derecha cada cuadro en forma de L, es decir, si había células en los límites sólo se contaron las que estaban en los bordes izquierdo e inferior. Al cambiar a la línea inferior, se contó cada cuadro en L invertida, es decir, se comenzó de derecha a izquierda y las células que quedaron en los límites sólo se contaron en los bordes derecho e inferior de cada cuadro.
- d. Las dimensiones de un cuadrante de la cámara de Neubauer son: 1 mm x 1 mm x 0.1 mm de profundidad, por lo tanto, el volumen de cada cuadrante es de 0.1  $\text{mm}^3$  o bien 0.0001 mL.
- e. De este modo, para calcular el número de células por mililitro de muestra se consideró la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células/ mL} = (\text{No. de células} * \text{dilución}) / (\text{No. de cuadrantes} * 0.0001 \text{ mL})$$

Ejemplo:



No. de células contadas = 55  
 No. de cuadrantes contados = 2  
 Dilución 1:100

$$\text{No. de células/mL} = (55 \text{ células} \times 100) / (2 \times 0.0001 \text{ mL})$$

$$\text{No. de células/mL} = 27.5 \times 10^6$$

---

## GLOSARIO

- **Aminoácidos básicos:** arginina (Arg), lisina (Lys) e histidina (His). Tienen una carga neta positiva a  $\text{pH} = 7.0$ .
- **AP-1:** proteína activadora-1, es un factor de transcripción constituido por un heterodímero de las proteínas c-Fos y c-Jun.
- **Células mononucleares:** conjunto de monocitos-macrófagos y linfocitos.
- **Células presentadoras de antígeno (APC):** células capaces de internalizar los antígenos, procesarlos enzimáticamente y presentar sus epítopes en la superficie de la membrana plasmática. Las principales APC son las células dendríticas y los macrófagos.
- **Circadiano:** que se repite aproximadamente cada 24 horas.
- **Citocina:** nombre genérico que reciben las sustancias secretadas por las células del sistema inmune, entre las que se encuentran las interleucinas, los interferones y los factores de necrosis tumoral.
- **Factores de transcripción:** proteínas que se unen en secuencias reguladoras del DNA, por lo general en regiones promotoras ubicadas hacia el extremo 5' de la cadena. Al unirse al DNA pueden aumentar o disminuir la tasa de transcripción de sus genes blanco.
- **Fos:** familia de factores de transcripción que incluye a las proteínas c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2.
- **Glándula pineal:** órgano neuroendocrino ubicado entre los dos hemisferios cerebrales, justo bajo el techo del tercer ventrículo. En anfibios, peces y reptiles tiene células fotosensibles por lo que se le llama "tercer ojo".
- **Interleucinas:** sustancias de origen proteico que intervienen en la fisiología del sistema inmune.
- **Jun:** familia de factores de transcripción que incluye a las proteínas c-Jun, JunB y JunD.

- **Linfocito B:** célula de origen linfoide. Al ser activada genera una clona de células plasmáticas que son las efectoras de la respuesta inmune humoral.
- **Linfocito T:** célula de origen linfoide, que al ser activada genera una clona de células efectoras de la respuesta inmune celular.
- **Lux:** es la iluminación de una superficie que recibe un flujo luminoso uniforme de 1 lumen por metro cuadrado.
- **Macrófago:** célula con actividad fagocítica que se diferencia a partir de los monocitos. Tiene función de célula presentadora de antígeno.
- **Melatonina:** N-acetil-5-hidroxitriptamina, hormona que se produce principalmente en la glándula pineal en los vertebrados. Se produce también en invertebrados, plantas, organismos unicelulares eucariontes y procariontes.
- **Núcleo supraquiásmático:** estructura ubicada en la parte anterior del hipotálamo, que tiene la función de un reloj biológico.
- **Parénquima:** parte funcional de un órgano.
- **Péptidos opioides:** neuropéptidos que se unen a los receptores opioides.
- **PKC:** proteína cinasa C, es una enzima capaz de fosforilar a otras proteínas o enzimas.
- **Quimiotaxis:** movimiento dirigido mediante sustancias químicas.
- **Respuesta inmune celular:** respuesta inmune mediada por células.
- **Respuesta inmune humoral:** respuesta inmune mediada por anticuerpos.
- **RZR/ROR:** receptores retinoidales Z/receptores retinoidales huérfanos, constituyen una familia de receptores nucleares cuyo ligando es la melatonina.
- **Sephadex:** es un material para cromatografía capaz de separar las moléculas de acuerdo a su masa. Está conformado por partículas esféricas de dextran.
- **Serotonina:** neurotransmisor clásico derivado del triptofano.
- **Sistema fagocitario mononuclear:** conjunto de macrófagos que se han diferenciado e incorporado a los órganos y tejidos.

- **Sistema linfoide:** conjunto de órganos y tejidos en los que se producen y maduran las células del sistema inmune.
- **Trabéculas:** tabiques formados de tejido conjuntivo que sostienen el parénquima de un órgano.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- ACTH: Hormona adrenocorticotrópica
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMPc: Adenosina-monofosfato cíclico
- AP-1: Proteína activadora-1
- APC: Célula presentadora de antígeno
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- BCR: Receptor de células B
- $\beta$ -End:  $\beta$ -Endorfina
- BSA: Albúmina sérica bovina
- BSS: Solución salina balanceada
- CaM: Calmodulina
- ERK: Cinasas reguladas por señal extracelular
- GCS: Ganglios cervicales superiores
- GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
- HE: Heptapéptido
- HIOMT: Hidroxiindol-O-metiltransferasa
- HSC: Células madre hematopoyéticas
- IL: Interleucina
- IFN: Interferón
- IR: Inmuno-reactividad
- JNK: Cinasa del extremo  $-NH_2$  de c-Jun
- LC: Luz continua
- LE: Leu-Encefalina
- LPS: Lipopolisacárido
- MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas
- MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos
- ME: Met-Encefalina
- MEL: Melatonina
- MHC: Complejo principal de histocompatibilidad
- MSH: Hormona estimulante de melanocitos
- NA: Noradrenalina
- NAT: N-Acetiltransferasa
- NK: Células agresoras naturales
- NSQ: Núcleo supraquiasmático
- OC: Octapéptido
- PALS: Lámina linfoide periarteriolar
- PC: Fosfolipasa C
- PC1 y 2: Proteína convertasa 1 y 2
- PDNF: Prodinorfina

- **Sistema linfoide:** conjunto de órganos y tejidos en los que se producen y maduran las células del sistema inmune.
- **Trabéculas:** tabiques formados de tejido conjuntivo que sostienen el parénquima de un órgano.

- **Sistema linfoide: conjunto de órganos y tejidos en los que se producen y maduran las células del sistema inmune.**
- **Trabéculas: tabiques formados de tejido conjuntivo que sostienen el parénquima de un órgano.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH: Hormona adrenocorticotrópica
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMPc: Adenosina-monofosfato cíclico
- AP-1: Proteína activadora-1
- APC: Célula presentadora de antígeno
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- BCR: Receptor de células B
- $\beta$ -End:  $\beta$ -Endorfina
- BSA: Albúmina sérica bovina
- BSS: Solución salina balanceada
- CaM: Calmodulina
- ERK: Cinasas reguladas por señal extracelular
- GCS: Ganglios cervicales superiores
- GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
- HE: Heptapéptido
- HIOMT: Hidroxiindol-O-metiltransferasa
- HSC: Células madre hematopoyéticas
- IL: Interleucina
- IFN: Interferón
- IR: Inmuno-reactividad
- JNK: Cinasas del extremo -NH<sub>2</sub> de c-Jun
- LC: Luz continua
- LE: Leu-Encefalina
- LPS: Lipopolisacárido
- MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas
- MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos
- ME: Met-Encefalina
- MEL: Melatonina
- MHC: Complejo principal de histocompatibilidad
- MSH: Hormona estimulante de melanocitos
- NA: Noradrenalina
- NAT: N-Acetiltransferasa
- NK: Células agresoras naturales
- NSQ: Núcleo supraquiasmático
- OC: Octapéptido
- PALS: Lámina linfoide periarteriolar
- PC: Fosfolipasa C
- PC1 y 2: Proteína convertasa 1 y 2
- PDNF: Prodinorfina

- **PEA: Proencefalina A**
- **PKC: Proteína cinasa C**
- **POMC: Proopiomelanocortina**
- **R.f.: Factor de retención**
- **RIA: Radioinmunoensayo**
- **ROR: Receptores retinoidales huérfanos**
- **RZR: Receptores retinoidales Z**
- **SNC: Sistema Nervioso Central**
- **SSI: Solución salina isotónica**
- **Syn: Synencefalina**
- **T<sub>H</sub>: Linfocitos T cooperadores**
- **T<sub>C</sub>: Linfocitos T citotóxicos**
- **TCR: Receptor de células T**
- **TNF: Factor de necrosis tumoral**