



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA RELACIÓN BIOQUÍMICA-  
FUNCIONAL ENTRE LA MELATONINA Y LOS  
PÉPTIDOS OPIOIDES EN EL SISTEMA INMUNE  
DE LA RATA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MARCELA VALDÉS TOVAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ASAI CAMACHO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2007



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.

**AGRADECIMIENTOS  
POR EL APOYO RECIBIDO**

**Al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)  
(Beca No. 182367)**

**Al Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”,  
Dirección de Investigaciones en Neurociencias,  
Laboratorio de Análisis Químicos.**

**A los miembros de mi Comité Tutorial:**

**Dr. Miguel Asai Camacho**

**Dr. Fernando García Tamayo**

**Dra. Martha León Olea**

**A MIS PADRES**

por la vida

y

**A LA VIDA**

por brindarme más de una  
oportunidad y poner en mi camino  
a la gente que incondicionalmente  
me apoyó en la realización de  
este proyecto

## ÍNDICE

ABSTRACT.....	i
RESUMEN.....	ii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La melatonina: su síntesis.....	3
1.2 Mecanismos de acción de la melatonina.....	7
1.2.1 Unión a receptores.....	7
1.2.2 Difusión libre a través de la membrana plasmática.....	7
1.3 Metabolismo y excreción de la melatonina.....	8
1.4 Funciones de la melatonina.....	8
1.5 El sistema linfoide.....	10
1.6 Efectos de la melatonina sobre el sistema inmune.....	14
1.7 Fisiología de los péptidos opioides.....	17
1.8 Participación de los péptidos opioides en la fisiología del sistema inmune.....	21
1.9 Hipótesis.....	26
1.10 Objetivos.....	26
CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
2.1 Animales.....	27
2.2 Diseño experimental.....	27
2.3 Cuantificación de melatonina sérica por la metodología ELISA.....	28
2.4 Disección del bazo.....	29
2.5 Obtención de suspensiones celulares a partir del bazo de la rata.....	30
2.6 Liberación in vitro de péptidos opioides a partir de células del bazo de la rata.....	31
2.7 Determinación de proteínas.....	32
2.8 Radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de las encefalinas.....	32
2.8.1 Reacción de yodación.....	33
2.8.2 Cromatografía en capa fina.....	33
2.8.3 Autorradiografía.....	34
2.8.4 Extracción del péptido marcado.....	35
2.8.5 Purificación de <sup>125</sup> I – Synencefalina.....	35
2.8.6 Curvas patrón.....	36
2.8.7 Procedimiento para el RIA.....	36
2.9 Determinación de células formadoras de anticuerpos IgM anti-eritrocitos de camero. Técnica de Cunningham-Szenberg.....	38
2.10 Determinación de células secretoras de citocinas. Ensayo ELISpot para IL-2 y para IFN- $\gamma$ de rata.....	39
2.11 Separación de células mononucleares de bazo de rata por centrifugación con Ficoll-Paque. Obtención de extractos de células mononucleares de bazo para su posterior análisis por electroforesis en poliacrilamida -SDS y Western Blot.....	40
2.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida- SDS (SDS-PAGE).....	42
2.13 Western blot.....	42
2.14 Análisis estadístico.....	44
CAPÍTULO III. RESULTADOS.....	45
3.1 Curva patrón para la cuantificación de MEL sérica por la metodología ELISA.....	45
3.2 Curva patrón para la determinación de proteínas mediante la técnica de Lowry.....	46
3.3 Curva patrón para la cuantificación de encefalinas mediante radioinmunoensayo.....	46

---

3.4 Cuantificación de melatonina sérica.....	47
3.5 Liberación in vitro de péptidos opioides a partir de células mononucleares del bazo.....	48
3.6 Determinación de células formadoras de anticuerpos IgM <sub>1</sub> específicos contra eritrocitos de camero. ....	52
3.7 Evaluación del efecto de la MEL y los opioides sobre la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$ .....	52
3.7 Western blot para Proencefalina A en extractos de células mononucleares del bazo de la rata.....	57
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	73
ABREVIATURAS.....	74
APÉNDICE.....	75
PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.....	75
Disolución salina balanceada (BSS), pH = 7.3.....	75
Disolución alto potasio (BSS + K <sup>+</sup> 50 mM), pH=7.3.....	75
Disolución hemolizante (Tris/NH <sub>4</sub> Cl), pH=7.2.....	75
Azul tripano 0.4%.....	76
Disoluciones concentradas y disoluciones de trabajo para la técnica de Lowry para cuantificación espectrofotométrica de proteínas.....	76
Reactivo A (reactivo alcalino de cobre).....	76
Disoluciones de trabajo para Radioinmunoensayo (RIA).....	77
Sistema de disoluciones de Laemmli para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	77
TABLAS.....	80
Tabla de R.f. de las encefalinas monoyodadas.....	80
Tabla de reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados.....	80
PROCEDIMIENTOS.....	81
Conteo de células en cámara de Neubauer.....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	83

**ABSTRACT**

Several authors have suggested a biochemical and functional relationship between the pineal hormone melatonin (MEL) and opioid peptides in the immune system. In this sense, MEL immunoenhancing properties might be mediated by an opioidergic mechanism. Based on their immunomodulatory effects, enkephalins have been considered as cytokines. Since cytokine regulation is a mechanism through which MEL acts on immune physiology, the aim of this study was to explore the effect of functional pinealectomy in opioid peptides, IL-2 and IFN- $\gamma$  secretion from rat splenocytes, in a context of primary immune response towards sheep red blood cells (SRBC). Splenocytes from rats exposed to an antigenic challenge *in vivo*, showed an increase in Met-Enkephalin (MENk), MENk-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, Synenkephalin (Syn) and IL-2 secretion compared to the non-immunized groups. MENk-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, IL-2 and IFN- $\gamma$  secretion decreased after functional pinealectomy. Exogenous MEL administration counteracted this effect and increased MENk, Syn, IL-2 and IFN- $\gamma$  secretion, which reached similar or higher values than those of the control groups. Also, exogenous MENk counteracted the effect of MEL absence on the number of IFN- $\gamma$  secretor cells. MEL effect on cytokine secretion might be mediated through its membrane and nuclear receptors, as well as through an opioidergic mechanism since Naloxone blocked its effect and MENk reestablish cytokine secretion on functionally pinealectomized rats. Taken together, our findings strongly supports that the physiological relation between MEL and opioid peptides plays a pivotal role in immunomodulation, particularly in the regulation of cytokine secretion.

**RESUMEN**

La melatonina (MEL), es una hormona que se produce en la glándula pineal, y cuya contribución fisiológica es la de mantener la homeostasis celular en todos los sistemas que conforman el organismo, entre ellos el sistema inmune. Evidencias experimentales del grupo de Maestroni y cols. sugieren que la participación de la MEL en la respuesta inmune está mediada por los péptidos opioides. Asimismo se ha demostrado que los linfocitos, los monocitos y las células polimorfonucleares, poseen la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis y liberación de encefalinas. Nuestro grupo de trabajo demostró previamente que la ausencia de MEL endógena rompe el ritmo circádico de las encefalinas y disminuye su concentración en el sistema inmune de la rata. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) estudiar la liberación *in vitro* de péptidos opioides a partir del bazo de la rata, en ausencia y presencia de la MEL; 2) evaluar el efecto de la ausencia y presencia de la MEL en la respuesta inmune humoral de la rata, a través de la producción de anticuerpos y la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$ ; 3) estudiar el efecto de la ausencia y presencia de MEL en la expresión de Proencefalina A en las células mononucleares del bazo de la rata. Se utilizó el modelo de pinealectomía funcional por exposición a la luz continua para inhibir la síntesis endógena de MEL. Los resultados más relevantes de este trabajo se describen a continuación: a) las células mononucleares del bazo de los animales expuestos a un reto antigénico *in vivo*, mostraron un incremento en la liberación de Met-Encefalina, Heptapéptido, Synencefalina e IL-2, comparados con los animales que no fueron inmunizados. b) La liberación de Heptapéptido, así como el número de células secretoras de anticuerpos, IL-2 e IFN- $\gamma$  disminuyó tras la pinealectomía funcional. La administración exógena de MEL revirtió este efecto de tal manera que la secreción de Met-Encefalina, Synencefalina, IL-2 e IFN- $\gamma$  alcanzó niveles similares o incluso mayores a los de los grupos control. Asimismo, la administración de Met-Encefalina contrarrestó el efecto de la ausencia de MEL en el número de células secretoras de IFN- $\gamma$ . c) La cantidad de Proencefalina A en las células mononucleares del bazo de la rata disminuyó



considerablemente en los animales sometidos a pinealectomía funcional con respecto a los animales control y se restableció en presencia de MEL exógena.

La participación de los opioides en la modulación de la respuesta inmune es tan extensa que es factible pensar que en una situación de reto inmunológico será necesario aumentar tanto la síntesis como la liberación de opioides. En este trabajo se encontró que existe un correlato bioquímico entre la síntesis y la liberación de opioides en ausencia y presencia de MEL, en el contexto de la respuesta inmune primaria. Entre los principales efectos tanto de la MEL como de los opioides sobre las células inmunocompetentes se encuentra la regulación de la secreción de otras citocinas. En este trabajo se encontró que ante la ausencia de MEL endógena hay una disminución en el número de células secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$ , el cual se restableció e incluso aumentó significativamente en presencia de la hormona exógena o por la administración sistémica de Met-Encefalina. Nuestros resultados sugieren que el efecto de la MEL y de los opioides puede estar mediado por sus receptores de membrana, ya que en presencia de sus respectivos antagonistas (luzindol y naloxona) no se restableció el número de células secretoras de las citocinas de interés. El análisis por Western Blot arrojó evidencias de que en las células mononucleares del bazo de los animales sometidos a la pinealectomía funcional, la PEA se encuentra disminuida, y su presencia se restablece al administrar la MEL exógena. De acuerdo con los estudios previos de nuestro grupo de trabajo, el contenido tisular de los péptidos derivados de la PEA también disminuye significativamente en estas condiciones. En conjunto, los resultados sugieren que si la MEL induce la síntesis y la liberación de opioides a partir de las células inmunocompetentes, éstos a su vez pueden actuar sobre dichas células y las de su vecindad (de manera autocrina y paracrina) para estimular la actividad inmune en diferentes aspectos, entre ellos, inducir la secreción de otras citocinas como la IL-2 e IFN- $\gamma$  que tienen un papel crucial en la generación de las clonas celulares efectoras de la respuesta inmune humoral primaria.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Todos los factores del medio ambiente influyen sobre la fisiología de los seres vivos. Algunos de ellos son relativamente constantes, como es la composición del aire que respiramos, y otros como la luz, varían de manera cíclica durante el día y durante las diferentes épocas del año. Tanto la duración del periodo luz-oscuridad como la intensidad de la luz y la temperatura del medio ambiente son señales que le indican al organismo en qué hora del día y en qué estación del año se encuentra. Esta información resulta imprescindible para calendarizar funciones biológicas como la reproducción, de tal manera que ocurra en la época del año que sea más favorable para asegurar la supervivencia de la especie. Del mismo modo, funciones tales como la temperatura corporal, la actividad física, el sueño y el consumo de alimento y agua, ocurren de manera cíclica y están sujetas a un ritmo establecido para cada especie<sup>(21)</sup>.

El órgano que recibe y procesa la información de la señal luminosa y la transforma en la señal bioquímica que llega al resto del organismo es la glándula pineal. Es decir, esta glándula funciona como un transductor fotoneuroendocrino. La señal bioquímica que genera la pineal es la melatonina (MEL). Esta hormona tiene la función de sincronizar la actividad celular con el fotoperiodo, y por lo tanto es la responsable del control de los ritmos biológicos<sup>(6, 19, 21, 54, 156, 206)</sup>. Dado que el control de dichos ritmos involucra a múltiples sistemas en el organismo, la fisiología de la MEL resulta muy amplia y de gran importancia para mantener la homeostasis, y en consecuencia, la salud.

Uno de los sistemas que resulta imprescindible para mantener la salud, es el sistema inmune. Éste constituye la defensa que posee el organismo contra los innumerables antígenos que entran en contacto con él: aquellos que existen en el aire que respiramos, en el alimento que comemos, en la ropa con que vestimos, e incluso dentro de nuestro cuerpo, el sistema inmune es capaz de reconocer y destruir las células infectadas con algún microorganismo o bien, las células tumorales. 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.

Dado el carácter vital que tiene, la fisiología del sistema inmune es compleja y multifactorial, y está sujeta a diversos mecanismos de acción y de regulación. En particular, los sistemas nervioso y endocrino interactúan con el sistema inmune a través de una red de comunicación multidireccional en la que participan los diferentes mensajeros químicos que producen y secretan las células que conforman cada uno de estos sistemas, es decir, neurotransmisores - neuropéptidos, hormonas y citocinas, respectivamente. Al estudio de las interacciones funcionales entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune se le denomina neuroendocrinoinmunología. La investigación biomédica básica se ha enfocado en dilucidar los mecanismos que están involucrados con la fisiología integral de este sistema conjunto, y su participación en diversas patologías que aquejan a gran parte de la población humana como por ejemplo el cáncer, la diabetes, el SIDA y las enfermedades neurodegenerativas, entre otras no menos importantes. La relevancia de dilucidar dichos mecanismos fisiológicos reside en encontrar posibles puntos de intervención farmacológica que contribuyan a la prevención, el control y, en la medida de lo posible, la cura de dichas enfermedades.

Entre los sistemas en los que participa la MEL como modulador fisiológico, el sistema inmune no es la excepción. Esta hormona funge como uno de los múltiples mecanismos de regulación que contribuyen a la homeostasis inmunológica<sup>(35, 44, 49, 57, 58, 101, 102, 103, 126, 181)</sup>. Asimismo, entre los mensajeros químicos que actúan como mediadores en la comunicación bidireccional entre el Sistema Nervioso Central (SNC) y el sistema inmune (SI), se encuentra el sistema endógeno opioide (SEO)<sup>(95, 194)</sup>. La participación de los opioides endógenos en la inmunomodulación es tal que se ha llegado a considerarlos como “nuevas citocinas”<sup>(95)</sup>.

Estudios previos sugieren que existe una relación bioquímica y funcional entre la MEL y los opioides endógenos tanto en el SNC<sup>(7)</sup> como en el SI<sup>(101, 102, 103, 190)</sup>. Evidencias

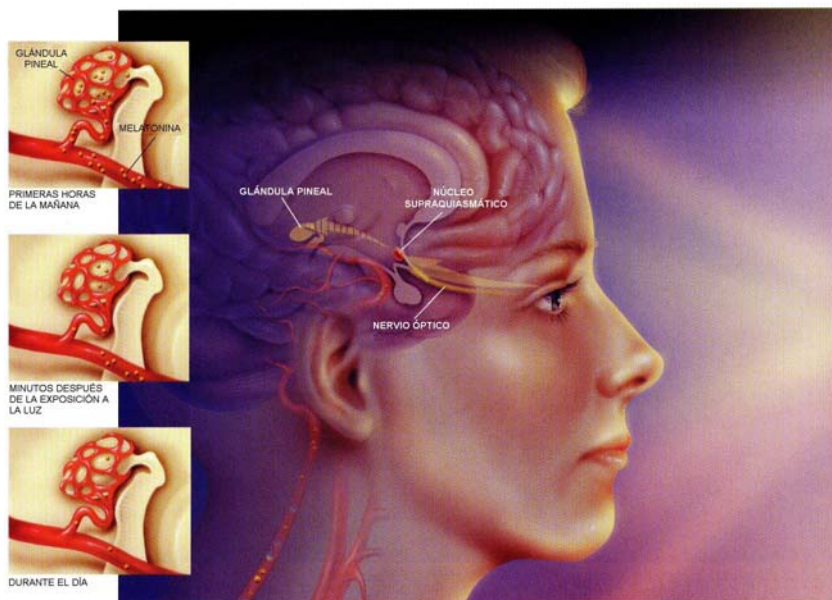
experimentales de nuestro grupo de trabajo sugieren que en ambos sistemas, la síntesis y liberación de los péptidos opioides puede estar regulada por la MEL<sup>(7, 190)</sup>.

El interés particular de este trabajo fue estudiar la participación de la MEL sobre los péptidos opioides derivados de la Proencefalina A, en el contexto de la respuesta inmune primaria de la rata.

### 1.1 La melatonina: su síntesis

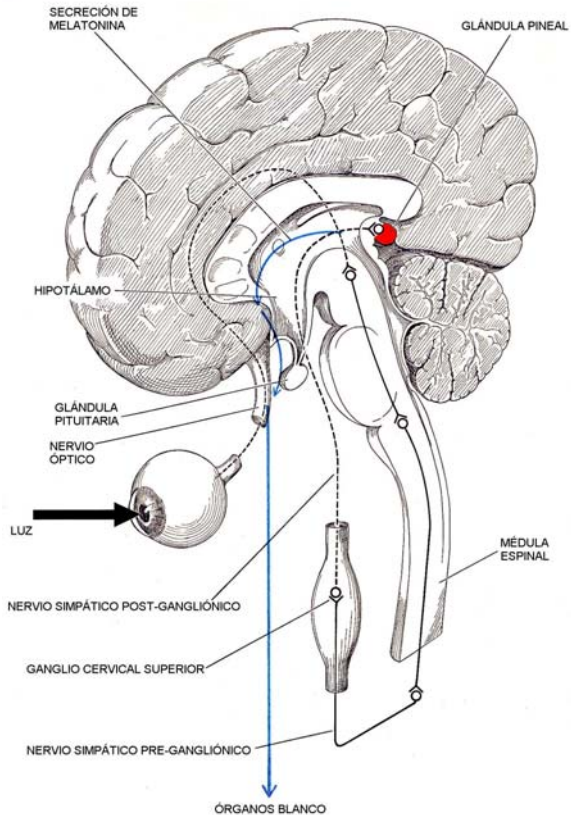
La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona que se produce y secreta principalmente por la glándula pineal en los vertebrados. Se aisló por primera vez por Aarón B. Lerner en 1958, a partir de glándulas pineales de bovino<sup>(91)</sup>.

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 1.1).



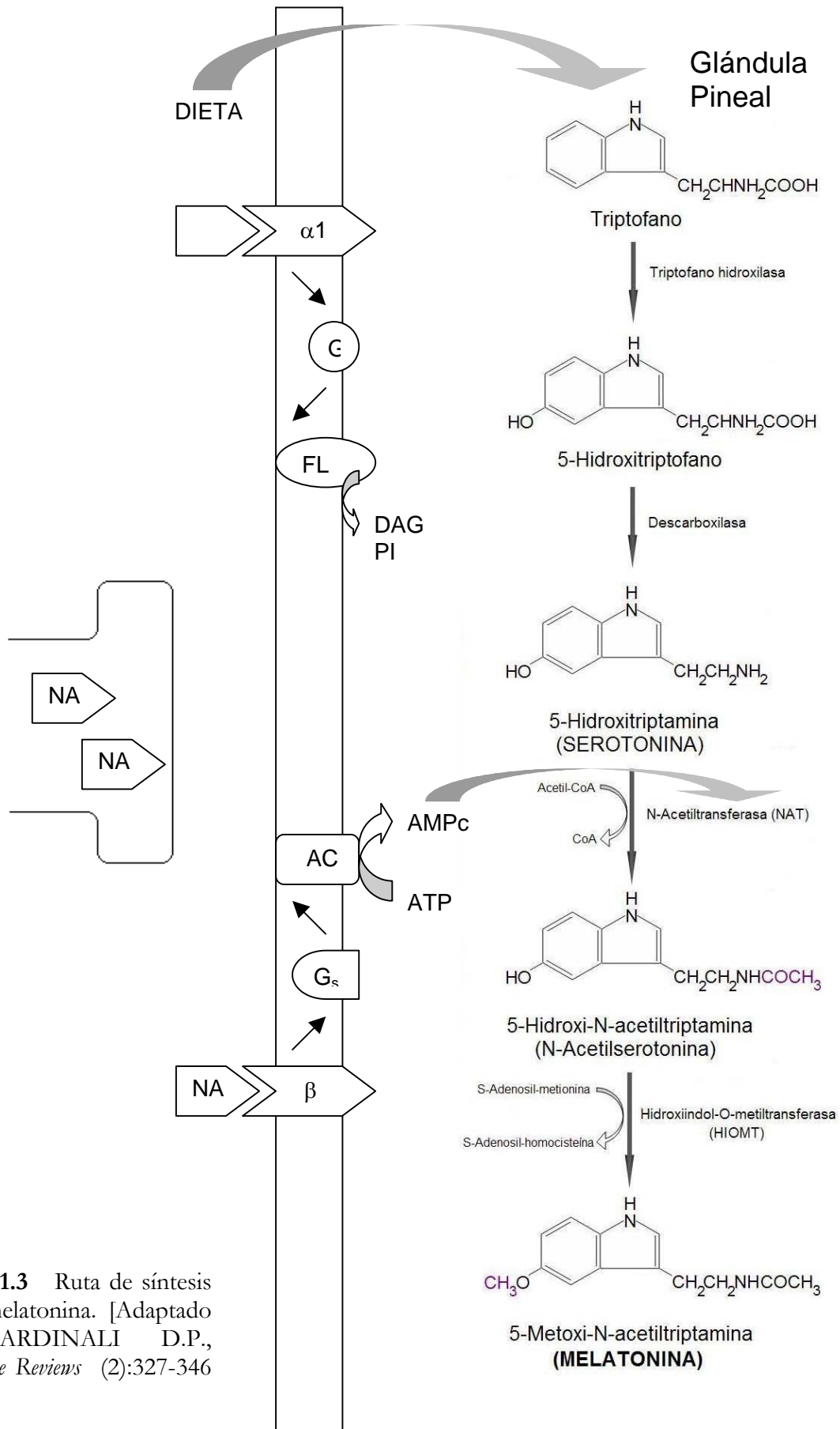
**Figura 1.1** La luz es la señal del medio ambiente que se capta a través de la retina, viaja por el nervio óptico y llega al núcleo supraquiasmático ubicado en la región anterior del hipotálamo. A partir de este núcleo, se envía la señal de manera indirecta hasta la glándula pineal para inhibir la producción de melatonina durante el día. [Adaptado de YOUNG M.W., *Sci Am* 282 (3):46-53 (2000)]

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 post-ganglionares simpáticas que inervan la glándula pineal (Figura 1.2). Así, el NSQ transmite el estímulo hacia la pineal para la producción de MEL cuando empieza la fase de oscuridad<sup>(156, 209)</sup>.



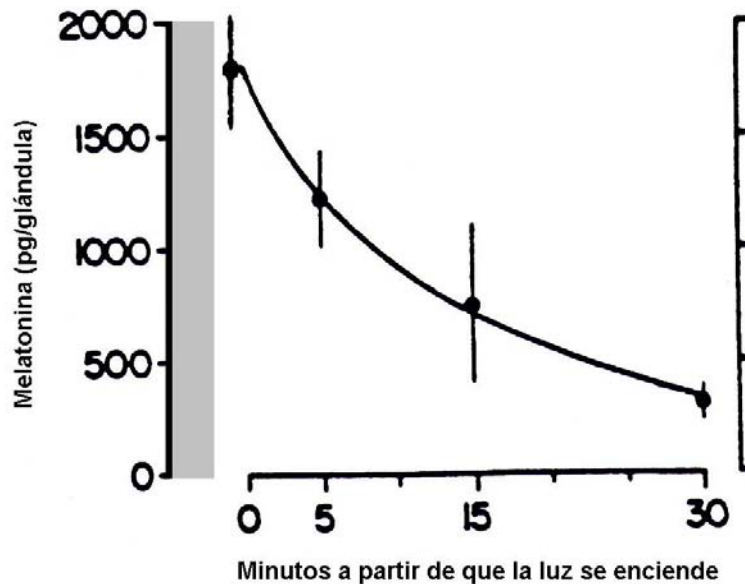
**Figura 1.2** La vía neuronal que sigue la señal de luz captada por la retina incluye el nervio óptico, el núcleo supraquiasmático, la médula espinal, el nervio simpático pre-ganglionar, el ganglio cervical superior, el nervio simpático post-ganglionar y finalmente la glándula pineal. [Adaptado de WURTMAN R.J., *Sci Am* 233 (1):68-77 (1975)].

Las terminales post-ganglionares simpáticas que inervan la glándula pineal liberan noradrenalina (NA) (Fig. 1.3). Este neurotransmisor se une tanto a los receptores  $\beta$ - como  $\alpha$ -adrenérgicos en la membrana del pinealocito, e inicia la cascada de señalización con el incremento intracelular de adenosina-monofosfato cíclico (AMPc) y de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). La señal adrenérgica induce la síntesis de melatonina al estimular la expresión de la N-acetiltransferasa (NAT) mediante la vía del elemento de respuesta CRE (CREB-response element) y al incrementar la actividad enzimática de la NAT mediante la vía de la proteína cAMP-PKA-14-3-3<sup>(61)</sup>. La NAT actúa sobre la serotonina produciendo N-acetilserotonina. Esta molécula es transformada a melatonina por acción de la hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT). La unión de NA a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos tiene como consecuencia un incremento en la concentración intracelular de calcio, y se ha sugerido que favorece la respuesta a la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos<sup>(54)</sup>.



**Figura 1.3** Ruta de síntesis de la melatonina. [Adaptado de CARDINALI D.P., *Endocrine Reviews* (2):327-346 (1981) ]

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 plásmáticos máximos de la hormona se presentan en la fase de oscuridad, independientemente del patrón de actividad de la especie<sup>(21, 156)</sup>. La exposición a la luz visible es un factor ambiental que inhibe inmediatamente los mecanismos enzimáticos 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>(156)</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).]

La MEL se considera una hormona ubicua. Se produce en diversos órganos y tejidos de los vertebrados<sup>(62, 63, 64, 179)</sup> como la retina<sup>(71)</sup>, la médula ósea<sup>(41)</sup>, el intestino delgado<sup>(87, 90)</sup>, las gónadas<sup>(69, 70, 188)</sup>, los linfocitos<sup>(33, 52)</sup> y en la glándula de Harder de los roedores<sup>(47, 48)</sup>. Además, esta indolamina está presente en organismos unicelulares procariontes y eucariontes, en algas, en plantas angiospermas y en invertebrados<sup>(31, 62, 63)</sup>. En varios de estos organismos, entre los que destaca la especie *Euglena gracilis*, se encuentra que la

concentración de MEL es mayor, en varios órdenes de magnitud, que en la circulación de los vertebrados<sup>(64)</sup>. Entre las principales funciones que son atribuibles a la MEL en los invertebrados y en los organismos unicelulares, 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>(31, 63, 64)</sup>.

## **1.2 Mecanismos de acción de la melatonina**

### **1.2.1 Unión a receptores**

Se han caracterizado dos subtipos de receptores de membrana: MT1 (Mel1a) y MT2 (Mel1b)<sup>(27, 50, 51)</sup>, 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<sup>(59)</sup>. De igual manera, la unión al receptor MT2 produce inhibición de la adenilato ciclasa así como de la ruta de la guanilato ciclasa<sup>(196)</sup>. Por otra parte, la MEL es un ligando natural de la familia de receptores retinoidales Z y O (RZR/ROR), localizados en el núcleo celular<sup>(13, 175, 200)</sup>. Existen evidencias de la presencia de este tipo de receptores en el cerebro y en órganos periféricos<sup>(34, 129, 139, 140, 151)</sup>.

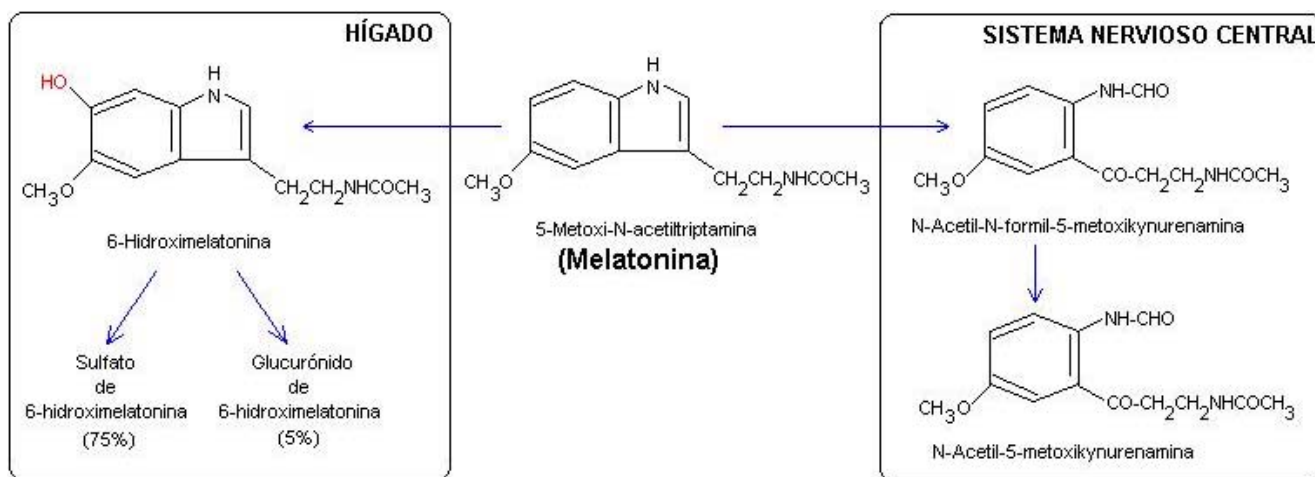
### **1.2.2 Difusión libre a través de la membrana plasmática**

Por su carácter lipofílico, esta hormona atraviesa libremente la membrana plasmática<sup>(42)</sup> y modula la actividad de proteínas de unión a calcio como la calmodulina (CaM)<sup>(14, 15)</sup> y la proteína cinasa C (PKC)<sup>(4, 18, 20)</sup>. 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>(16, 17, 20)</sup>.



### 1.3 Metabolismo y excreción de la melatonina.

La MEL circulante 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 la 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 los tejidos, principalmente en el SNC, la vía metabólica principal consiste en un rompimiento oxidativo del anillo pirrólico para formar como primer producto la N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), que puede transformarse enzimáticamente para eliminar el grupo formil y generar la N<sup>1</sup>-acetil-5-metoxikinuramina (AMK)<sup>(19, 32, 62)</sup>.



**Figura 1.5** Metabolismo de la melatonina. [Adaptado de CARDINALI D.P., *Endocrine Reviews* (2):327-346 (1981).]

### 1.4 Funciones de la melatonina.

La glándula pineal es un transductor fotoneuroendocrino, que a través de la MEL, es capaz de sincronizar la actividad celular con el fotoperiodo. Como ya se mencionó, en la mayoría de las especies de mamíferos la MEL regula los ritmos biológicos, entre los que se encuentran los ciclos de reproducción, alimentación, termorregulación e hibernación de acuerdo a las estaciones del año<sup>(21, 156, 191)</sup>.

Por otra parte, la naturaleza química de la MEL le confiere la capacidad de secuestrar radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno<sup>(145, 157, 176, 184)</sup>. Se sabe que una molécula de esta hormona es capaz de secuestrar más de una molécula de radical libre y además, los metabolitos de la MEL conservan esta propiedad química, por lo que se genera un efecto en cadena que resulta en una actividad antioxidante varias veces más eficiente que la de las vitaminas E y C<sup>(145, 184)</sup>. En este mismo sentido, se ha demostrado que la MEL induce la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa<sup>(3, 12, 79, 134, 154)</sup>. De este modo, la MEL actúa directa o indirectamente como protector intracelular ante el estrés oxidativo<sup>(19, 154, 155)</sup>.

Es reconocida también la participación de la MEL en la organización estructural del citoesqueleto<sup>(16, 17)</sup>. Esta estructura subcelular se compone de tres elementos principales: los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios. La MEL actúa como un modulador en el ensamblaje de estos tres componentes y por lo tanto, tiene influencia en las funciones en las que se involucra el citoesqueleto, entre ellas: la formación del huso mitótico en la división celular, el transporte de vesículas en el citoplasma, la motilidad, el crecimiento y las interacciones entre células, así como la morfología y la polaridad estructural específica de cada tipo celular. La mayoría de estas funciones son de importancia vital para las células y se sabe que en algunos casos un arreglo disfuncional del citoesqueleto precede a la apoptosis. Por este motivo se considera que la modulación que ejerce la MEL sobre la organización del citoesqueleto puede ser un mecanismo ancestral para la preservación de las características celulares<sup>(16)</sup>.

Por otra parte, estudios previos sugieren que la MEL está implicada en la regulación de la excitabilidad del SNC, al modificar los patrones de síntesis, liberación y recaptura de diversos neurotransmisores<sup>(19, 54)</sup>. A través de estos mecanismos de regulación, la MEL puede participar o incluso desencadenar efectos tales como la reducción de la actividad locomotora, el aumento del umbral del dolor, el efecto anti-convulsivo y la prevención de alteraciones conductuales y estados de depresión<sup>(54)</sup>.

Existen evidencias de alteraciones en el ritmo y/o en la magnitud de la secreción de MEL en diversos trastornos del sueño<sup>(28, 127, 144)</sup>, en enfermedades psiquiátricas<sup>(136)</sup> como la depresión mayor, la esquizofrenia<sup>(192)</sup>, el trastorno obsesivo-compulsivo, y en enfermedades neurodegenerativas<sup>(16, 19, 178)</sup> como la enfermedad de Parkinson<sup>(116)</sup>, la enfermedad de Alzheimer<sup>(205)</sup>, la esclerosis múltiple<sup>(164)</sup> y la epilepsia<sup>(163)</sup>. Además, se ha demostrado que en algunas de estas enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas, así como en el envejecimiento, existe una acumulación anormal de radicales libres y en consecuencia, un arreglo disfuncional del citoesqueleto<sup>(16)</sup>. Dada su actividad antioxidante, su participación en la organización del citoesqueleto y su papel en la regulación de la excitabilidad neuronal, la MEL puede tener eficacia terapéutica en dichos padecimientos<sup>(16, 19, 109, 154, 155)</sup>.

Actualmente se reconoce la comunicación bidireccional que existe entre el SNC y el sistema inmune<sup>(174)</sup>, que además está sujeto a la influencia de diversas hormonas. Evidencias experimentales que se describirán más adelante, indican que la MEL está involucrada en la regulación de la respuesta inmune humoral y celular, así como en los mecanismos de inmunidad innata<sup>(35)</sup>. Su función inmunomoduladora hace de la MEL una molécula con potencial terapéutico en patologías de diversa índole como pueden ser enfermedades infecciosas y cáncer<sup>(23, 24, 109, 122, 193)</sup>, o en caso contrario, se sugeriría la inhibición de sus efectos en el caso de enfermedades autoinmunes<sup>(40, 107, 109)</sup>.

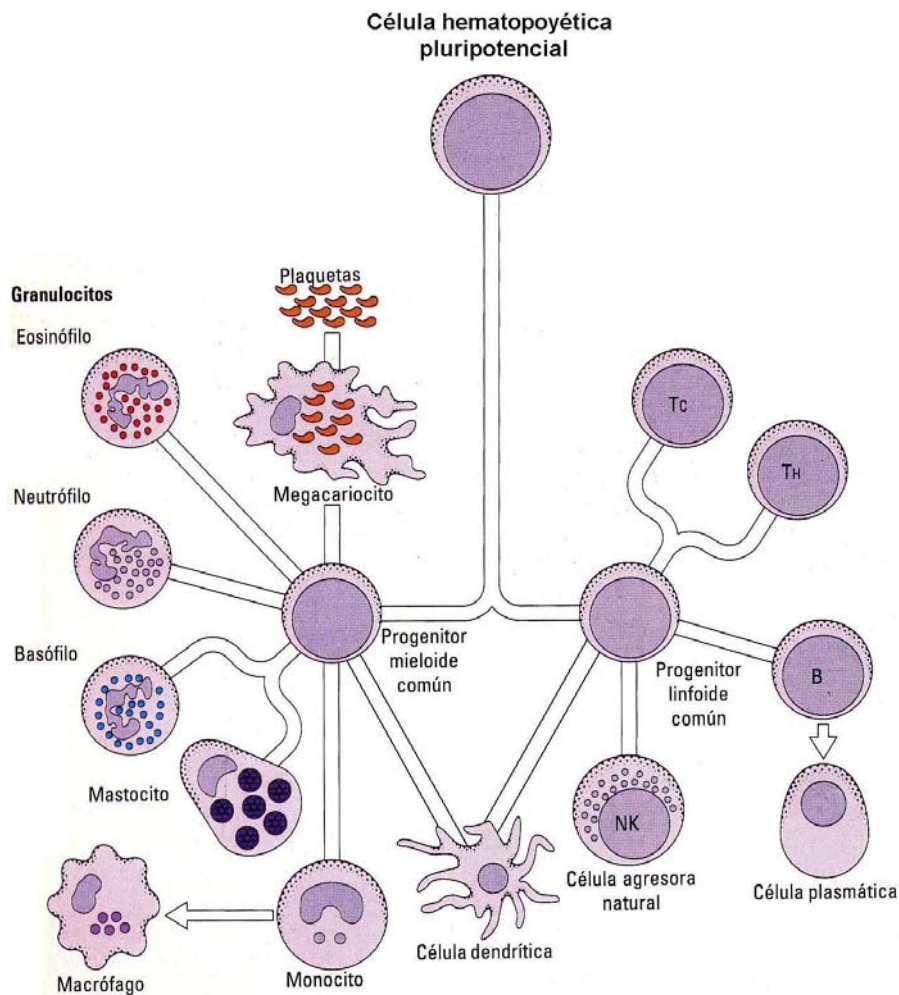
Antes de mencionar las evidencias de las funciones inmunomoduladoras de la MEL, es necesario conocer las generalidades de la anatomofisiología del sistema inmune, que se resumen a continuación.

## **1.5 El sistema linfoide**

Las células que participan en la respuesta inmune se organizan en un conjunto de órganos y tejidos que se denomina sistema linfoide. Este sistema se conforma 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 los linfocitos se diferencian para convertirse en efectores de las respuestas humoral y celular, o bien en células de memoria<sup>(159)</sup>.

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 (Figura 1.6).



**Figura 1.6** 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).]

La célula progenitora 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 citolíticas naturales (natural killer: NK)<sup>(182)</sup>. Las células dendríticas pueden derivarse tanto del progenitor mieloide como del progenitor linfoide<sup>(25)</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>(159, 182)</sup>. Según el órgano en el que residen, los macrófagos reciben diferentes nombres, 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>(159, 182)</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>(159)</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>(182)</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 las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex: MHC) para que sean reconocidos por los linfocitos<sup>(182)</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>(182)</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 coestimuladoras dadas por las moléculas accesorias en la presentación del antígeno, así como la secreción de IL-1, entre otras citocinas, 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 citocinas presentes en el medio, en linfocitos  $T_H1$  y linfocitos  $T_H2$ . La primera vía se favorece cuando existe IL-12 e interferón 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<sub>H2</sub> liberan y responden a 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>(182)</sup>. Los linfocitos T citotóxicos (T<sub>C</sub>) 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>(182)</sup>.

Las células NK tienen gránulos citoplásmicos que contienen perforinas y granzimas. Estas enzimas se liberan 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>(182)</sup>.

En los humanos, la composición celular del timo es de un 99% de linfocitos T, mientras que el bazo se compone de un 30 a 40% de linfocitos T, 50 a 60% de linfocitos B y de 1 a 5% de células NK<sup>(182)</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. En este aspecto destaca la regulación de la respuesta inmune a través de las hormonas, entre ellas la MEL.

## 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>(88)</sup>. La proliferación de esplenocitos de ratón *in vivo* e *in vitro*, se estimula en presencia de MEL endógena o exógena y este efecto puede ser revertido por el luzindol (N-

acetil-2-benciltriptamina), un antagonista competitivo de los receptores membranales de MEL<sup>(49)</sup>. De manera similar, el grupo de Markowska y cols. observó en estudios *in vitro*, que la melatonina puede inducir la proliferación de los linfocitos de pollo, y que este efecto está mediado por el receptor de membrana de la MEL<sup>(112)</sup>. En relación con la edad, el grupo de Atre y cols. demostró que la melatonina incrementa la capacidad de proliferación de los esplenocitos en ratones envejecidos<sup>(10)</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<sup>(44)</sup>. La acción de estas células se considera una parte de los mecanismos de inmunidad innata (no-específica) que como se mencionó anteriormente, constituyen la primera línea de defensa contra infecciones virales y procesos tumorales. Esto, aunado a evidencias clínicas sugieren que es factible el uso terapéutico de la MEL en casos de cáncer<sup>(23, 104, 193)</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<sup>(181)</sup>, enzima involucrada en la síntesis de leucotrienos. Estos últimos son mediadores de la respuesta inflamatoria aguda y crónica, lo que sugiere un papel modulador de la MEL en este rubro.

En el timo y el bazo de la rata se ha demostrado la expresión génica de receptores membranales de MEL<sup>(96, 150)</sup>, principalmente del tipo MT1 (Mel<sub>1a</sub>)<sup>(147)</sup>. En el bazo, estudios de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-yodomelatonina demuestran 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 quirúrgica o funcionalmente, se observa que la unión a los receptores aumenta<sup>(150)</sup>. Asimismo, existen evidencias de 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>(151)</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>(64, 151)</sup>. De manera similar, los receptores



membranales y nucleares de MEL se expresan en diversas poblaciones celulares del sistema inmune del humano<sup>(146)</sup> y del ratón<sup>(34, 129)</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 de Maestroni y cols. 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>(101, 103)</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>(102)</sup>.

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>(11, 56, 105)</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>(5, 58, 126)</sup>. La liberación de IL-12 promueve a su vez la diferenciación de los linfocitos  $T_H 1$ <sup>(58)</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>(5, 56, 105)</sup>.

En células mononucleares de sangre periférica humana, el grupo de García-Maurino y cols. 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>(55)</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>(57)</sup>. Además, evidencias experimentales sugieren un mecanismo sinérgico de la estimulación de los receptores de membrana y de los receptores nucleares de MEL, para la producción de dichas linfocinas<sup>(55, 57)</sup>.

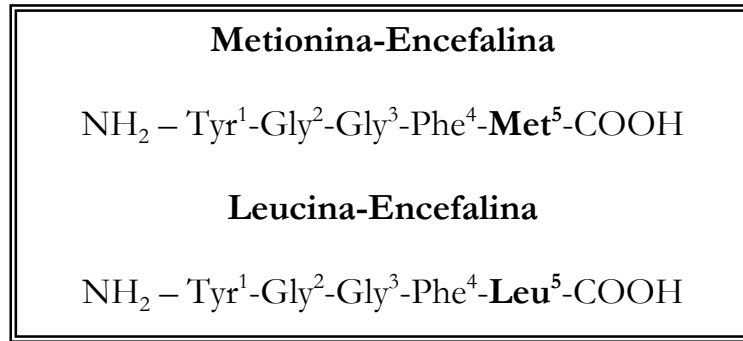
Los efectos de la MEL no están restringidos a los linfocitos  $T_H1$ . Los sitios de unión de alta afinidad a esta hormona también se expresan en linfocitos  $T_H2$  de la médula ósea. La presencia de MEL en una concentración fisiológica o farmacológica, es capaz de provocar un aumento en la síntesis 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>(100, 106)</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>(100, 104)</sup>. Además, en los experimentos realizados en ratones se demostró que el evitar que las células sanguíneas mueran por apoptosis, no disminuye la acción anticancerígena de los medicamentos<sup>(104, 106)</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 cols. demostró que el efecto inmunoestimulante que ejerce la MEL sobre la respuesta humoral se revierte por la administración exógena de antagonistas de los receptores opioides como la naltrexona. Las evidencias en este rubro sugieren que la participación de la hormona en el sistema inmune puede estar mediada por los péptidos opioides<sup>(99, 102)</sup>.

### **1.7 Fisiología de los péptidos opioides.**

El descubrimiento de los receptores a los opiáceos en 1973<sup>(141, 172, 187)</sup>, 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 1975 los estudios del grupo de Terenius y cols.<sup>(186)</sup> sugirieron que la naturaleza bioquímica de los ligandos endógenos es peptídica. Así, los péptidos opioides reciben su nombre por ser compuestos endógenos capaces de interactuar con los receptores del opio en las membranas celulares<sup>(2)</sup>. Los primeros

péptidos opioides descubiertos fueron la Metionina-Encefalina (MENk) y la Leucina-Encefalina (LENk). La secuencia de estos pentapéptidos fue publicada por Hughes y Kosterlitz en 1975<sup>(67)</sup>. Como se puede notar en el recuadro siguiente, la secuencia de aminoácidos es idéntica en ambos péptidos, excepto en el aminoácido carboxilo-terminal.



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 se activan en el retículo endoplásmico y en la región *trans* del aparato de Golgi, respectivamente<sup>(161, 180)</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 estos péptidos sólo la  $\beta$ -endorfina tiene actividad opioide<sup>(1, 6)</sup>.

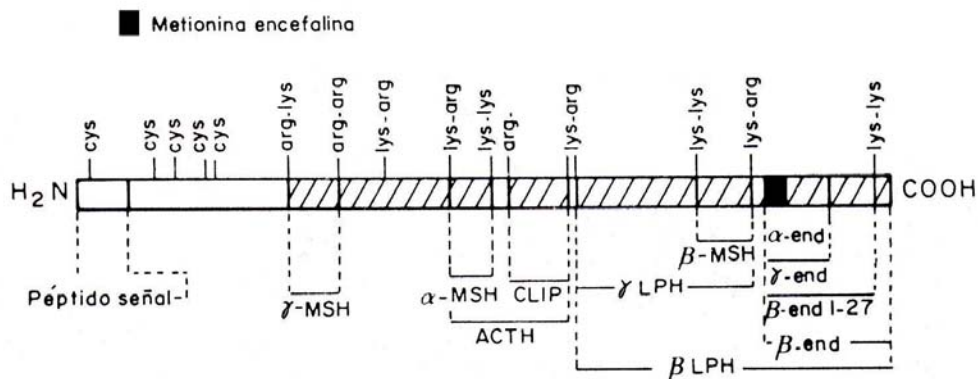


Figura 1.7 Proopiomelanocortina (POMC)

El precursor PDNF, da lugar a varios péptidos opioides muy potentes conocidos como dinorfinas A y B, y la neo-endorfina<sup>(1, 2, 6)</sup>. Contiene copias de LENk insertas en la secuencia de las dinorfinas, por lo que éstas podrían ser precursoras de la LENk. No tiene copias de la secuencia de la MENk.

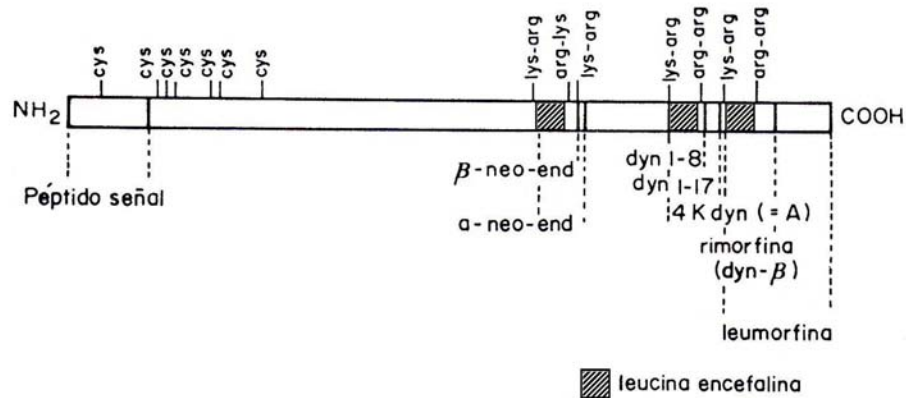


Figura 1.8 Prodinorfina (PDNF)

Por su parte, la PEA produce cuatro copias de MENk, una copia de LENk, una copia del Heptapéptido MENk-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> y una copia del Octapéptido MENk-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 del extremo amino terminal<sup>(6, 94)</sup>.

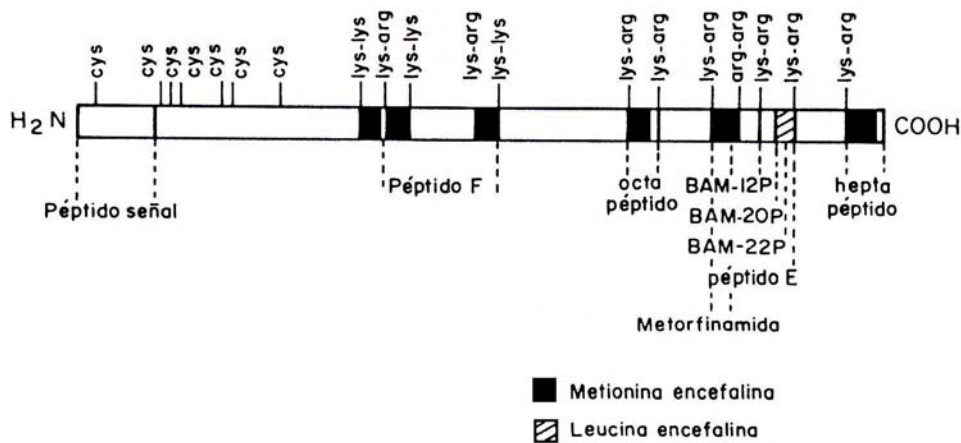


Figura 1.9 Proencefalina A (PEA)

Además, en 1995 se identificó la Orfanina FQ/Nociceptina (OFQ), un heptadecapéptido que activa uno de los receptores con estructuralmente similares a los receptores opioides: Opioid Receptor-Like 1 (ORL-1)<sup>(153)</sup>. El precursor proteico, la Preproorfantina FQ, tiene 181 aminoácidos y contiene en su secuencia una copia de la OFQ, flanqueada por pares de aminoácidos básicos (Lys-Arg). Este precursor se expresa en el cerebro, principalmente en la amígdala y el núcleo subtalámico, así como en el bazo y en leucocitos de sangre periférica<sup>(131)</sup>.

Como ya se mencionó, el descubrimiento de los receptores a los opiáceos ocurrió simultáneamente en tres laboratorios, en el año de 1973<sup>(141, 172, 187)</sup>. Desde esa fecha, se trabajó intensamente en la caracterización farmacológica de estos receptores y actualmente se tiene un amplio conocimiento de diversos agonistas y antagonistas específicos que permiten estudiar la fisiología del sistema endógeno opioide y su papel en el desarrollo de la adicción a la morfina y sus derivados.

Se han descrito tres tipos principales de receptores opioides:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ . 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<sup>(6)</sup>. Además de los ya mencionados, se han propuesto otros tipos de receptores opioides como el  $\epsilon$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ,  $\zeta$ , en diferentes especies animales<sup>(60, 133, 168, 210)</sup>. La unión a los receptores ORL-1 produce una reducción de la actividad sináptica. Además se le ha asociado con efectos pro-nociceptivos ya que contrarresta la analgesia mediada por opioides. A nivel supraespinal, los agonistas de este receptor pueden disminuir la función motora, el aprendizaje tipo espacial, inducir la alimentación y regular la liberación de las hormonas hipofisarias en condiciones basales e inducidas por estrés; mientras que a nivel sistémico, producen relajación muscular, diuresis y antinatriuresis<sup>(120)</sup>.

Los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, y en general, su señal de transducción produce una inhibición de la adenilato ciclasa. Sin embargo, la multiplicidad de isoformas de las subunidades que conforman a las proteínas G ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), les confiere especificidad para activar diferentes cascadas de señalización según el tejido de que se trate. En estas pequeñas diferencias bioquímico-farmacológicas, reside el amplio repertorio de funciones que se le atribuyen a los opioides endógenos.

Tanto los péptidos opioides y sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en todo el organismo, por lo que se sugiera que están implicados en la regulación de los procesos fisiológicos que conllevan a la homeostasis en general. Entre las funciones propuestas para el sistema endógeno opioide se encuentran: 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>(6, 135)</sup>.

Además de su participación en las funciones antes mencionadas, el sistema endógeno opioide está involucrado en procesos de inmunomodulación y en la comunicación neuroendocrino-inmunológica. Algunas de las evidencias a este respecto se describen a continuación.

### **1.8 Participación de los péptidos opioides en la fisiología del sistema inmune.**

A finales de la década de los 80's, se demostró que la administración periférica o central de encefalinas tiene un efecto dual y dosis dependiente sobre la respuesta inmune, ya que a dosis bajas puede potenciarla y a dosis altas suprimirla<sup>(73, 74, 111)</sup>. Este efecto es reproducible *in vitro*, y dado que puede revertirse en presencia de naloxona, se sugirió que el efecto puede estar mediado por los receptores opioides<sup>(118)</sup>. El grupo de Dimitrijevic y cols. demostró que el efecto de potenciación de la respuesta inmune humoral a nivel

central, está mediado por los receptores opioides delta, mientras que el efecto supresor está mediado por los receptores kappa<sup>(46)</sup>.

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>(194)</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>(160)</sup>; así como la liberación de dichos péptidos inducida por la activación mitogénica de linfocitos humanos<sup>(77, 138)</sup>. El grupo de Zurawski y cols. demostró que la estimulación antigénica o mitogénica de una línea de células T cooperadoras (T<sub>H</sub>) de ratón, induce la expresión del ARNm de la Preproencefalina y la liberación de material opioide al medio de cultivo<sup>(212)</sup>. Por su parte, las células polimorfonucleares también producen y liberan péptidos derivados de la PEA.

Varios autores han sugerido la participación de los péptidos opioides sintetizados y secretados por las células del sistema inmune, así como a las citocinas anti-inflamatorias como mediadores de la analgesia en tejidos inflamados<sup>(148, 195, 158)</sup>. Estudios en este rubro demostraron 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 MENk<sup>(148)</sup>. En este contexto también se reportó que la liberación de  $\beta$ -Endorfina, MENk y Dinorfina A inducida por agentes como el factor de liberación de corticotropina (CRF) pueden producir analgesia periférica en modelos de inflamación localizada<sup>(29)</sup>. Estos estudios apoyan el papel del sistema inmune en el control del dolor asociado a la inflamación, que cobra importancia en padecimientos que cursan con inmunosupresión, tales como el SIDA o el cáncer.

Los receptores opioides  $\delta$ ,  $\mu$ , y  $\kappa$  se expresan en linfocitos y su activación tiene un efecto inductivo en la proliferación celular *in vitro*<sup>(84)</sup>. En sujetos sanos, así como en pacientes con lepra o tuberculosis, se conoce que la MENk induce la proliferación de linfocitos T *in vivo*<sup>(117)</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  $\kappa$ . Los resultados de estos estudios demuestran que la acción moduladora de la MENk en el sistema inmune está mediada principalmente por los receptores tipo  $\delta$  <sup>(117, 173)</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>(66, 169, 171)</sup>.

En concordancia con dichas evidencias, la activación de los linfocitos T *in vivo* o *in vitro* induce en ellos la expresión de los receptores opioides  $\delta$  <sup>(169, 171)</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>(130)</sup>.

Por otra parte, diversos estudios demuestran que la MENk estimula la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6, en macrófagos activados de la microglia <sup>(45, 80)</sup> y del peritoneo <sup>(81, 207)</sup> de ratón. Asimismo, tanto la MENk como agonistas selectivos de los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  participan en la modulación de la actividad de los macrófagos al estimular la producción de óxido nítrico <sup>(82, 114, 197)</sup> y la liberación de peróxido de hidrógeno <sup>(149, 197, 198)</sup>. De manera similar, la MENk y la  $\beta$ -endorfina incrementan el metabolismo oxidativo de los neutrófilos y su muerte por apoptosis *in vitro*, de manera dosis-dependiente <sup>(183)</sup>. Por su parte, las encefalinas, la  $\beta$ -endorfina y la Dinorfina A pueden incrementar la actividad citotóxica de las células NK así como el porcentaje de células con este fenotipo <sup>(83)</sup>.

El grupo de Yang y cols. <sup>(208)</sup> estableció que el tratamiento *in vivo* e *in vitro* con MENk resulta en un incremento en la producción de IL-2, paralelo a un aumento en la proliferación de los linfocitos. Este efecto no está asociado a un aumento en la expresión del receptor de IL-2. A este respecto, el grupo de Hedin y cols. <sup>(65)</sup> demostró que la síntesis



de IL-2 se incrementa en particular a través de la inducción del componente AP-1 del factor de transcripción NF-AT/AP-1 en linfocitos T humanos.

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>(170)</sup>. Asimismo, recientemente se demostró que el tratamiento con MENk disminuye la apoptosis en linfocitos infectados por el virus de inmunodeficiencia de los simios (SIV)<sup>(93)</sup>.

En las células B las evidencias 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>(125)</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>(125)</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>(101, 102, 103, 152)</sup>.

Dado que se han demostrado plenamente sus efectos en la modulación de la fisiología de las células del sistema inmune, Liu y cols. han propuesto que la MENk sea considerada una nueva citocina<sup>(95)</sup>.

En conjunto, existen múltiples evidencias de que tanto la melatonina 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 estudios realizados por nuestro

grupo de trabajo se observó que la ausencia endógena de la MEL rompe el ritmo circádico de las encefalinas y disminuye significativamente su contenido tisular en estructuras cerebrales<sup>(7)</sup>. De manera similar, se demostró que la pinealectomía funcional -como una estrategia experimental que inhibe la síntesis endógena de MEL- disminuye significativamente el contenido tisular de encefalinas en dos órganos linfoides representativos: el bazo y el timo de la rata, y que dicha condición se puede revertir si se administra la hormona de manera exógena a los animales<sup>(190)</sup>. Estos resultados en conjunto, sugieren que la MEL puede estar implicada en la síntesis *de novo* y en la liberación de los péptidos opioides, tanto en el SNC como en el sistema inmune.

## 1.9 Hipótesis

1. La ausencia de melatonina endógena disminuye el contenido tisular de encefalinas en los órganos linfoides y la administración exógena de la hormona revierte este efecto. Por lo tanto, es factible suponer que tanto la liberación de encefalinas como la expresión de su precursor proteico, la Proencefalina A, estén regulados por la presencia de la melatonina.
2. En los mecanismos de la respuesta inmune los opioides endógenos participan como citocinas, y podrían actuar como mediadores del efecto inmunoestimulante de la melatonina. Por lo tanto es factible esperar que los parámetros fisiológicos de la respuesta inmune primaria como la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$ , sean modulados por la ausencia y presencia de la melatonina.

## 1.10 Objetivos

1. Establecer si existe una relación funcional entre el contenido tisular, la liberación *in vitro* de encefalinas y la expresión de Proencefalina A en células mononucleares del bazo de la rata, en ausencia y presencia de la melatonina.
2. En el contexto fisiológico de la respuesta inmune primaria, establecer el efecto de la ausencia y presencia de melatonina sobre la actividad de las células secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$ , en el bazo de la rata.

---

## CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Animales

Ratas macho de la cepa Wistar, con 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*. Los animales se dividieron en subgrupos de acuerdo al siguiente diseño experimental.

### 2.2 Diseño experimental

- a. Control *naive*: 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. Pinealectomía Funcional: la estrategia experimental para reducir la concentración plasmática de melatonina sin intervención quirúrgica o farmacológica, consistió en someter a los animales a un periodo de 15 días con luz continua (LC). Esta condición inhibe la actividad de la enzima N-acetiltransferasa y como consecuencia la síntesis endógena de MEL<sup>(156)</sup>. La intensidad de luz utilizada fue  $\leq 50$  lux, con el fin de no provocar estrés en los animales.
- c. Inmunización: para inducir la respuesta inmune primaria, se administraron  $2 \times 10^9$  eritrocitos de borrego a cada rata, vía i.p. a las 11:00 h. El sacrificio se llevó a cabo 5 días después de la inmunización.
- d. Administración de Melatonina exógena: para determinar si es posible revertir el efecto de la pinealectomía funcional, se administró Melatonina a los animales sometidos a la luz continua. Se inyectaron dosis de 0.01 mg/kg o 0.1 mg/kg vía s.c. durante 4 días consecutivos, a las 16:00 h.
- e. Administración de Luzindol: para determinar si el efecto de la melatonina está mediado por sus receptores específicos de membrana, se administró Luzindol que es

un antagonista competitivo de dichos receptores. Las dosis administradas fueron de 0.125 y 0.25 mg/kg, vía i.p., durante 4 días consecutivos, a las 16:00 h.

- f. Administración de Naloxona: para determinar si los péptidos opioides están involucrados en el efecto inmunomodulador de la melatonina, se administró Naloxona, que es un antagonista competitivo de los receptores opioides. Las dosis administradas fueron 1, 2 y 5 mg/kg, vía s.c. durante 4 días consecutivos, a las 16:00 h.
- g. Administración de Met-Encefalina: para determinar si las encefalinas por sí mismas pueden contrarrestar el efecto de la ausencia de MEL, se administró Met-Encefalina en una dosis de 0.2 mg/kg, vía i.p., durante 4 días consecutivos, a las 16:00 h.

### **2.3 Cuantificación de melatonina sérica por la metodología ELISA.**

Se utilizó el estuche comercial Melatonin ELISA kit Cat. RE54021, de Immunobiological Laboratories, Inc. (IBL-America). Este consiste en un ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa de la melatonina en muestras de suero o plasma, previa extracción.

El procedimiento analítico sigue el principio básico de un inmunoensayo de competencia entre el antígeno biotinilado y el no biotinilado, por un número constante de sitios de unión del anticuerpo. Cuando el sistema alcanza el equilibrio, el antígeno biotinilado libre se remueve mediante un procedimiento de lavado y el antígeno biotinilado unido al anticuerpo se determina mediante el complejo enzimático anti-biotina fosfatasa alcalina y p-nitrofenil fosfato como sustrato. Esta reacción genera un producto colorido cuya densidad óptica se determina mediante un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. La cantidad de antígeno biotinilado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra. La cuantificación del analito en las muestras se realiza por comparación de la densidad óptica obtenida con respecto a una curva patrón preparada con estándares de concentración conocida.

Para la obtención del suero de los animales se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

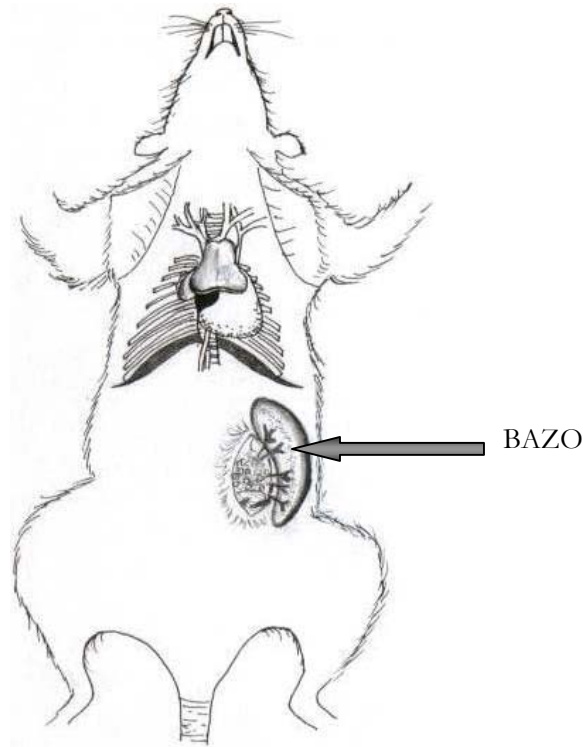
- a. El animal se sacrificó por decapitación, y se recolectó la sangre del tronco en tubos de ensayo.
- b. Se permitió la coagulación a temperatura ambiente y posteriormente se separó el coágulo de la pared del tubo con ayuda de una espátula.
- c. Para separar el suero del paquete celular, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm, a 4°C, durante 30 minutos.
- d. Finalmente, el suero se transfirió con pipeta Pasteur a microtubos de plástico y se conservó en congelación a - 4°C.
- e. Para la extracción de melatonina, previa al ensayo, el suero se descongeló y se hizo pasar a través de columnas de C-18 fase reversa. Los extractos se eluyeron con metanol absoluto y se evaporaron a sequedad, a 30°C. Posteriormente se reconstituyeron las muestras con agua desionizada y se procedió con el ensayo de ELISA, de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante. La determinación de cada muestra se realizó por duplicado.

## **2.4 Disección del bazo**

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se humedeció el pelaje con etanol al 70% para evitar que el órgano a disectar entrara en contacto con el pelo del animal.

Se realizó una incisión en el costado izquierdo del abdomen de la rata (Fig. 2.1) 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).



**Figura 2.1** Esquema de disección del bazo.

### **2.5 Obtención de suspensiones celulares a partir del bazo de la rata.**

- a. El primer paso fue la disgregación del bazo sobre una caja Petri con aproximadamente 10 mL de BSS. Se utilizó una malla de acero inoxidable (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 la suspensión sobrenadante se transfirió a otro tubo de ensayo.
- c. La suspensión celular se centrifugó dos veces 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 1 mL de BSS.

## 2.6 Liberación *in vitro* de péptidos opioides a partir de células del bazo de la rata.

- a. Las suspensiones celulares de bazo se sometieron al procedimiento de lisis de eritrocitos en una disolución hipotónica de Tris/ $\text{NH}_4\text{Cl}$ , para obtener las células mononucleares. Las células estuvieron suspendidas en la disolución Tris/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 10 min, en baño de hielo. Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm, durante 10 min, a  $15^\circ\text{C}$ . El botón celular se sometió a dos lavados y finalmente se resuspendió en 2 mL de BSS.
- b. Se realizó una dilución 1:500 de las suspensiones de células mononucleares de bazo, con azul tripano. De esta dilución se tomó una alícuota para conteo en la cámara de Neubauer. Una vez que se determinó la cantidad de células viables por mililitro de suspensión, se realizó la dilución pertinente para ajustar la concentración a  $3 \times 10^6$  células/mL.
- c. En cada cámara de perfusión se colocó un filtro de nitrocelulosa de  $0.65 \mu\text{m}$  y se mantuvo húmedo con BSS a  $37^\circ\text{C}$ . Se ajustó la bomba peristáltica para mantener un flujo de 0.5 mL/min.
- d. Se colocó 1 mL de la suspensión celular ( $3 \times 10^6$  células viables) en cada cámara de perfusión y se permitió su sedimentación sobre los filtros. Posteriormente se agregó BSS a  $37^\circ\text{C}$  y se recolectó el perfusado basal durante 10 minutos, en tubos de ensayo con 1 mL de ácido acético 2 M.
- e. El amortiguador restante se retiró de la cámara mediante aspiración con vacío y se llevó a cabo el estímulo despolarizante con una disolución de alto potasio (BSS +  $\text{K}^+$  50 mM, pH=7.3,  $37^\circ\text{C}$ ). Se recolectó el perfusado durante 10 minutos en las mismas condiciones que el basal.
- f. Los perfusados se sometieron a la temperatura de ebullición del baño de agua durante 15 minutos e inmediatamente después se colocaron en baño de hielo.



g. Posteriormente, los perfusados se concentraron por evaporación a sequedad dos veces, y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada. Se conservaron en congelación a -4 °C.

### 2.7 Determinación de proteínas.

La cuantificación de la cantidad de proteínas en las muestras se llevó a cabo mediante la técnica de Lowry<sup>(97)</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), 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:

<b>Tubos</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
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.									

### 2.8 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  $^{125}\text{I}$ , y las encefalinas contenidas en las muestras del bazo de la rata.

Los anticuerpos utilizados en el análisis fueron anticuerpos policlonales preparados en conejo, en nuestro laboratorio. Sus características de reactividad cruzada se han reportado previamente<sup>(8, 137, 166)</sup> y se presentan en el Apéndice.

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.

### 2.8.1 Reacción de yodación

- Para la yodación de las encefalinas (Peninsula Laboratories) con el radioisótopo  $^{125}\text{I}$  (Amersham Pharmacia Biotech), se tomaron 2  $\mu\text{g}$  de cada péptido en microtubos de plástico y se añadieron 200  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$ . Se agitó brevemente.
- Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de una solución de Cloramina T (2 mg/mL). Se agitó durante 30 segundos exactos. Para detener la reacción se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de metabisulfito de sodio (4 mg/mL) y 60  $\mu\text{L}$  de HCl 0.1 M.

### 2.8.2 Cromatografía en capa fina

- Se utilizaron placas de aluminio recubiertas con silica 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
  - 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.

### 2.8.3 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, durante 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 lavó 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 lavar 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.

#### 2.8.4 Extracción del péptido marcado

- Se marcó sobre la cromatoplaqa el sitio en el que se encontraba el péptido monoyodado, de acuerdo al R.f. obtenido en la autorradiografía.
- Se recortó la cromatoplaqa con tijeras y se colocó en un tubo de ensayo de plástico.
- Se agregaron 4 mL de una disolución metanol:agua 1:1 y se agitó vigorosamente durante 20 minutos.
- Se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Se recuperó el sobrenadante en otro tubo de ensayo de plástico debidamente rotulado.
- Se repitió la extracción.
- El contenido del tubo rotulado se concentró por evaporación a sequedad y se resuspendió en 1 mL de agua destilada.
- Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L del péptido marcado y se llevó al contador de radiación gamma para determinar el número de cuentas por minuto (cpm).
- Con base en dicha determinación, se diluyó el péptido si fue necesario.

#### 2.8.5 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 H<sub>2</sub>O
  - 3) 10 mL mezcla 1:1 Acetonitrilo : 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 concentró por evaporación a sequedad y se resuspendió en 1 mL de agua destilada.

### 2.8.6 Curvas patrón

Se prepararon diluciones 1:2 a partir de una disolución de concentración conocida de un péptido en particular. Las curvas de Met-Encefalina y Heptapéptido 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:

Met-Encefalina		Heptapéptido		Synencefalina	
ng	pmol	ng	pmol	ng	pmol
20	34.9	20	22.82	2	1.84
10	17.45	10	11.41	1	0.92
5	8.72	5	5.70	0.5	0.46
2.5	4.36	2.5	2.85	0.25	0.23
1.25	2.18	1.25	1.42	0.125	0.11
0.62	1.09	0.62	0.70	0.062	0.052
0.31	0.54	0.31	0.353	0.031	0.028
0.15	0.27	0.15	0.171	0.015	0.014
0.07	0.13	0.07	0.079		
0.03	0.06	0.03	0.034		
0.01	0.03	0.01	0.011		

### 2.8.7 Procedimiento para el RIA

- 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.
- Se preparó una dilución del péptido radiactivo con disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M de tal manera que cada 100  $\mu$ L 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 antisuero 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:

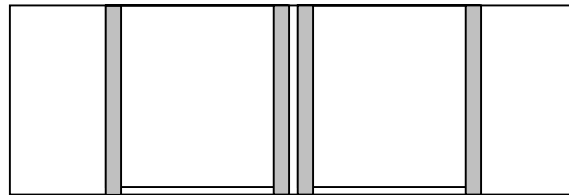
<b>Tubos</b>	<b>Disolución de Fosfatos 0.05 M</b>		<b><sup>125</sup>I – Péptido</b>	<b>Antisuero</b>	<b>Carbón activado*</b>
100%	350 µL	100 µL H <sub>2</sub> O	100 µL	-	-
Unión inespecífica	350 µL	100 µL H <sub>2</sub> O	100 µL	-	200 µL
Unión total	250 µL	100 µL H <sub>2</sub> O	100 µL	100 µL	200 µL
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 antisuero 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, después del periodo de incubación.
- g. Los tubos se agitaron suavemente y se sometieron a centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos.
- h. Se recuperó el sobrenadante por decantación.
- i. Los tubos se llevaron al contador de radiación gamma Isomedic 4/600 (ICN) para determinar 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.

## 2.9 Determinación de células formadoras de anticuerpos IgM anti-eritrocitos de carnero. Técnica de Cunningham-Szenberg<sup>(43)</sup>.

- a. Se inmunizó a las ratas con  $5 \times 10^9$  glóbulos rojos de carnero, vía intraperitoneal.
- b. El cuarto día después de la inmunización, se realizó el sacrificio de los animales y la disección del bazo.
- c. Se obtuvieron las suspensiones celulares del bazo, y a partir de ellas, se obtuvieron las células mononucleares por el método de lisis de eritrocitos con Tris-NH<sub>4</sub>Cl.
- d. Se realizó la tinción vital con azul tripano y el conteo de células viables en cámara de Neubauer.
- e. Los portaobjetos y cubreobjetos a utilizar se lavaron con agua y detergente y se secaron con una gasa para evitar que quedaran pelusas adheridas al vidrio. Se manipularon por sus extremos y con guantes o pinzas para evitar ensuciarlos.
- f. Se prepararon las cámaras con dos cubreobjetos pegados en dos de sus extremos a un portaobjetos, con cinta adhesiva de doble cara. Se colocaron entre dos placas de vidrio grueso para aplicar presión y que el pegado fuera uniforme.



- g. Se preparó una mezcla de los reactivos biológicos en las siguientes proporciones:
  - 25  $\mu$ L de suspensión celular de bazo ( $15.5 \times 10^6$  células mononucleares viables).
  - 35  $\mu$ L de suspensión de glóbulos rojos de carnero ( $1 \times 10^8$ ).
  - 250  $\mu$ L de complemento de cobayo (dilución 1:20).
- h. Se llenaron las cámaras con 40  $\mu$ L de la suspensión anterior y se sellaron con parafina.
- i. Los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron a 37°C, durante 1 h.
- j. Finalmente se realizó el conteo de las placas hemolíticas a simple vista, a contra luz.

## 2.10 Determinación de células secretoras de citocinas. Ensayo ELISpot para IL-2 y para IFN- $\gamma$ de rata.

El ensayo ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot) permite la detección de células individuales que secretan citocinas específicas u otras sustancias. Este ensayo emplea la técnica cuantitativa de ELISA en emparedado, como se describe a continuación. Un anticuerpo policlonal específico para la citocina de interés, en este caso IL-2 o IFN- $\gamma$  de rata, ha sido previamente adsorbido en una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) que constituye el fondo de los pozos de una microplaca. Las células estimuladas se pipetea en los pozos y la microplaca se coloca en una incubadora en ambiente húmedo a 37°C, por un periodo específico. Durante el periodo de incubación, el anticuerpo inmovilizado en la vecindad inmediata de las células secretoras une a la citocina secretada. Después de eliminar por lavados todas las células y sustancias que no se hayan unido, se añade a los pozos un anticuerpo policlonal biotinilado específico para la citocina de interés (IL-2 o IFN- $\gamma$ ). Después de un lavado para eliminar el anticuerpo biotinilado que no se unió, se agrega fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, que se une a la biotina. La enzima no unida se remueve por lavado y se añade la disolución del sustrato 5-bromo, 4-cloro, 3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT). La reacción enzima-sustrato produce un precipitado de color azul-negro que se presenta como puntos (spots) en los sitios de localización de la citocina. Cada punto representa una célula individual, secretora de IL-2 o IFN- $\gamma$ , según sea el caso. Los puntos se pueden contar con un lector automatizado de ELISpot o manualmente con un microscopio estereoscópico.

Para realizar este ensayo se utilizaron los estuches comerciales de la marca R&D Systems: IL-2 de rata (Cat. EL502) e IFN- $\gamma$  de rata (Cat. EL585).

Se utilizaron células de bazo de rata, obtenidas por la técnica de lisis de eritrocitos. Las células mononucleares se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco) en una concentración de  $1 \times 10^6$  células viables /mL. En cada pozo de la microplaca se agregaron



100  $\mu\text{L}$  de la suspensión anterior, es decir,  $1 \times 10^5$  células viables. El periodo de incubación fue de 2 horas.

Para la cuantificación de los puntos se obtuvieron fotografías digitales del fondo de cada pozo mediante una cámara acoplada a un microscopio estereoscópico. Posteriormente se realizó el análisis de imagen mediante el software Image-Pro<sup>®</sup>, para determinar el número de puntos (spots), su área y la relación entre la suma de las áreas de los puntos y el área total del fondo del pozo.

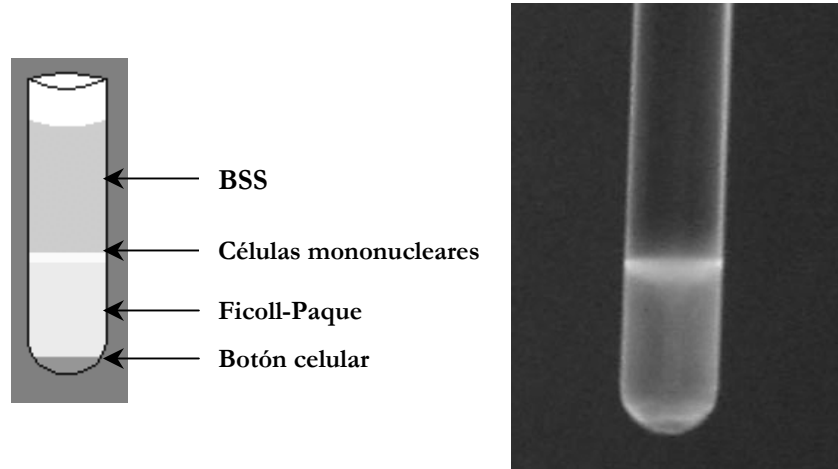
### **2.11 Separación de células mononucleares de bazo de rata por centrifugación con Ficoll-Paque. Obtención de extractos de células mononucleares de bazo para su posterior análisis por electroforesis en poliacrilamida-SDS y Western Blot.**

Con el fin de contar con una población celular enriquecida en monocitos-macrófagos y linfocitos (células mononucleares) obtenidos a partir del bazo de la rata, se aprovecharon las propiedades fisicoquímicas del Ficoll-Paque para el procedimiento de separación celular que se describe enseguida.

Las suspensiones celulares esplénicas se centrifugaron con BSS a 1500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular de bazo se resuspendió en aproximadamente 5 mL de BSS. 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 en un solo paso, mediante una centrifugación corta y a baja velocidad.

Por cada 4 mL de Ficoll-Paque se estratificaron 5 mL de la suspensión celular. Para ello, 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. Se sometió a centrifugación durante 45 minutos a 1500 rpm. El resultado se muestra en la siguiente figura:



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

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. 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.

Las células mononucleares obtenidas mediante centrifugación con Ficoll-Paque, se lisaron con 2 mL de ácido acético 2M. Se sometieron a ebullición en baño de agua durante 15 minutos e inmediatamente después se colocaron en baño de hielo. Las muestras se centrifugaron a 17000 rpm durante 1 hora y el sobrenadante fue recuperado. Cuatro muestras individuales de cada grupo se juntaron para obtener un extracto concentrado de células mononucleares. El extracto se evaporó a sequedad dos veces y finalmente se resuspendió en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

## 2.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida- SDS (SDS-PAGE).

El fundamento de la electroforesis consiste en la aplicación de un campo eléctrico que permite la separación de las proteínas contenidas en una muestra con base en su masa molecular y su carga eléctrica neta. Los geles de poliacrilamida están constituidos por cadenas de acrilamida entrelazadas con bis-acrilamida, de tal manera que se forma una malla o red, cuyo tamaño de poro limita el paso de las proteínas según su tamaño. A mayor porcentaje de acrilamida en el gel, el tamaño de poro es menor y por lo tanto se retienen las proteínas más pesadas. El dodecilsulfato de sodio (SDS) es un detergente que se agrega a la muestra para que las proteínas adquieran una carga neta negativa, de tal manera que la separación se realiza únicamente con base en la masa molecular de las proteínas. Asimismo, suele agregarse a la muestra un agente reductor como el  $\beta$ -mercaptoetanol o el ditioneitol, para romper los enlaces disulfuro de las proteínas y que éstas mantengan una estructura lineal, además de separar las subunidades proteicas si es el caso.

Se utilizó un sistema discontinuo que consiste en un gel concentrador (parte superior) y un gel separador (parte inferior). Asimismo, se utilizó el sistema de disoluciones amortiguadoras de Laemmli<sup>(89)</sup> para la preparación de los geles, la dilución de la muestra y la disolución de corrida (Ver Apéndice). La concentración de acrilamida en el gel de separación fue de 15%. La polimerización se indujo con persulfato de amonio y tetrametiletilendiamino (TEMED).

Se utilizó la cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN<sup>®</sup> II, de Bio-Rad. Las corridas se llevaron a cabo durante 2 horas a un voltaje constante de 100 V, provisto por la fuente de poder Power Pack 300 de Bio-Rad.

## 2.13 Western blot.

Este procedimiento consiste en la detección inmunoquímica de las proteínas de interés, una vez que han sido separadas mediante la electroforesis y transferidas del gel de

poliacrilamida a una membrana, que puede ser de nitrocelulosa o PVDF. La transferencia de las proteínas puede ser a través de un campo eléctrico o bien por capilaridad.

Una vez realizada la transferencia, se bloquean los sitios de la membrana que pudieran reaccionar inespecíficamente con los anticuerpos que se utilizarán. Posteriormente, la membrana se incuba con el primer anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. Entre cada reactivo se realizan varios lavados con el fin de evitar reacciones inespecíficas. El siguiente paso es agregar un segundo anticuerpo que reconozca al primero. Este segundo anticuerpo por lo general está acoplado al sistema enzimático que se utilizará para generar un producto colorido en el sitio de la reacción con la proteína de interés.

Se utilizó la celda Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad para realizar la transferencia electroforética de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V, durante una hora. Posterior a la transferencia, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche con Tween 20 al 0.25% en TBS, como disolución de bloqueo. Entre cada reactivo se realizaron tres lavados de 10 minutos con TTBS. Como primer anticuerpo se utilizó un antisuero policlonal dirigido contra el Heptapéptido (Met<sup>5</sup>-Encefalina-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>), preparado en conejos, en nuestro laboratorio. Las características de reactividad cruzada de este antisuero se han reportado previamente<sup>(8, 137, 166)</sup>.

Para el resto del ensayo se utilizó el sistema inmunoenzimático Amplified Alkaline Phosphatase Goat Anti-Rabbit Immuno-Blot<sup>®</sup> Assay Kit, de Bio-Rad. Este sistema consta de los siguientes reactivos: un anticuerpo biotinilado anti-inmunoglobulina de conejo (segundo anticuerpo) que reconoce al primer anticuerpo, un complejo de estreptavidina-fosfatasa alcalina biotinilada que se une a la biotina acoplada al segundo anticuerpo, y finalmente 5-bromo,4-cloro,3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) como sustrato de la fosfatasa alcalina. Al llevarse a cabo la reacción se forma un producto de color púrpura.

Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular:

- Protein Molecular Marker Mid/Low Range de AMRESCO: contiene seis proteínas (fosforilasa B, albúmina sérica bovina, aldolasa, triosa fosfato isomerasa, inhibidor de tripsina y lisozima) cuyo peso molecular está en un rango de 97.4 a 14.4 kDa. Las membranas se tiñeron con una disolución de Amido Black (naphtol blue black) para hacer evidentes estas proteínas.
- Kaleidoscope Prestained Standards de Bio-Rad: contiene siete proteínas (miosina,  $\beta$ -galactosidasa, albúmina sérica bovina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y lisozima) pre-teñidas de distintos colores y cuyos pesos moleculares van desde 202.7 a 7.0 kDa.

#### **2.14 Análisis estadístico.**

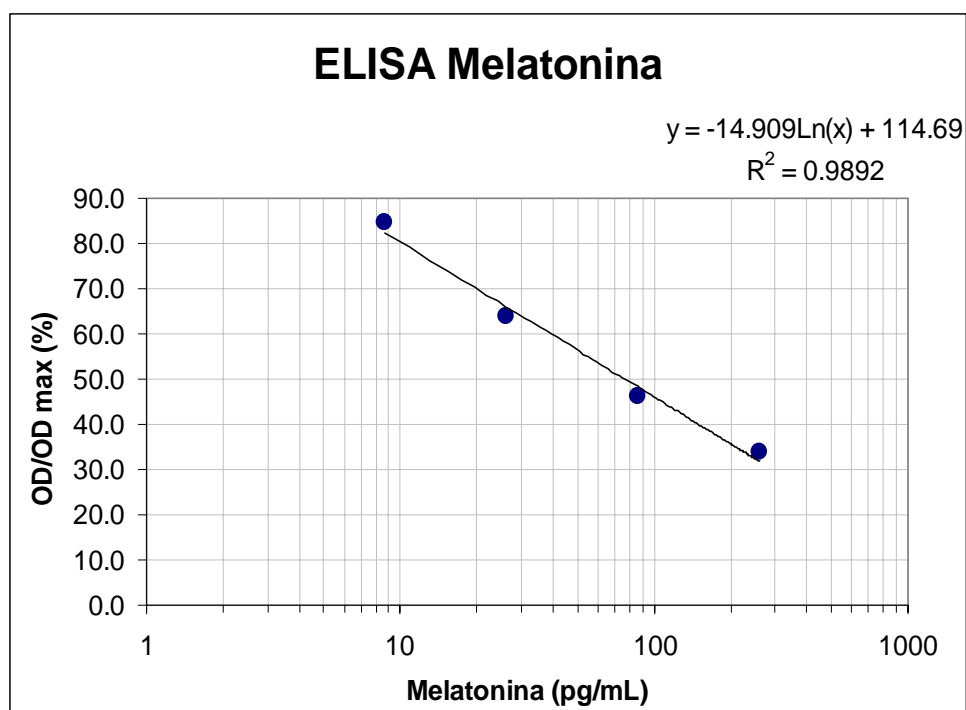
Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron calculadas utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba Tamhane como prueba *post hoc*. Para el análisis de los datos de cociente del área de spots se realizó previamente la transformación matemática para obtener el arcoseno de la raíz cuadrada. 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 cuantificación de melatonina sérica por ELISA, la determinación de proteínas y el radioinmunoensayo. Posteriormente se detallan los resultados de la cuantificación de melatonina sérica, de la liberación *in vitro* a partir de células mononucleares del bazo, de la determinación de células secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$  por ELISpot, y finalmente los resultados del Western blot para Proencefalina A en las muestras del bazo de la rata.

### 3.1 Curva patrón para la cuantificación de MEL sérica por la metodología ELISA.

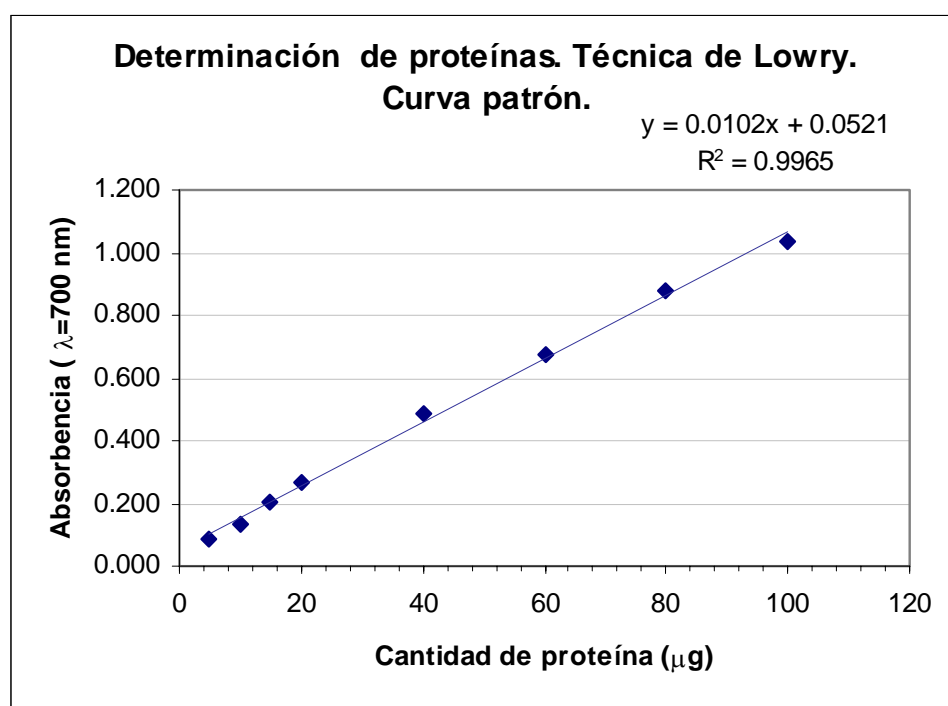
La curva patrón que se muestra a continuación fue obtenida a partir de la metodología ELISA, previamente descrita. El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) es superior a 0.950, por lo que se considera una curva confiable para la cuantificación del analito.



**Figura 3.1** Representación gráfica de una curva patrón utilizada para la cuantificación de melatonina sérica.

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

A continuación se muestra la representación gráfica de una curva patrón de albúmina sérica bovina, obtenida mediante la técnica de Lowry<sup>(97)</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. El límite de sensibilidad de esta metodología es de 5  $\mu\text{g}$ .



**Figura 3.2** Representación gráfica de una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) utilizada para la determinación de proteínas.

### 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.

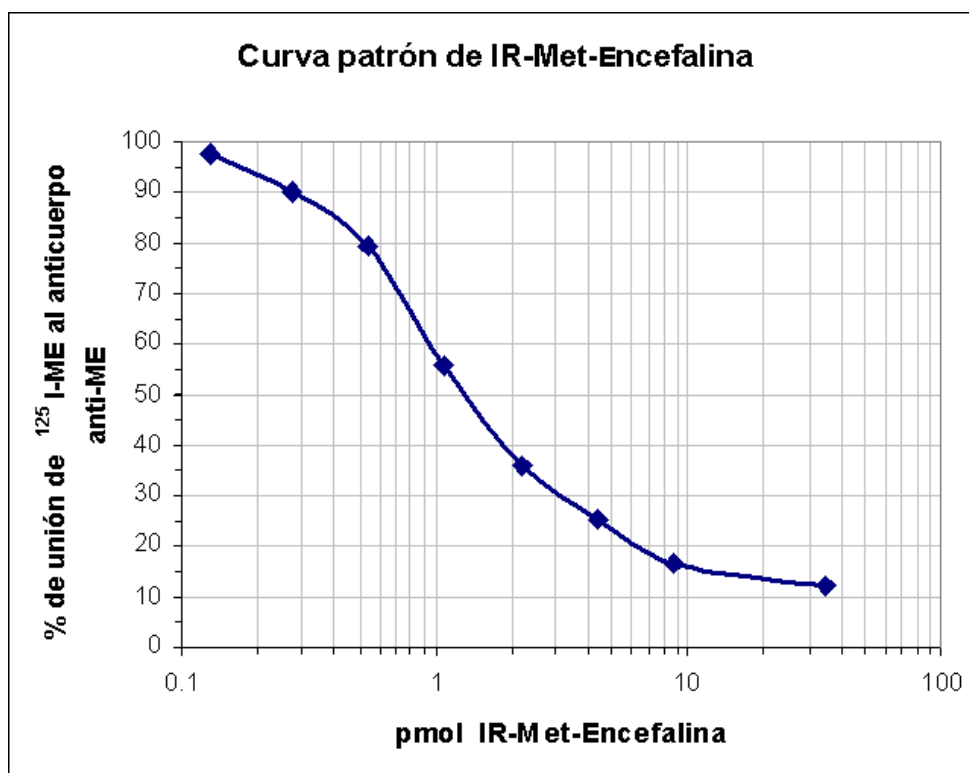


Figura 3.3 Representación gráfica de una curva patrón utilizada para la cuantificación de IR-Met-Encefalina por radioinmunoensayo.

### 3.4 Cuantificación de melatonina sérica.

Para corroborar que la secreción de melatonina se reduce en los animales que fueron sometidos a la luz continua durante 15 días (pinelectomía funcional), se cuantificó la melatonina sérica en este grupo experimental y en animales del grupo control *naive* (n=1). Las muestras se obtuvieron a las 01:00 h, que corresponde a la concentración sérica máxima de acuerdo al ritmo circádico de la MEL, y a las 13:00 h que corresponde a la mitad de la fase luminosa, en la que se espera una concentración sérica menor.

En la tabla 3.1 se muestran los valores de melatonina sérica expresados en pg/mL, para cada grupo experimental. En el grupo control, la concentración sérica de MEL a las 01:00 h es 165% mayor que a las 13:00 h. Por su parte, en el grupo sometido a la pinelectomía funcional por luz continua, se observa que la concentración sérica de MEL a las 13:00 h es aproximadamente un orden de magnitud menor y no se observa un



aumento a las 01:00 h con respecto a la concentración diurna. La concentración sérica de MEL a las 01:00 h es 17 veces menor en el animal sometido a luz continua con respecto al control.

**Tabla 3.1** Concentración sérica de MEL. Determinación mediante el método de ELISA.

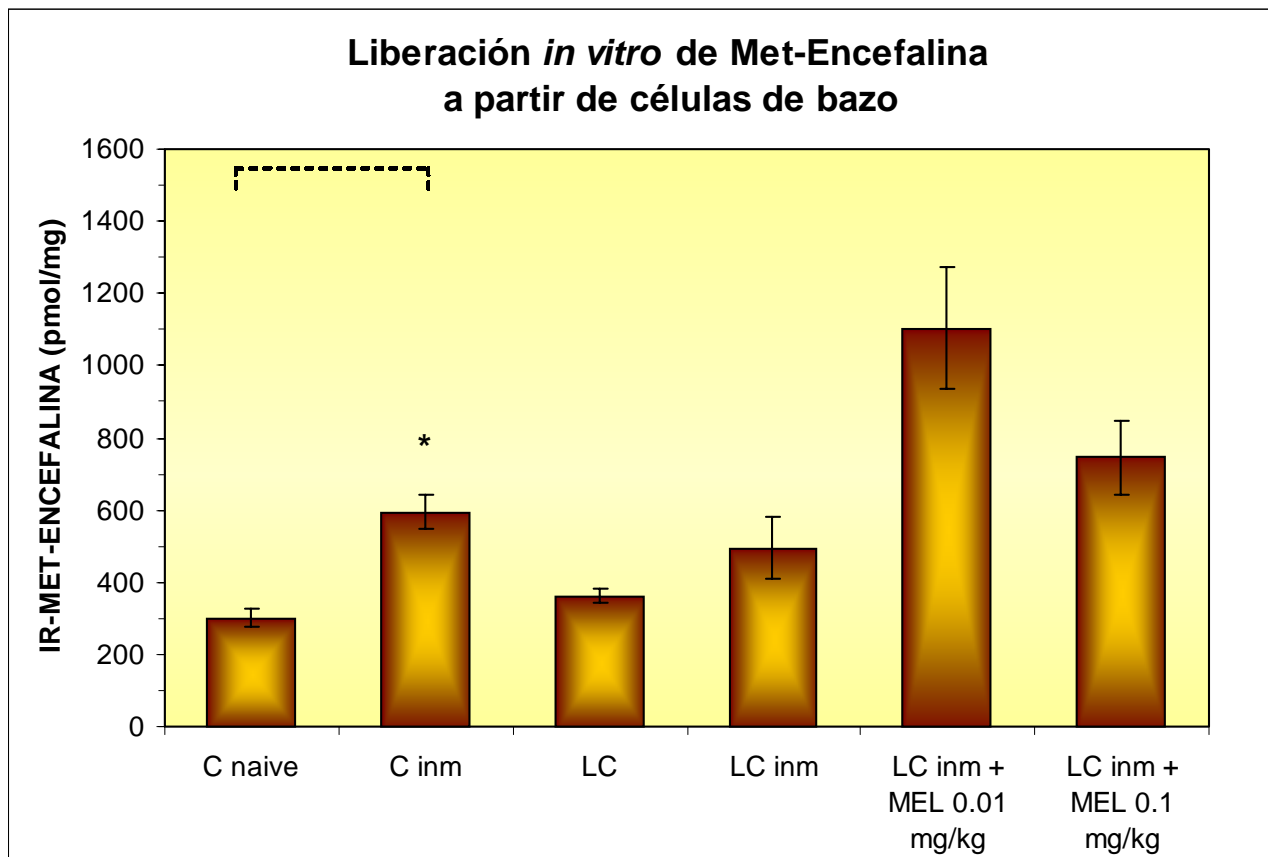
<b>Grupo experimental</b>	<b>MEL sérica (pg/mL) 13:00 h</b>	<b>MEL sérica (pg/mL) 01:00 h</b>
Control <i>naive</i>	335	895
Luz continua	40	51

### **3.5 Liberación *in vitro* de péptidos opioides a partir de células mononucleares del bazo.**

Al igual que otros mensajeros químicos, los péptidos opioides se liberan para ejercer su efecto biológico. Para comprobar que las células inmunocompetentes son capaces de secretar dichos péptidos, se les aplicó potasio [(K<sup>+</sup>) 50 mM] como estímulo despolarizante. A continuación se describen los resultados de la cuantificación de encefalinas en los perfusados obtenidos a partir de las células mononucleares del bazo de la rata.

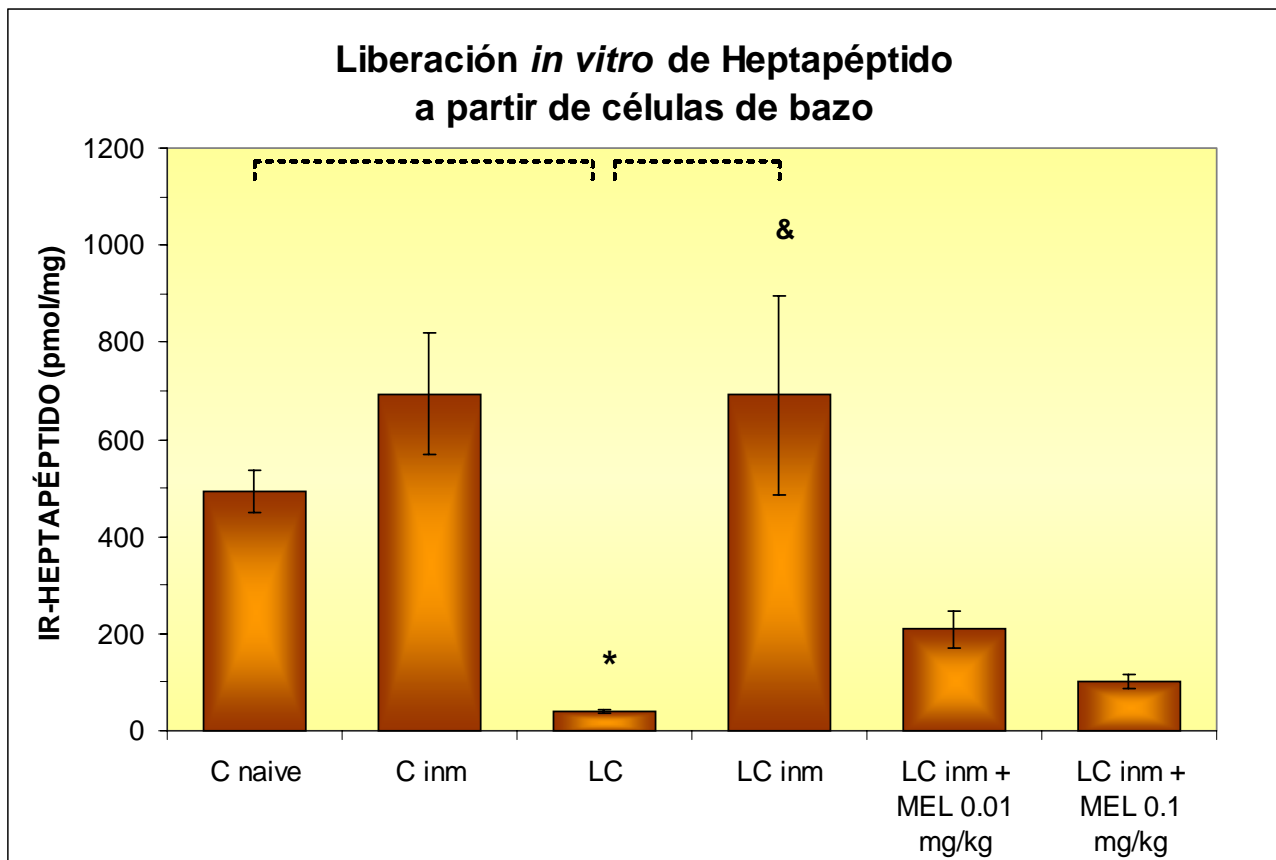
En la figura 3.4 se muestran los resultados de la cuantificación de Met-Encefalina liberada. Como se puede observar, la liberación de este péptido a partir de las células de los animales control que fueron inmunizados (C inm) se duplicó con respecto a los animales del grupo control *naive*. Este aumento es estadísticamente significativo.

Por su parte, en los animales sometidos a luz continua, sin inmunizar (LC) e inmunizados (LC inm), la liberación de Met-Encefalina fue de magnitud semejante a los animales control *naive*. En los animales inmunizados (LC inm) se halló una ligera tendencia a aumentar, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. Finalmente, en las células de los animales en luz continua que fueron inmunizados y que recibieron cuatro dosis vespertinas de 0.01 y 0.1 mg/kg de MEL, se observa un claro aumento (100% y 60% respectivamente) en la cantidad de Met-Encefalina liberada con respecto a los animales que no recibieron la hormona de manera exógena. Sin embargo, dada la heterogeneidad de la varianza en las muestras, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.



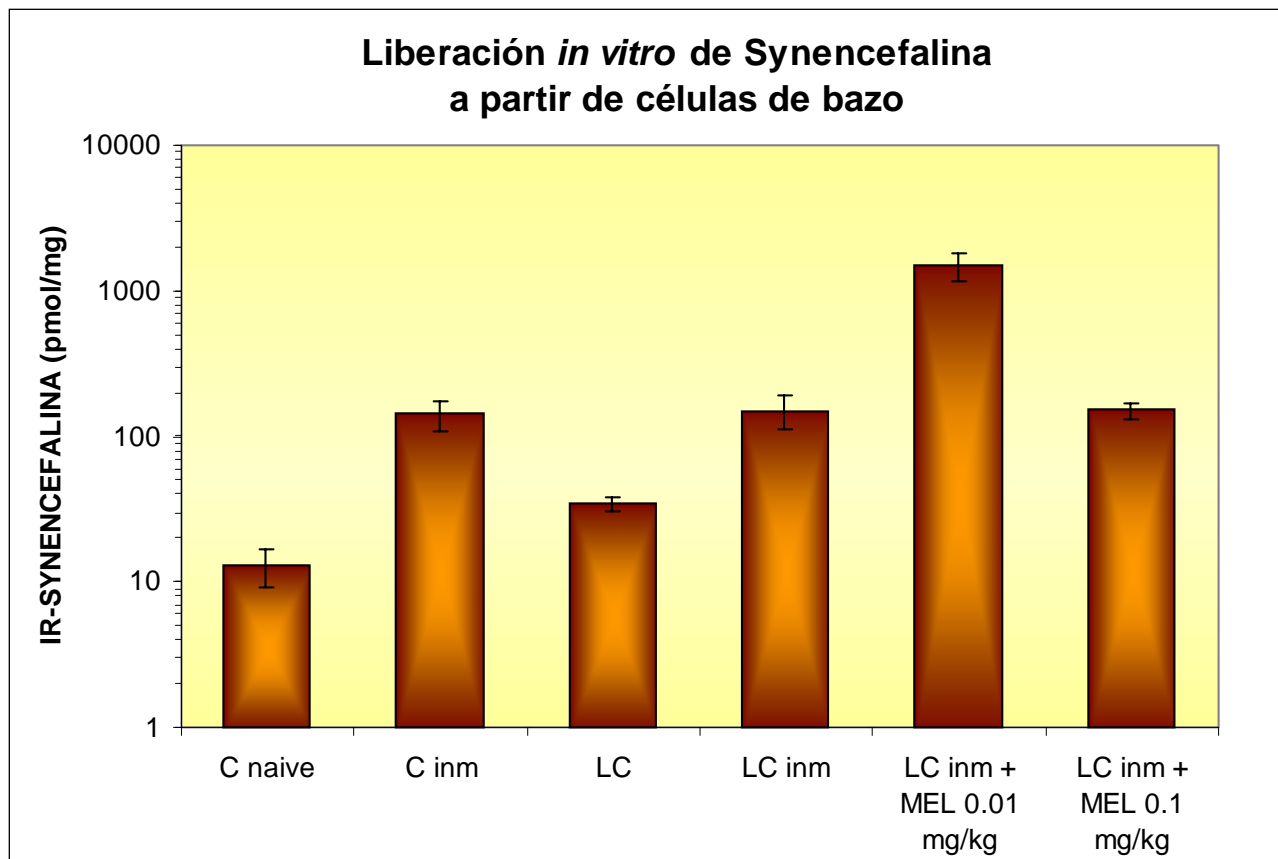
**Figura 3.4** Liberación *in vitro* de Met-Encefalina a partir de células mononucleares del bazo de la rata. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e.e.m; n=5. C: control; inm: inmunizado; LC: luz continua; MEL: Melatonina s.c. Estadística: ANOVA de una vía, *post hoc*: Tamhane. \*\*  $p < 0.01$  vs. Cnaive.

En la figura 3.5 se muestran los resultados de la cuantificación del Heptapéptido liberado. Se puede observar que en el caso de los animales control, las células de aquellos que fueron inmunizados tendieron a liberar más Heptapéptido que las células de los animales *naive*. Sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. En los animales sometidos a la luz continua se observó una disminución significativa de más del 500% en la cantidad de Heptapéptido liberado con respecto a los animales control. Asimismo, en los animales de luz continua que fueron inmunizados se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la liberación de este péptido, con respecto a los animales no inmunizados. En los animales de luz continua inmunizados a los que se les administró MEL en dosis de 0.01 y 0.1 mg/kg, no se observaron cambios estadísticamente significativos con respecto a los animales a los que no se les administró la hormona.



**Figura 3.5** Liberación *in vitro* de Heptapéptido a partir de células mononucleares del bazo de la rata. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e.e.m;  $n=5$ . C: control; inm: inmunizado; LC: luz continua; MEL: Melatonina s.c. Estadística: ANOVA de una vía, *post hoc*: Tamhane. \*  $p < 0.05$  vs. Cnaive; &  $p < 0.05$  vs. LC.

En la figura 3.6 se muestran los resultados de la cuantificación de Synencefalina liberada. En este caso, como en los anteriores, se observa que en los animales que han sido inmunizados la liberación de péptidos derivados de la Proencefalina A es mayor que en los animales que no recibieron dicho tratamiento, tanto en el grupo control como en el de luz continua. La cantidad de Synencefalina liberada por las células de los animales sometidos a la luz continua no mostró diferencias con respecto a los animales control. La cantidad de Synencefalina liberada mostró un aumento en los animales de luz continua a los que se administró MEL en una dosis de 0.01 mg/kg, con respecto a aquellos que no recibieron la hormona de manera exógena. Sin embargo, dada la heterogeneidad de la varianza en las muestras, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.



**Figura 3.6** Liberación *in vitro* de Synencefalina a partir de células mononucleares del bazo de la rata. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  e.e.m; n=5. C: control; inm: inmunizado; LC: luz continua; MEL: Melatonina s.c. Estadística: ANOVA de una vía, *post hoc*: Tamhane.

### 3.6 Determinación de células formadoras de anticuerpos IgM, específicos contra eritrocitos de carnero.

Como un primer acercamiento al efecto de la pinealectomía funcional en la fisiología del sistema inmune de la rata, se utilizó la técnica de Cunningham-Szenberg para la determinación del número de células formadoras de anticuerpos IgM, específicos contra eritrocitos de carnero.

En la tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos, los cuales se expresan como la media  $\pm$  e.e.m. de un total de 6 animales por grupo. El ensayo se llevó a cabo por cuadruplicado para cada muestra, en seis experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

El grupo de animales que fue sometido a la luz continua, presentó un número significativamente menor de CFA que el grupo control (\*  $p < 0.05$  vs. control).

**Tabla 3.2** Células formadoras de anticuerpos (CFA) contra eritrocitos de carnero. Estadística: t de Student.

Grupo	CFA / $1 \times 10^6$ células de bazo
C inm	$1063 \pm 65$
LC inm	$850 \pm 59^*$

### 3.7 Evaluación del efecto de la MEL y los opioides sobre la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$ .

La tabla 3.3 y la figura 3.7 corresponden a la determinación de células secretoras de IL-2. Se puede observar que los animales control que fueron inmunizados (C inm), presentan un número significativamente mayor de CFS que los animales *naive* ( $p < 0.05$ ), los cuales no fueron sometidos al estímulo antigénico. La cantidad encontrada en los animales *naive* se considera el nivel basal de células secretoras de IL-2 en animales sanos. Los animales sometidos a luz continua tienden a presentar un número basal de CFS mayor que los

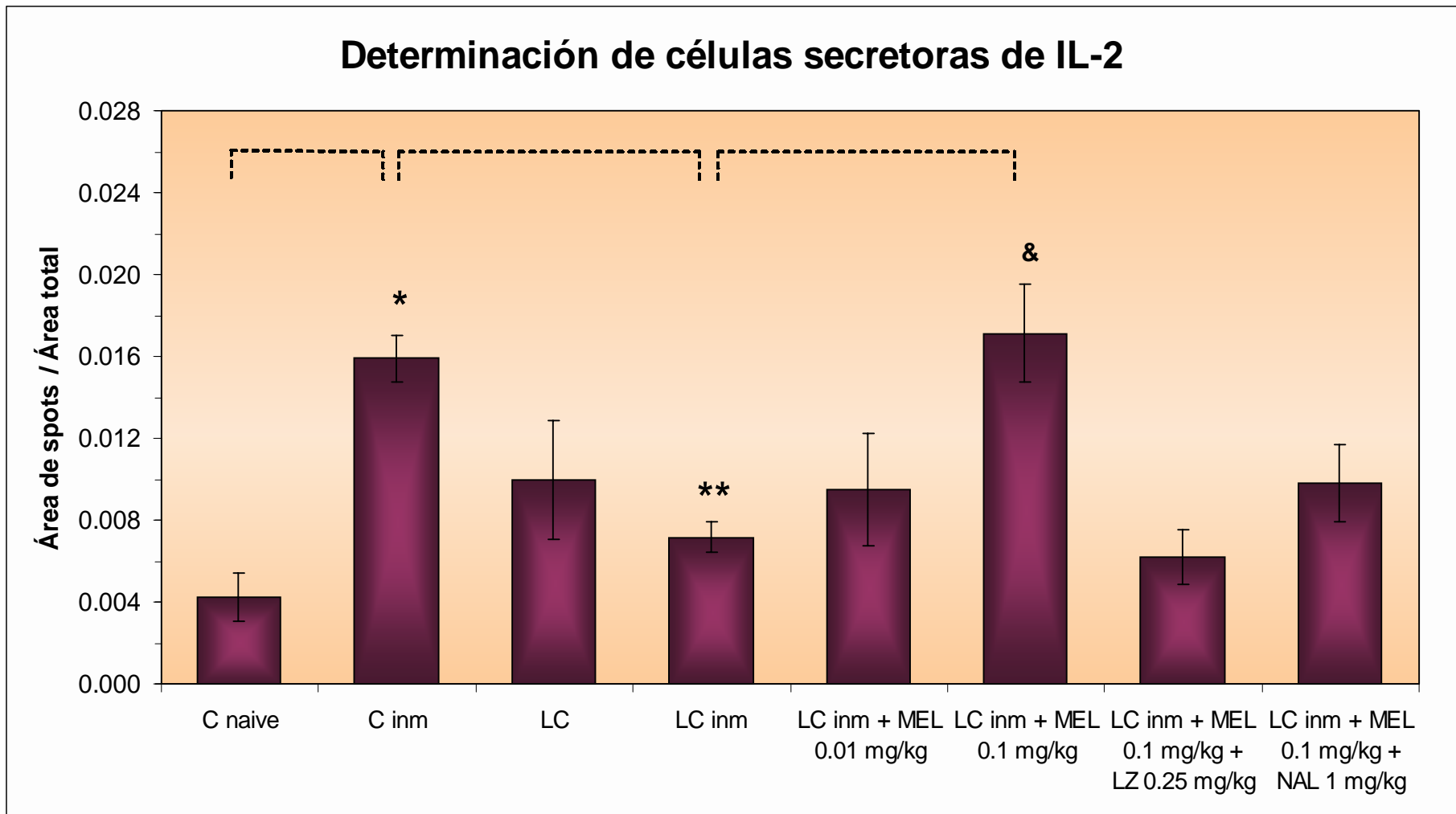
animales control, sin embargo el error estándar es grande y esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por su parte, los animales en luz continua que recibieron el estímulo antigénico (LC inm) presentaron un número significativamente menor de CFS con respecto a los animales control con el mismo tratamiento ( $p < 0.01$ ). En los animales sometidos a luz continua que recibieron MEL exógena (LC inm + MEL) en una dosis de 0.1 mg/kg, se observa un aumento significativo con respecto a los animales que no recibieron la hormona ( $p < 0.05$ ).

Los animales sometidos a luz continua, inmunizados y que se les administró MEL (0.1 mg/kg) y su antagonista LZ (0.25 mg/kg), presentaron una tendencia a disminuir con respecto a los animales a los que no se les administró el antagonista, lo que sugiere que el efecto de la MEL sobre la función inmune puede estar mediado por sus receptores de membrana. Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Por otra parte, en los animales sometidos a luz continua, inmunizados, a los que además de administrar MEL se administró la dosis de 1 mg/kg del antagonista opioide NAL, se observó una ligera disminución del número de CFS, no estadísticamente significativa, con respecto a los animales que no fueron administrados con dicho antagonista. En los animales con las mismas condiciones que recibieron 5 mg/kg de naloxona, no se observaron cambios en la cantidad de CFS.

**Tabla 3.3** Células secretoras de IL-2, en el bazo de la rata,  $n=2$ . CFS: Células Formadoras de Spots C: control, inm: inmunizado, LC: luz continua. Estadística: ANOVA de una vía, *post hoc*: Tamhane. &  $p < 0.05$  vs. C naive; \*  $p < 0.05$  vs. C inm; \*\*  $p < 0.001$  vs. C inm; §  $p < 0.05$  vs. LC inm.

Grupo	CFS / $1 \times 10^5$ esplenocitos	Área de spots / Área del fondo del pozo
C naive	$330 \pm 75$	$0.004 \pm 0.001$
C inm	$657 \pm 52$	$0.016 \pm 0.001$ &
LC	$628 \pm 125$	$0.010 \pm 0.003$
LC inm	$415 \pm 25$ *	$0.007 \pm 0.001$ **
LC inm + MEL 0.01 mg/kg	$411 \pm 80$	$0.009 \pm 0.003$
LC inm + MEL 0.1 mg/kg	$614 \pm 75$	$0.017 \pm 0.002$ §
LC inm + MEL 0.1 mg/kg + LZ 0.25 mg/kg	$338 \pm 53$	$0.006 \pm 0.001$
LC inm + MEL 0.1 mg/kg + NAL 1 mg/kg	$521 \pm 84$	$0.010 \pm 0.002$



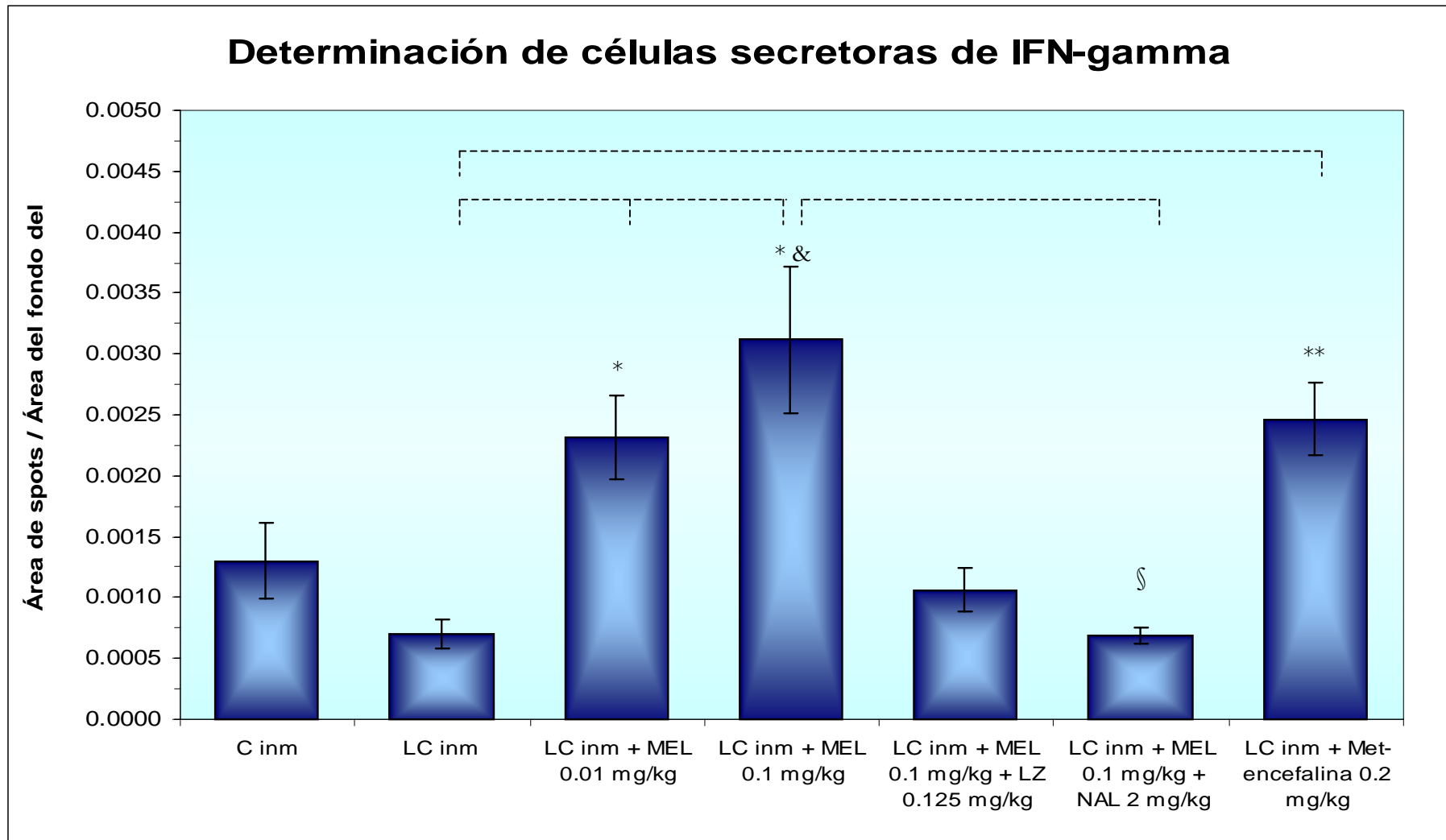
**Figura 3.7** Determinación de células secretoras de IL-2. Representación de la relación área de spots/área total del fondo del pozo en los diferentes grupos experimentales. C: control; inm: inmunizado; LC: luz continua; MEL: Melatonina; LZ: Luzindol; NAL: Naloxona. Resultados expresados como la media  $\pm$  e.e.m; n=2 por quintuplicado. Estadística: ANOVA de una vía, *post hoc*: Tamhane \*  $p < 0.05$  vs. Cnaive; \*\*  $p < 0.01$  vs. C inm; &  $p < 0.05$  vs. LC inm.

En la tabla 3.4 y la figura 3.8 podemos observar los resultados de la determinación de células secretoras de IFN- $\gamma$ . De manera similar que para las células secretoras de IL-2, en los animales inmunizados que fueron sometidos a la luz continua hay una tendencia a la disminución con respecto a los animales control. Asimismo, en los animales sometidos a la luz continua que recibieron la MEL exógena, se observa un aumento estadísticamente significativo con la dosis de 0.01 mg/kg y de 0.1 mg/kg, con respecto a los animales que no fueron administrados con la hormona. Por su parte, los animales de luz continua que además de MEL se les administró luzindol, mostraron un nivel similar a los animales que no recibieron la hormona. Este cambio no es estadísticamente significativo con respecto a los animales administrados con MEL, debido a la heterogeneidad de la varianza en estas muestras. De manera similar, los animales a los que además de MEL se administró el antagonista opioide naloxona, mostraron una disminución significativa con respecto a los animales que sólo recibieron la hormona. Finalmente podemos observar que en los animales carentes de MEL a los que se administró Met-enkefalina, hubo un aumento significativo con respecto a los animales a los que no se administró este péptido. Este aumento es similar en magnitud al obtenido al administrar MEL exógena a estos animales.

**Tabla 3.4** Células secretoras de IFN- $\gamma$ , en el bazo de la rata, n=2. CFS: Células Formadoras de Spots C: control, inm: inmunizado, LC: luz continua. Estadística: ANOVA de una vía, *post hoc*: Tamhane. & p<0.05 vs. C naive; \* p<0.05 vs. C inm; \*\* p<0.001 vs. C inm; § p<0.05 vs. LC inm.

Grupo	CFS / $1 \times 10^5$ esplenocitos	Área de spots / Área del fondo del pozo
C naive	72 $\pm$ 8	0.0009 $\pm$ 0.0003
C inm	81 $\pm$ 16	0.0013 $\pm$ 0.0003
LC	51 $\pm$ 8	0.0008 $\pm$ 0.0002
LC inm	52 $\pm$ 7	0.0007 $\pm$ 0.0001
LC inm + MEL 0.01 mg/kg	131 $\pm$ 18	0.0023 $\pm$ 0.0003 *
LC inm + MEL 0.1 mg/kg	158 $\pm$ 19 *	0.0031 $\pm$ 0.0006 *
LC inm + MEL 0.1 mg/kg + LZ 0.125 mg/kg	71 $\pm$ 12	0.0011 $\pm$ 0.0002
LC inm + MEL 0.1 mg/kg + NAL 2 mg/kg	50 $\pm$ 5 &	0.0007 $\pm$ 0.0001 &
LC inm + ME <sub>n</sub> k 0.2 mg/kg	149 $\pm$ 14 **	0.0025 $\pm$ 0.0003 **





**Figura 3.8** Determinación de células secretoras de IFN- $\gamma$  mediante ELISpot. Representación de la relación área de spots/área total del fondo del pozo en los diferentes grupos experimentales. C: control; inm: inmunizado; LC: luz continua; MEL: Melatonina; LZ: Luzindol; NAL: Naloxona. Resultados expresados como la media  $\pm$  e.e.m; n=2 por quintuplicado. Estadística: ANOVA de una vía, *post hoc*: Tamhane \*  $p < 0.05$  vs. LC inm; &  $p < 0.05$  vs. LC inm + MEL 0.01; §  $p < 0.05$  vs. LC inm + MEL 0.1; \*\*  $p < 0.01$  vs. LC inm.

### 3.7 Western blot para Proencefalina A en extractos de células mononucleares del bazo de la rata.

Una alternativa para estudiar la expresión del gen de la Proencefalina A consiste en analizar la presencia de este precursor proteico en las células del bazo de la rata. Para ello se utilizaron como herramientas metodológicas la separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, la transferencia electroforética de las proteínas a membranas de nitrocelulosa y el Western blot para la detección inmunoenzimática de la Proencefalina A. Posteriormente, a partir de las membranas de Western blot, se realizó un análisis densitométrico semicuantitativo que permitió establecer diferencias en la cantidad de proteína presente, lo que a su vez representa la magnitud de la expresión de dicha proteína en los diferentes grupos experimentales.

A continuación se presentan los resultados correspondientes a los extractos concentrados de las células mononucleares del bazo de cuatro ratas, de cada uno de los siguientes grupos experimentales: control *naive*, control + vehículo, luz continua y luz continua + MEL. Se determinó la cantidad de proteínas en dichos extractos y se diluyeron de tal manera que se aplicara en los carriles la misma cantidad de proteína de cada muestra.

En la figura 3.9 se presenta la imagen digital de dos membranas procesadas simultáneamente, que corresponden a la aplicación de 7.5 µg de proteína de cada muestra en el orden que se detalla enseguida. Para ambas membranas los carriles 1 y 2 corresponden a los marcadores de peso molecular: Protein Molecular Marker Mid/Low Range de AMRESCO y Kaleidoscope Prestained Standards de Bio-Rad, respectivamente.

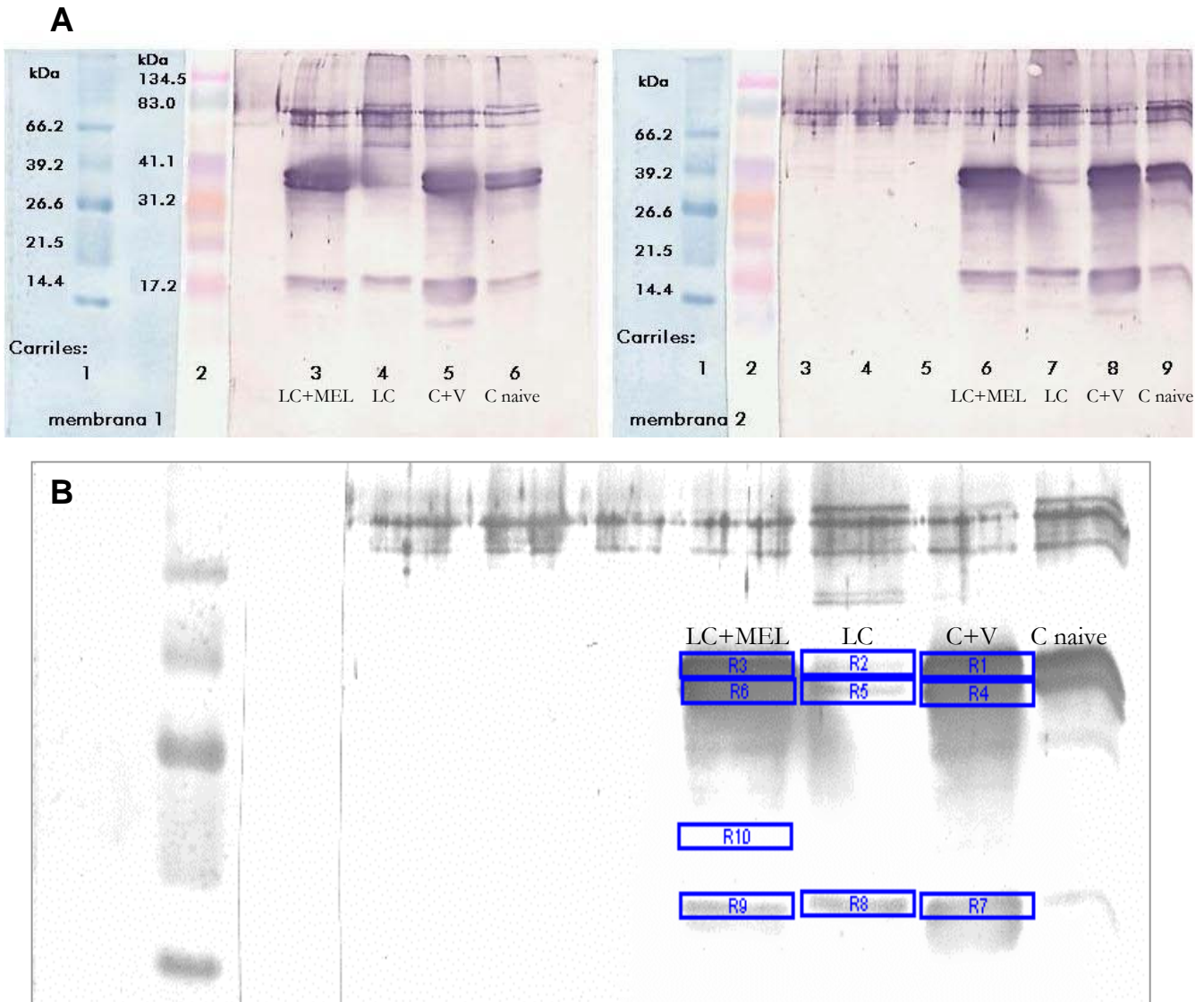
En la membrana 1:

- Carril 3: Luz continua + MEL 0.8 mg/kg (única dosis, s.c., sacrificio 4 h después).
- Carril 4: Luz continua
- Carril 5: Control + vehículo (0.1% etanol en solución salina isotónica)
- Carril 6: Control *naive*

En la membrana 2, estas muestras corresponden a los carriles 6, 7, 8 y 9, respectivamente.

En el panel B de la misma figura, se muestra la imagen digital de la membrana 2, en la

cual se observaron las bandas con mayor nitidez. Esta imagen fue obtenida mediante el densitómetro Model GS-690 Imaging Densitometer de BIO-RAD, para el análisis de las bandas. Se realizó el análisis densitométrico por volumen, calculado como una relación del área y de la intensidad de coloración de las bandas inmunorreactivas.



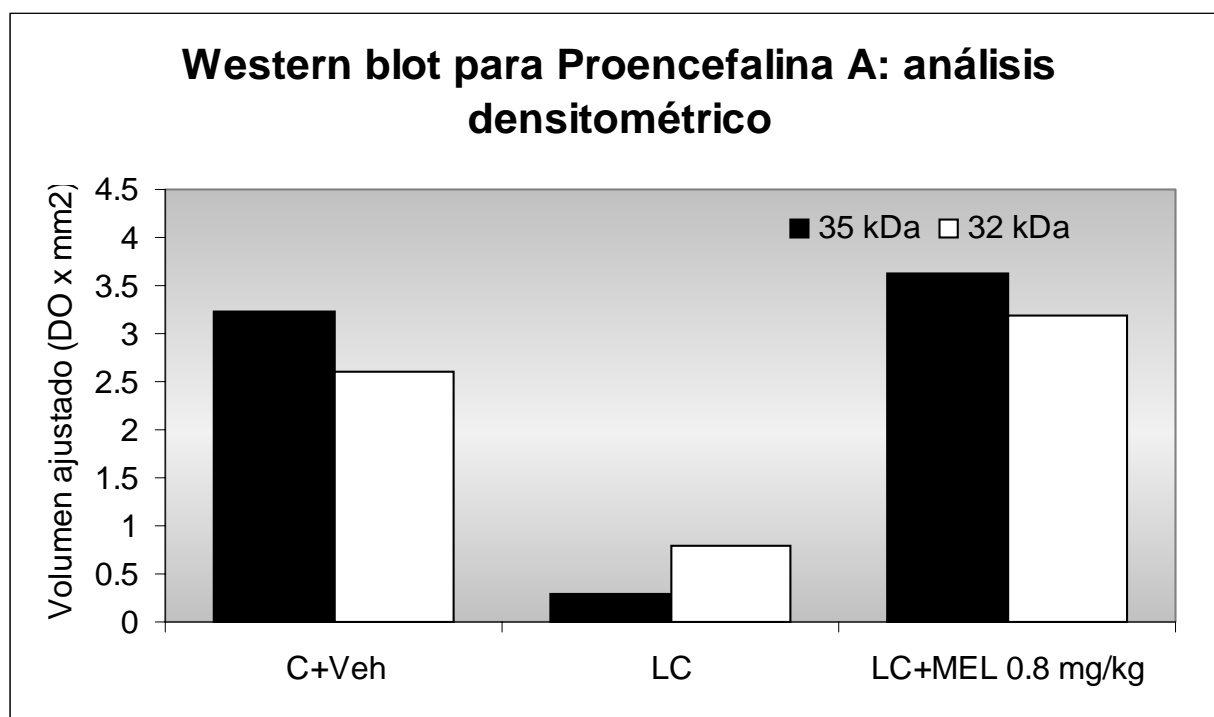
**Figura 3.9** Western blot para Proencefalina A en extractos concentrados de células mononucleares del bazo de la rata (n=4). Panel A: Imagen digital de las membranas 1 y 2, muestra: 7.5  $\mu$ g por carril. Panel B: Imagen densitométrica de la membrana 2, se muestran resaltadas las bandas ubicadas en 35 y 32 kDa aproximadamente (R1 a R6) y en 20 kDa aproximadamente (R7-R9). R10 corresponde a la referencia de fondo. C: control, V: vehículo, LC: luz continua, MEL: Melatonina.

En ambas imágenes presentadas en el panel A de esta figura, se puede distinguir un doblete de bandas ubicado entre 31 y 39 kDa y una tercera banda ubicada entre 17 y 21 kDa. Asimismo, se puede observar que en los carriles 4 y 7 respectivamente, que corresponden a los animales que fueron sometidos a luz continua, el doblete de bandas es menos grueso y tiene una intensidad de color menor con respecto a las bandas obtenidas en los carriles de los otros grupos experimentales. Para determinar semicuantitativamente estos cambios se realizó el análisis densitométrico de las bandas que aparecen resaltadas en el panel B de la figura anterior, cuyos resultados se presentan en la siguiente tabla. Se consideró un área constante para las bandas, de tal manera que se puedan comparar con base en la densidad óptica. Las bandas en el carril de la muestra control *naive* no se consideraron para este análisis debido a la deformación que presentaron en el extremo derecho.

**Tabla 3.5** Análisis densitométrico de la membrana 2 mostrada en la figura 3.9, panel B. Western Blot para Proencefalina A en extractos concentrados de células mononucleares del bazo de 4 ratas.

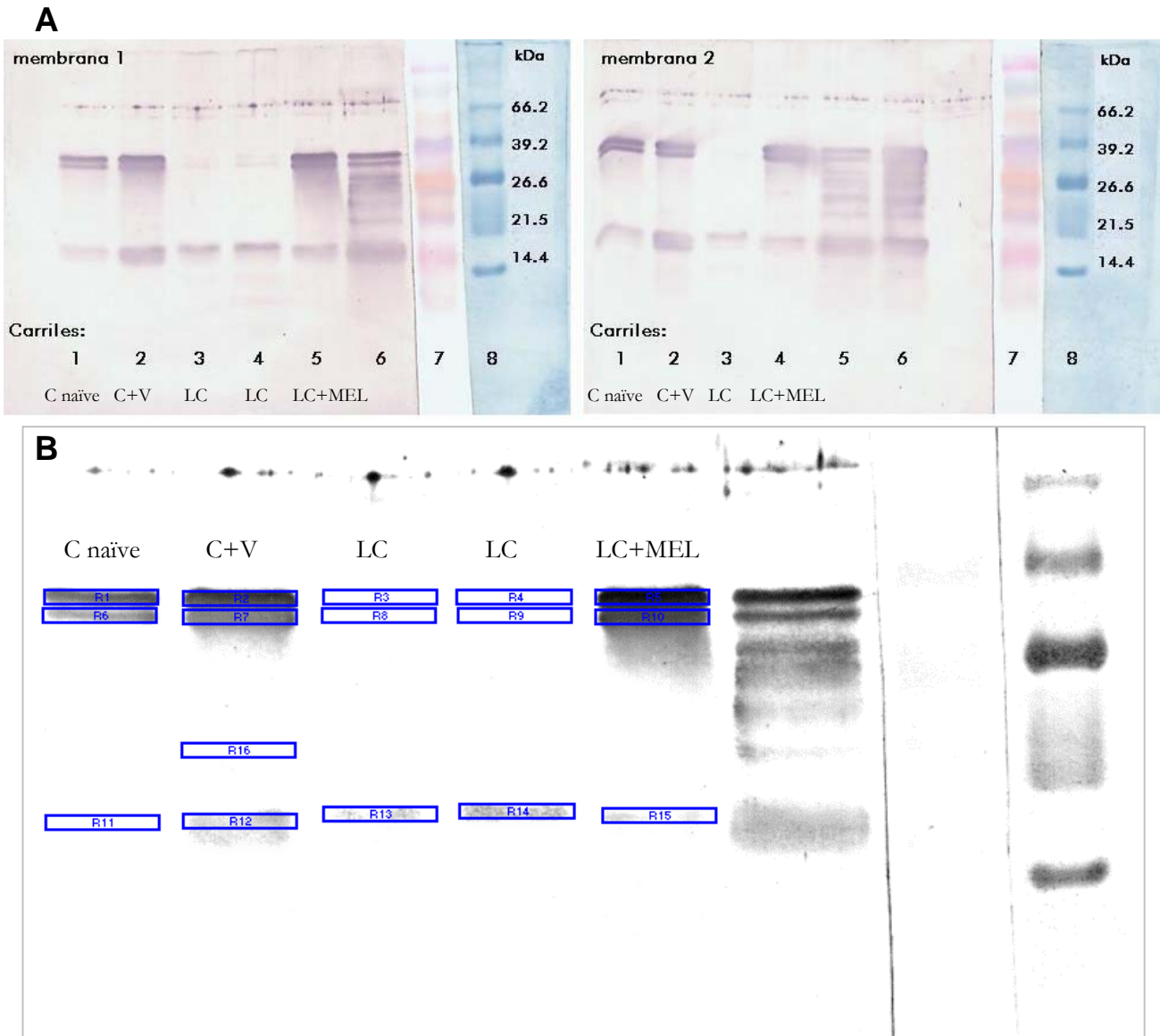
Etiqueta	Tipo	Grupo experimental	Área (mm <sup>2</sup> )	Densidad óptica (DO) promedio	Volumen (DO x mm <sup>2</sup> )	Volumen ajustado (DO x mm <sup>2</sup> )
R1	Muestra	C+V	11.351	0.285	3.238	3.237
R2	Muestra	LC	11.351	0.026	0.300	0.299
R3	Muestra	LC+MEL	11.351	0.320	3.633	3.633
R4	Muestra	C+V	11.351	0.229	2.600	2.599
R5	Muestra	LC	11.351	0.070	0.797	0.796
R6	Muestra	LC+MEL	11.351	0.281	3.191	3.190
R7	Muestra	C+V	11.351	0.084	0.953	0.952
R8	Muestra	LC	11.351	0.049	0.555	0.555
R9	Muestra	LC+MEL	11.351	0.045	0.511	0.511
R10	Fondo	Fondo	11.351	0	0.001	0

En la figura 3.10, se muestra el gráfico correspondiente a la tabla anterior, en el que se puede observar claramente que en el carril que corresponde a los animales sometidos a luz continua, hay una disminución en el volumen (D.O. x mm<sup>2</sup>) del doblete de bandas que se encuentran en los pesos moleculares aproximados de 35 y 32 kDa, con respecto a los animales control y los animales con luz continua a los que se administró MEL exógena. La banda ubicada alrededor de los 20 kDa, tiende a disminuir ligeramente en los grupos que fueron sometidos a la luz continua con respecto al grupo control.



**Figura 3.10** Análisis densitométrico de la membrana mostrada en la figura 3.9 panel B. Western Blot para Proencefalina A en extractos concentrados de células mononucleares de bazo de rata (n=4). C: Control; Veh: vehículo; LC: Luz continua; MEL: Melatonina.

En la figura 3.11 se presenta la imagen digital de dos membranas procesadas simultáneamente, que corresponden a la aplicación de 4 µg de proteína de cada muestra en el orden que se detalla enseguida. De manera similar que en el caso anterior, los carriles 7 y 8 de ambas membranas corresponden a los marcadores de peso molecular, Protein Molecular Marker Mid/Low Range de AMRESCO y Kaleidoscope Prestained Standards de Bio-Rad, respectivamente.



**Figura 3.11** Western blot para Proencefalina A en extractos concentrados de células mononucleares del bazo de la rata ( $n=4$ ). Panel A: Imagen digital de las membranas 1 y 2; muestra: 4  $\mu\text{g}$  por carril. Panel B: Imagen densitométrica de la membrana 1, se muestran resaltadas las bandas ubicadas en 35 y 32 kDa aproximadamente (R1 a R10) y en 20 kDa aproximadamente (R11-R15). R16 corresponde a la referencia de fondo. C: Control; V: vehículo; LC: luz continua; MEL: Melatonina.

En la membrana 1 se aplicaron las muestras en el siguiente orden:

- Carril 1: Control *naïve*.
- Carril 2: Control + vehículo.
- Carriles 3 y 4: Luz continua.
- Carril 5: Luz continua + MEL 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .
- Carril 6: Extracto de bazo completo, Control *naïve*.

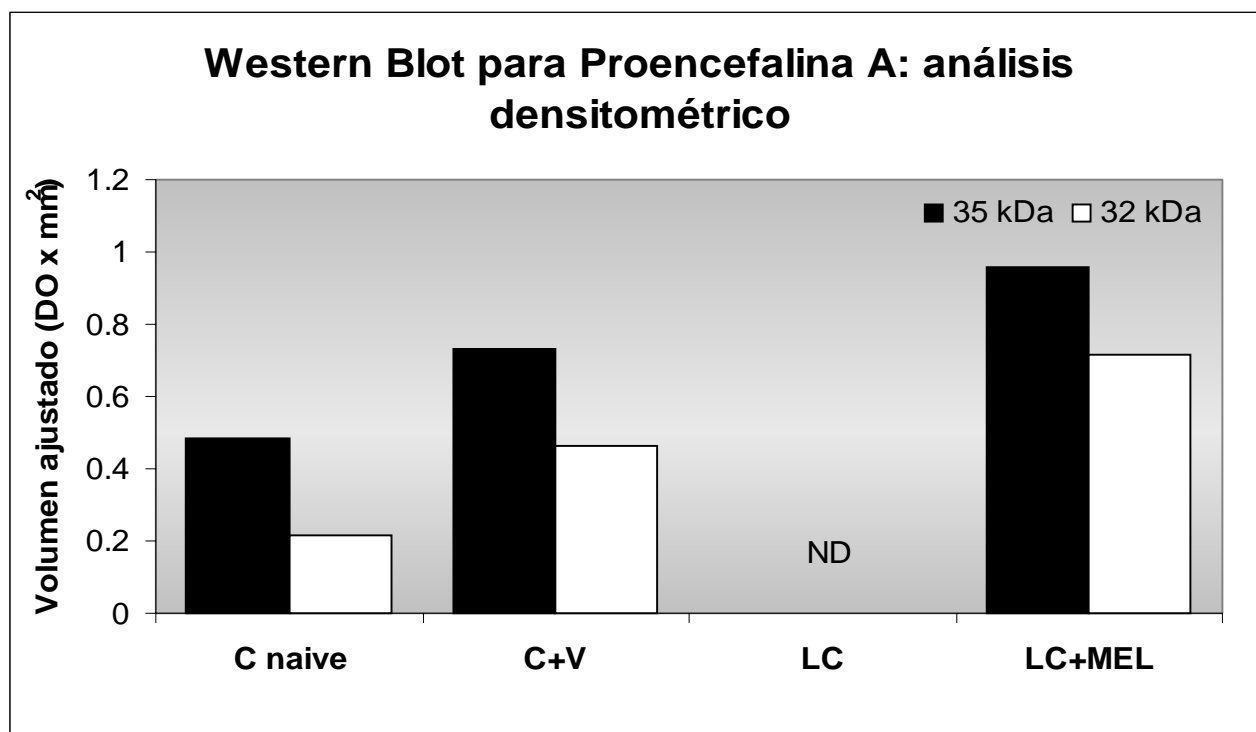
En la membrana 2 se aplicaron las muestras en el mismo orden que la membrana 1, ocupando los carriles 1 a 4. Los carriles 5 y 6 corresponden a extractos de bazo y timo completos, ambos del grupo Control *naive*.

De igual manera que en el caso anterior, en las imágenes presentadas en el panel A de esta figura se puede distinguir un doblete de bandas ubicado entre 31 y 39 kDa y una tercera banda ubicada entre 17 y 21 kDa. Asimismo, en las dos membranas se puede observar que en los carriles que corresponden a los animales que fueron sometidos a luz continua, el doblete de bandas es prácticamente indetectable con respecto a las bandas obtenidas en los carriles de los otros grupos experimentales. Para determinar semicuantitativamente estos cambios se realizó el análisis densitométrico de las bandas que aparecen resaltadas en el panel B de la figura 3.11 (imagen digital de la membrana 1), en las mismas condiciones que la ocasión anterior. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 3.3** Análisis densitométrico de la membrana mostrada en la figura 3.11 panel B. Western Blot para Proencefalina A en extractos de células mononucleares de bazo de rata. ND: no detectable por este método de análisis.

Etiqueta	Grupo experimental	Tipo	Área (mm <sup>2</sup> )	Densidad óptica (DO) promedio	Volumen (DO x mm <sup>2</sup> )	Volumen ajustado (DO x mm <sup>2</sup> )
R1	C naive	Muestra	5.645	0.086	0.483	0.483
R2	C+V	Muestra	5.645	0.13	0.732	0.732
R3	LC	Muestra	5.645	ND	ND	ND
R4	LC	Muestra	5.645	ND	ND	ND
R5	LC+MEL	Muestra	5.645	0.17	0.958	0.958
R6	C naive	Muestra	5.645	0.038	0.217	0.217
R7	C+V	Muestra	5.645	0.082	0.463	0.463
R8	LC	Muestra	5.645	ND	ND	ND
R9	LC	Muestra	5.645	ND	ND	ND
R10	LC+MEL	Muestra	5.645	0.126	0.714	0.714
R11	C naive	Muestra	5.645	ND	ND	ND
R12	C+V	Muestra	5.645	0.016	0.091	0.091
R13	LC	Muestra	5.645	0.006	0.033	0.033
R14	LC	Muestra	5.645	0.023	0.129	0.129
R15	LC+MEL	Muestra	5.645	0.003	0.017	0.017
R16	Fondo	Fondo	5.645	0	0	0

En la figura 3.12, se muestra el gráfico correspondiente a la tabla anterior, en el que se puede observar que para la muestra que corresponde a los animales sometidos a luz continua, el volumen (D.O. x mm<sup>2</sup>) del doblete de bandas que se encuentran en los pesos moleculares aproximados de 35 y 32 kDa no resulta detectable por este método de análisis. Por su parte, se observa que en los animales control que recibieron el vehículo en el que se disuelve la melatonina el volumen de las bandas tiende a aumentar. En el caso de los animales sometidos a luz continua que recibieron MEL de manera exógena, el volumen de las bandas es mayor incluso que los animales control y control + vehículo.



**Figura 3.12** Análisis densitométrico de la membrana mostrada en la figura 3.11 panel B. Western Blot para Proencefalina A en extractos de células mononucleares de bazo de rata (n=4). ND: no detectable por este método de análisis. C: control, V: vehículo, LC: luz continua; MEL: Melatonina.



---

## CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Los resultados más relevantes del presente trabajo apoyan la importancia de la relación bioquímica-funcional entre la MEL y los péptidos opioides en la regulación de la respuesta inmune primaria en la rata.

Existen numerosas evidencias que demuestran la participación tanto de la MEL como de los opioides endógenos en la regulación fisiológica del sistema inmune. En particular, el grupo de Maestroni y cols.<sup>(99)</sup> ha sugerido que la MEL ejerce sus efectos inmunoestimulatorios a través de los opioides. Con base en ello, nuestro grupo de trabajo ha abordado el estudio de la relación funcional entre la MEL y los péptidos opioides partiendo del punto de vista bioquímico, con especial interés en el efecto de la MEL sobre la síntesis y la liberación de los opioides a partir de células inmunocompetentes; y desde el punto de vista fisiológico al tratar de dilucidar qué efecto tienen ambos (MEL y opioides) sobre las funciones de dichas células en el contexto de la respuesta inmune primaria, específicamente la secreción de anticuerpos y de citocinas.

En este sentido, se demostró previamente que la ausencia de MEL endógena disminuye significativamente la concentración tisular de encefalinas en el bazo y el timo de la rata, y que la administración exógena de dicha hormona revierte este efecto en un periodo de 4 horas<sup>(190)</sup>. Esto sugiere que la MEL podría inducir la síntesis *de novo* de opioides en las células del sistema inmune. Además, en su carácter de mensajeros químicos, los péptidos opioides requieren ser liberados al espacio extracelular para ejercer sus efectos en las células que posean receptores opioides específicos. Se sabe que las células del sistema inmune poseen dichos receptores, por lo que los efectos de los opioides podrían generarse de manera autocrina o paracrina dentro de los órganos linfoides. Asimismo, se sabe que los opioides liberados por las células del sistema inmune también pueden ejercer un efecto analgésico local al actuar sobre las terminales nerviosas localizadas en el sitio de una lesión<sup>(29, 148, 158)</sup>. La participación de los opioides en la modulación de la respuesta inmune es tan extensa que actualmente se les considera las “nuevas citocinas”<sup>(95)</sup>, de tal

---

manera que es factible pensar que en una situación de reto inmunológico será necesario aumentar tanto la síntesis como la liberación de opioides. En este trabajo se demostró que las células del bazo de los animales que fueron inmunizados con eritrocitos de carnero mostraron una mayor liberación de encefalinas con respecto a los animales control. Esto es congruente con lo reportado por otros autores como Zurawski y cols.<sup>(212)</sup> quienes demostraron que la estimulación antigénica o mitogénica de células T de ratón, induce la expresión del ARNm de la Preproencefalina y la liberación de material opioide al medio de cultivo. Asimismo, Padrós y cols.<sup>(138)</sup> reportaron que la activación mitogénica de linfocitos humanos induce la liberación de opioides derivados de la Proencefalina.

Ahora bien, si la MEL ejerce sus efectos inmunoestimulantes a través de los opioides<sup>(99)</sup> y puede inducir la síntesis *de novo* de las encefalinas<sup>(190)</sup>, entonces es factible esperar que exista un correlato bioquímico entre la síntesis y la liberación de opioides en presencia de la hormona, en el contexto de la respuesta inmune primaria. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis ya que en los animales que fueron sometidos a la luz continua y se les administró MEL en un horario vespertino (16:00 h) durante cuatro días consecutivos tras la inmunización con eritrocitos de carnero, la liberación de MENk y Synencefalina a partir de células mononucleares fue mayor con respecto a los animales que no recibieron la hormona de manera exógena. La aparente disminución de la liberación de Heptapéptido en los animales que se les administró MEL puede deberse al procesamiento postraducciona diferencial de la Proencefalina A (PEA) en las células mononucleares del bazo. Saravia y cols.<sup>(165)</sup> reportaron que en éstas células la PEA se procesa preferentemente para generar los péptidos de bajo peso molecular como la MENk y tres péptidos menores a 1.0 kDa derivados de la Synencefalina. En este sentido, el Heptapéptido puede procesarse para generar MENk, a través de enzimas de tipo carboxipeptidasa A-like<sup>(113)</sup>.

Entre los principales efectos tanto de la MEL como de los opioides sobre las células inmunocompetentes en la respuesta primaria ante un antígeno, se encuentra la regulación de la secreción de otras citocinas. En particular, en este trabajo se evaluó su efecto sobre

la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Estas dos citocinas son producidas y secretadas por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados. Ambas citocinas inducen la proliferación de los linfocitos B y su diferenciación en células plasmáticas, es decir, promueven la respuesta humoral primaria ante un antígeno T-dependiente. A este respecto, ante la ausencia de MEL endógena se observó una disminución en el número de células secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$ , el cual se restableció e incluso aumentó significativamente en presencia de la hormona exógena o por la administración sistémica de MENk. El hecho de que la MENk por sí misma sea capaz de restablecer estos parámetros de la respuesta inmune aún en ausencia de la hormona, apoya la hipótesis de que los opioides actúan como mediadores del efecto inmunoestimulante de la MEL. Es decir, si la MEL induce la síntesis y la liberación de opioides a partir de las células inmunocompetentes, éstos a su vez actúan sobre dichas células y las de su vecindad (de manera autocrina y paracrina) para estimular la actividad inmune en diferentes aspectos, entre ellos, la secreción de otras citocinas como la IL-2 e IFN- $\gamma$ , que tienen un papel crucial en la generación de las clonas celulares efectoras de la respuesta inmune humoral primaria ante un antígeno. Asimismo, nuestros resultados sugieren que el efecto de la MEL y de los opioides puede estar mediado, al menos parcialmente, por sus receptores de membrana, ya que en presencia de sus respectivos antagonistas (Luzindol y Naloxona) no se restableció el número de células secretoras de las citocinas de interés. Dado que el luzindol sólo fue capaz de bloquear parcialmente el efecto de la hormona, es probable que la MEL actúe en estas células no sólo a través de sus receptores membranales sino también a través de sus receptores nucleares. A este respecto, los estudios de Calberg<sup>(30)</sup> sugieren que los receptores membranales y nucleares de la MEL pueden activarse de manera sinérgica.

De manera congruente con nuestros hallazgos, Maestroni y cols.<sup>(108)</sup> reportaron que la MEL estimula la liberación de agonistas opioides a partir de células T activadas por antígeno. Además, demostraron que el material liberado tiene actividad

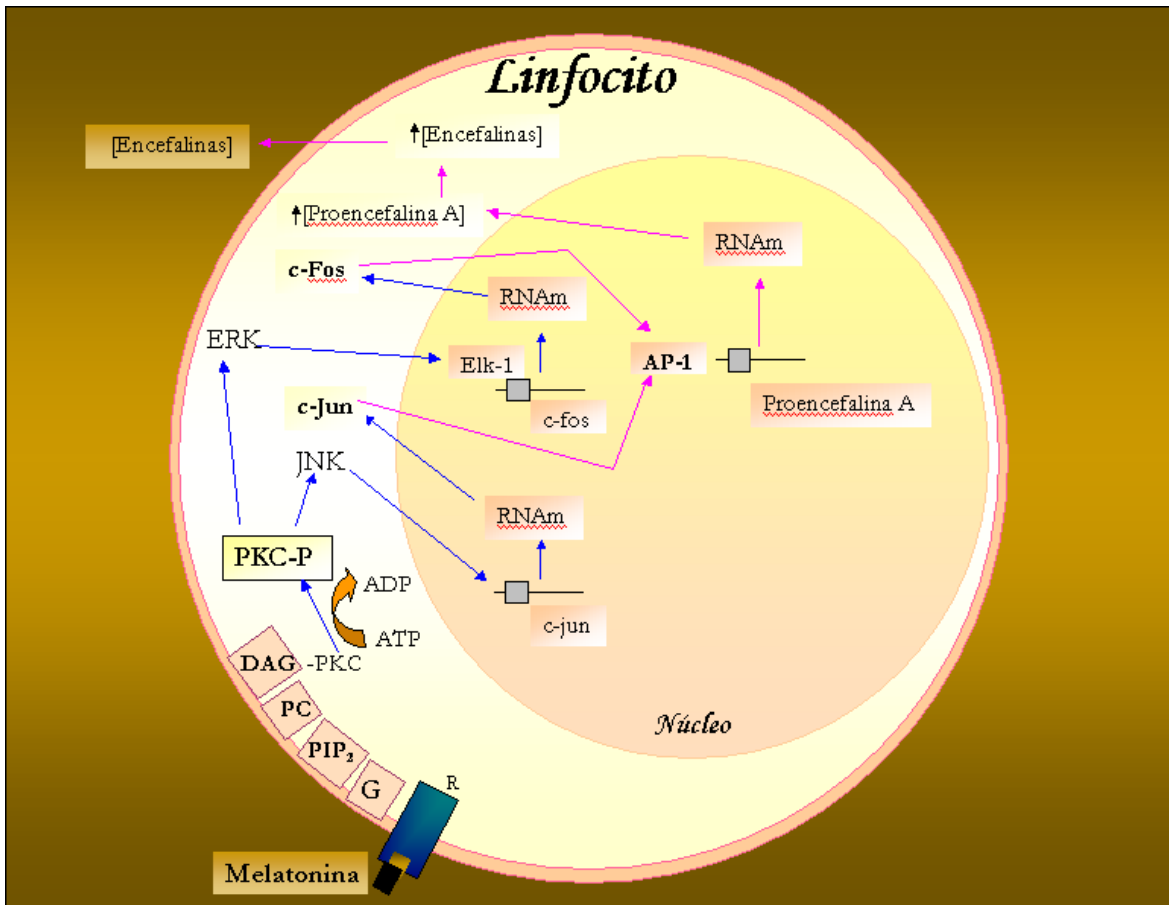
inmunoestimuladora y contrarresta los efectos del estrés agudo, en el contexto de la respuesta humoral primaria y del tamaño del timo.

Ante la perspectiva de que tanto la MEL o los opioides pueden constituir blancos de intervención farmacológica con fines terapéuticos, resulta de particular importancia el análisis bioquímico de la relación funcional MEL-opioides, para dilucidar si efectivamente la MEL regula la expresión del gen de la PEA. En este sentido, en el análisis por Western blot a partir de extractos de células mononucleares de bazo, se observó un doblete de bandas entre los marcadores de 32.5 a 39.2 kDa y una banda alrededor de los 20 kDa. La localización de estas bandas coincide con lo reportado por Mathis y Lindberg<sup>(115)</sup>, en un estudio del procesamiento postraduccional de la PEA. De acuerdo con lo reportado por estos investigadores, el doblete con un peso molecular aparente entre los 35 y 32 kDa, puede corresponder a la forma glicosilada y no glicosilada de la PEA, respectivamente. De manera similar, la banda ubicada alrededor de los 20 kDa, podría corresponder al fragmento de 18 kDa de la PEA y coincide con lo reportado por Metters y Rossier<sup>(119)</sup> y Birch y cols.<sup>(22)</sup>. Este análisis arrojó evidencias de que en las células mononucleares del bazo de los animales sometidos a la pinealectomía funcional, la PEA se encuentra disminuida, y su presencia se restablece al administrar la MEL exógena. La disminución en el contenido de la PEA puede deberse a la inhibición de su síntesis o bien al aumento en el procesamiento postraduccional que da lugar a los péptidos biológicamente activos. Sin embargo, de acuerdo con los estudios previos de nuestro grupo de trabajo<sup>(190)</sup>, el contenido tisular de los péptidos derivados de la PEA también disminuye significativamente en estas condiciones. En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia o ausencia de MEL regula la síntesis *de novo* de la PEA en el bazo de la rata. A este respecto, Wajs y cols.<sup>(199)</sup> reportaron que la administración de MEL es capaz de inducir la expresión del precursor opioide Proopiomelanocortina (POMC), en órganos linfoides como la médula ósea y los nódulos linfáticos.

El mecanismo molecular mediante el que la MEL ejerce su efecto sobre los péptidos opioides en el sistema inmune no se ha dilucidado. Sin embargo, 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>(147, 151)</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>(196)</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  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la activación de la proteína cinasa C (Protein Kinase C: PKC)<sup>(4, 18, 20, 98, 162)</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>(18)</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>(38, 128, 162)</sup> y JNK (c-Jun N-terminal kinase: JNK)<sup>(37, 92, 124)</sup>. Estos estudios se han realizado en neuronas hipotalámicas, líneas celulares provenientes de la glándula tiroides y de la glándula pituitaria, así como en plaquetas y en células de cáncer gástrico<sup>(37, 38, 92, 124, 128, 162)</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 a su vez forman un heterodímero que se denomina AP-1 (activator protein-1: AP-1)<sup>(37, 78, 124, 162)</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>(68, 85)</sup>. Se ha demostrado que el factor de transcripción AP-1 induce la expresión del gen de la PEA<sup>(53, 78, 202, 203, 204, 211)</sup> en diversas estructuras y células del sistema nervioso central. Aunado a este conjunto de evidencias, el grupo de Chan y cols.<sup>(36)</sup> ha demostrado que la estimulación de los receptores MT1 de la MEL están asociados a la activación de la JNK y la ERK. Por su parte, Urata y cols.<sup>(189)</sup> han descrito que la MEL estimula la actividad de unión al ADN de la proteína AP-1. Finalmente, Kim y cols.<sup>(78)</sup> 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. Es decir, existen evidencias en

diferentes sistemas celulares de que es posible la interacción de todos los elementos de la que podría ser una vía de señalización para la inducción de la síntesis de opioides por acción de la MEL (figura 4.1), sin embargo hasta la fecha no se han hecho estudios específicos con este fin.



**Figura 4.1** Posible vía de señalización implicada en el mecanismo molecular de acción de la melatonina sobre los péptidos opioides en las células del sistema inmune.

Otro mecanismo de acción a considerar es que la MEL actúe a través de sus receptores nucleares RZR/ROR alfa y RZR beta, que en forma de monómeros u homodímeros<sup>(201)</sup> actúan como factores de transcripción, y cuyos sitios de unión específicos han sido identificados en la región promotora de varios genes. Estos receptores se expresan tanto en el cerebro como en órganos periféricos y a ellos se han asociado efectos tales como la inmunomodulación, la proliferación celular y la diferenciación de células óseas<sup>(30)</sup>.

Los receptores RZR/ROR se unen a regiones específicas de ADN llamadas elementos de respuesta RORE (ROR response elements), que tienen una secuencia consenso hexamérica [(A/G)GGTCA] precedida por una cadena de 5 pares de bases con una secuencia rica en A/T<sup>(75)</sup>. Una T en posición -1 y una A en posición -4 (antes de la secuencia consenso), contribuyen a una unión de alta afinidad con el receptor<sup>(167)</sup>. La regulación de la transcripción a través de los receptores RZR/ROR, no sólo es mediada por la interacción con el ligando (MEL) sino también por la interacción con cofactores nucleares, que pueden actuar como coactivadores o bien como correpresores. A este respecto, se sabe que la cinasa CaMKIV (cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina IV) aumenta significativamente la activación transcripcional<sup>(75, 76)</sup>. Asimismo, se ha identificado a la proteína GRIP-1 (glucocorticoid receptor-interacting protein-1) como un coactivador del receptor ROR- $\alpha$ , en células de mamífero<sup>(9)</sup>. Aunque hasta la fecha no se han identificado elementos de respuesta RORE en el gen de la Preproencefalina A, sí se ha propuesto que la MEL podría estimular la expresión génica de las Prohormona Convertasas PC1 y PC2, responsables de llevar a cabo el procesamiento postraduccional de los precursores opioides como la PEA y la POMC<sup>(39)</sup>. Aunado a esto, se ha postulado que los receptores RZR/ROR alfa podrían ser un blanco primario en la cascada de señalización de los receptores membranales para MEL<sup>(30)</sup>. De esta manera, es factible suponer que la MEL actúe mediante un mecanismo sinérgico al inducir la síntesis de la PEA a través de sus receptores membranales y además determinar la velocidad de procesamiento postraduccional de la PEA a través de sus receptores nucleares, para generar como consecuencia, una cantidad mayor de péptidos biológicamente activos.

El conjunto de evidencias presentado hasta el momento sugiere que el organismo requiere de la MEL y de los opioides como moduladores para generar una respuesta inmune óptima. No obstante, dado que la función inmune es de importancia vital para el organismo, su fisiología es multifactorial, con múltiples mecanismos de acción y sujeta a la influencia de diferentes sistemas de regulación y modulación. Por ejemplo, todas las vías neuroendocrinas hipotalámicas participan en la modulación del sistema inmune de

---

diferente manera y en diferentes momentos de la vida. Asimismo, las hormonas, citocinas y quimiocinas producidas por los órganos linfoides regulan la actividad del sistema para poder responder adecuadamente ante la presencia de un antígeno exógeno o endógeno. Además, la respuesta inmune debe alcanzar un estado de equilibrio tal que no se produzcan reacciones exacerbadas o autoinmunes que pongan en peligro la vida. Como una perspectiva de aplicación de estas evidencias en nuestros proyectos de investigación a futuro, existen innumerables ejemplos en los que se puede contextualizar la participación de la MEL y los opioides en la fisiopatología del sistema inmune; sin embargo, ha sido de mi particular interés abordar el envejecimiento. El envejecimiento es un proceso que se caracteriza por el deterioro de diversas funciones, lo que conduce a patologías asociadas con la edad y en última instancia, a la muerte. El sistema inmune no está exento de ser afectado por la edad, y su deterioro se manifiesta como una mayor susceptibilidad a las infecciones, una mayor incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, autoinmunes y cáncer. Al decaimiento gradual de las funciones del sistema inmune que ocurre en el envejecimiento, se le ha denominado inmunosenectud<sup>(177)</sup>. A la fecha no se ha logrado dilucidar si la inmunosenectud es una consecuencia del proceso de envejecimiento o si contribuye a éste. Entre los mecanismos que subyacen al envejecimiento se han propuesto la disfunción neuroendocrina<sup>(136)</sup>, los cambios en la expresión génica en diversos sistemas del organismo<sup>(213, 214)</sup>, el aumento de los radicales libres y la consecuente oxidación y apoptosis en los tejidos<sup>(215, 216, 217)</sup>.

Dados los múltiples efectos que ejerce la MEL sobre el sistema inmune, se ha sugerido que esta hormona puede tener implicaciones importantes en el proceso de inmunosenectud. Diversos autores han reportado una menor producción de MEL e incluso la calcificación de la glándula pineal en los ancianos<sup>(86, 110)</sup> o en animales envejecidos<sup>(121)</sup>. Al considerar lo anterior y siendo la MEL una hormona ubicua con múltiples funciones en la regulación de la homeostasis del organismo, resulta factible pensar que la deficiencia de esta hormona en la edad avanzada contribuye a una desregulación de varios sistemas del organismo, entre ellos el sistema inmune. Esta



---

particularidad le confiere a la MEL el potencial terapéutico para contrarrestar algunos de los fenómenos asociados a la inmunosenectud, no sólo en el contexto fisiológico de la producción de citocinas, anticuerpos y células efectoras, sino incluso en la morfología, tamaño y peso de los órganos linfoides<sup>(101, 102, 177)</sup>. Ahora bien, si se considera la relación funcional MEL-opioides, cabe mencionar que también se ha reportado la disminución en la cantidad de péptidos opioides<sup>(26, 123, 142, 185)</sup> y de sus receptores<sup>(132, 143)</sup> en la edad avanzada. En su carácter de citocinas, la inclusión de los péptidos opioides en los esquemas terapéuticos puede ser de utilidad para revertir algunas de las condiciones características de la inmunosenectud. A este respecto, Jankovic y cols.<sup>(72)</sup> reportaron el restablecimiento de los parámetros inmunológicos humoral y celular e incluso de la morfología del bazo y el timo en ratas envejecidas, al administrar Met-Encefalina por vía sistémica.

En conjunto, se podría especular que si en el envejecimiento existe un déficit de MEL y éste a su vez puede generar una disminución en la concentración de péptidos opioides, ambos fenómenos repercutirían de manera sinérgica en los cambios fisiológicos y morfológicos característicos de la inmunosenectud, a nivel de secreción de citocinas, balance  $T_H1$ - $T_H2$ , autoinmunidad, alteraciones de la vigilancia inmunológica, mayor estrés oxidativo y apoptosis, alteraciones en la expresión génica y diferenciación celular. La investigación en este campo tiene implicaciones relevantes ya que los parámetros que definen la inmunosenectud han sido relacionados directamente con el pronóstico de vida en la edad avanzada, a través de la definición del ‘fenotipo de riesgo inmunológico’<sup>(177)</sup>. Asimismo, el conocimiento en este ámbito puede conducir al desarrollo de nuevos esquemas terapéuticos que incluyan a la MEL y a los péptidos opioides, o agonistas de sus receptores, en el tratamiento contra enfermedades infecciosas, neoplásicas y crónico-degenerativas en la edad avanzada, e incluso de manera preventiva durante la edad adulta.

## CONCLUSIONES

Los resultados más relevantes del presente trabajo son los siguientes: a) Las células de bazo de rata expuestas a un reto antigénico *in vivo*, mostraron un incremento en la secreción de Met-Encefalina, Heptapéptido, Synencefalina e IL-2 comparado con los grupos no inmunizados. b) La secreción de Heptapéptido, IL-2 e IFN- $\gamma$  disminuyó tras la pinealectomía funcional. La administración de MEL exógena revirtió este efecto, y la secreción de Met-encefalina, Synencefalina, IL-2 e IFN- $\gamma$  alcanzó valores similares e incluso mayores a los de los grupos control. Además, la administración sistémica de Met-encefalina, contrarrestó el efecto de la ausencia de MEL en el número de células secretoras de IFN- $\gamma$ . c) El número de células formadoras de anticuerpos IgM contra eritrocitos de carnero fue significativamente menor en los animales sometidos a la pinealectomía funcional, comparados con el grupo control. 6) Finalmente, en el análisis por Western blot, la cantidad de Proencefalina A en las células mononucleares del bazo de la rata disminuyó considerablemente en los animales sometidos a la luz continua con respecto a los animales control y se restableció en presencia de MEL exógena.

Tomados en conjunto, nuestros hallazgos sugieren que la relación bioquímica-funcional entre la MEL y los péptidos opioides juega un papel crucial en la inmunomodulación, en particular en la secreción de citocinas, en el contexto de la respuesta inmune primaria ante un antígeno.

**ABREVIATURAS**

BCR: Receptor de células B  
BSS: Disolución salina balanceada  
CFA: Células Formadoras de Anticuerpos  
CFS: Células Formadoras de Spots  
ELISA: Enzyme Lynked ImmunoSorbent Assay  
HE: Heptapéptido  
HIOMT: Hidroxiindol-O-metiltransferasa  
IFN: Interferón  
Ig: Inmunoglobulina  
IL: Interleucina  
Inm: Animales inmunizados con eritrocitos de carnero  
LC: Luz continua  
LPS: Lipopolisacárido  
LZ: Luzindol  
MEL: Melatonina  
ME<sub>n</sub>k: Met-Encefalina  
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad  
NA: Noradrenalina  
NAL: Naloxona  
NAT: N-Acetiltransferasa  
NK: Natural Killer  
NSQ: Núcleo supraquiasmático  
PF: Pinealectomía Funcional  
RIA: Radioinmunoensayo  
SEO: Sistema Endógeno Opiode  
SI: Sistema Inmune  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SYN: Synencefalina  
TCR: Receptor de células T  
T<sub>H</sub>: Células T cooperadoras  
TNF: Factor de necrosis tumoral

## APÉNDICE

### 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
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.4 mM	0.6 g/L
NaHPO <sub>4</sub> anhidro	13.3 mM	1.89 g/L
Rojo de fenol	0.001 %	

- Disolución 2.

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	12.6 mM	1.86 g/L
KCl	53.6 mM	4.0 g/L
NaCl	1.37 M	80.0 g/L
MgCl <sub>2</sub> anhidro	10.9 mM	1.04 g/L
MgSO <sub>4</sub> 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 750 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 en un matraz volumétrico.

#### Disolución alto potasio (BSS + K<sup>+</sup> 50 mM), pH=7.3

Se agregan 3.328 g de KCl por cada litro de BSS 1 X.

#### Disolución hemolizante (Tris/NH<sub>4</sub>Cl), pH=7.2

Se prepara a partir de dos disoluciones acuosas concentradas:

- NH<sub>4</sub>Cl 0.16 M

Pesar 8.3 g de NH<sub>4</sub>Cl por cada litro de disolución.

- Tris base 0.17 M

---

Pesar 20.6 g de Tris base y disolverlo en 800 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.65 con HCl concentrado. Llevar a un volumen total de 1 L.

Para preparar la disolución de trabajo, se mezclan 10 mL de Tris base 0.17 M pH=7.65 con 70 mL de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.16 M. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 0.1 N. Llevar a un volumen final de 100 mL con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.16 M.

### **Azul tripano 0.4%**

Azul tripano	0.4 g
NaCl	0.81 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.06 g

Disolver y llevar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

### **Disoluciones concentradas y disoluciones de trabajo para la técnica de Lowry para cuantificación espectrofotométrica de proteínas<sup>(97)</sup>.**

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

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

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

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

- Tartrato de sodio y potasio al 2 %

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

- NaOH 0.4 N

### Reactivo A (reactivo alcalino de cobre)

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 %

Mantener en agitación hasta su uso.

### 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.

Estándar para curva patrón: Albúmina sérica bovina (BSA) 1mg/mL

### **Disoluciones de trabajo para Radioinmunoensayo (RIA).**

- Disolución de Fosfatos 0.05 M pH=7.4

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2.76 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.26 g/L
NaCl	9.00 g/L
Na <sub>3</sub> N	0.20 g/L
Gelatina	1.00 g/L

La gelatina 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

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2.76 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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

El carbón activado se agrega después de haber ajustado el pH. Se agita por dos horas.

### **Sistema de disoluciones de Laemmli para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

- Disolución amortiguadora de Tris base 1.5 M pH 8.8 (para gel separador).

Tris base 45.4275 g

Agregar aproximadamente 150 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl.

Llevar a un volumen final de 250 mL.

- Disolución amortiguadora de Tris base 0.5 M pH 6.8 (para gel concentrador).

Tris base 15.1425 g

Agregar aproximadamente 150 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl.

Llevar a un volumen final de 250 mL.

- Amortiguador de corrida (concentrado 10X) Glicina 1.9 M, Tris base 0.25 M

Glicina 146 g

Tris base 30 g

Disolver en agua desionizada y llevar a un volumen final de 1 L.

- Amortiguador de corrida (disolución de trabajo 1X)

Se agregan 100 mL del concentrado 10X y 10 mL de SDS al 10% para 1 L de disolución.

- Diluyente de la muestra (10X)

Amortiguador Tris 0.5 M pH=6.8	2.5 mL
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	2 g
Agua desionizada	1 mL
Azul de bromofenol 1%	0.5 mL
□ -mercaptoetanol	3 mL
Glicerol	3.78 g

- Gel separador 15%

Amortiguador Tris 1.5 M pH=8.8	12.5 mL
Acrilamida 30%	25 mL
Bis-acrilamida 2%	10 mL
SDS 10 %	0.5 mL
H <sub>2</sub> O desionizada	2 mL.

- Gel concentrador 4%

Amortiguador Tris 0.5 M pH=6.8	12.5 mL
Acrilamida 30%	6.7 mL
Bis-acrilamida 2%	2.7 mL
SDS 10 %	0.5 mL
H <sub>2</sub> O desionizada	27.7 mL.

- Persulfato de amonio 10%

Pesar 100 mg de persulfato de amonio y disolverlos en 1 mL de agua desionizada.

- TBS 10 X : Tris base 200 mM, NaCl 50 mM, pH=7.5

Tris base 46.46 g

NaCl 5.85 g

Disolver en 1.8 L de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl. Llevar a un volumen final de 2 L.

- Amortiguador de transferencia : Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%

Tris base 6.05 g

Glicina 28.85 g

Metanol 400 mL

Disolver en 1.5 L de agua desionizada. Llevar a un volumen final de 2 L.

- Bloqueo TBS/Tween 20 : 0.25% P/V Tween 20 en TBS

Tween 20 0.25 g

Disolver y llevar a un volumen final de 100 mL con TBS 1 X.

- TTBS

Tween 20 0.553 g

Disolver y llevar a un volumen final de 1 L con TBS 1 X.

- Amido Black 10B : 0.1% amido black, 25% isopropanol, 10% acético

- Desteñidor Amido Black : 25% isopropanol, 10% acético



## TABLAS

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

Tabla de reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados<sup>(8, 137, 166)</sup>.

Péptido	% Reactividad cruzada			
	Anti-ME	Anti-LE	Anti-OC	Anti-HE
Met-( <i>o</i> )-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
$\alpha$ -endorfina	<0.01	<0.01	<0.01	-
$\beta$ -endorfina	<0.01	<0.01	<0.01	-
$\gamma$ -endorfina	<0.01	<0.01	<0.01	-

---

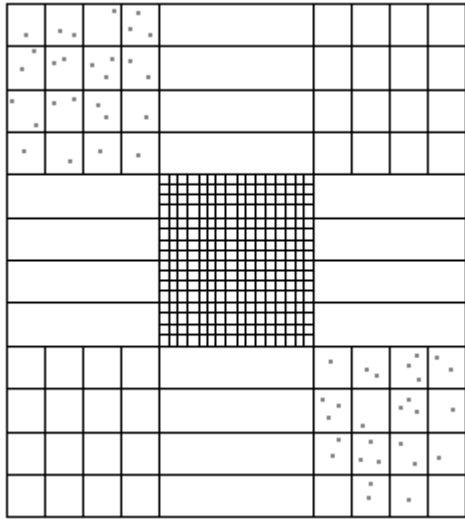
## PROCEDIMIENTOS

### 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

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

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

---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. AKIL H, OWENS C, GUTSTEIN H, TAYLOR L, CURRAN E, WATSON S. Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.* 1998, 51(1-2):127-140.
2. AKIL H., WATSON S.J., YOUNG E., LEWIS M.E., KHACHATURIAN H., WALKER J.M. Endogenous opioids: Biology and Function. *Ann Rev Neurosci.* 1984, 7:223-55.
3. ANTOLIN I, RODRÍGUEZ C, SAINZ RM, MAYO JC, URÍA H, KOTLER ML, RODRÍGUEZ-COLUNGA MJ, TOLIVIA D, MENENDEZ-PELAEZ A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1996, 10(8):882-90.
4. ANTÓN-TAY F., RAMÍREZ G., MARTÍNEZ I., BENÍTEZ-KING G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res.* 1998, 23(5):601-6.
5. ARIAS J, MELEAN E, VALERO N, PONS H, CHACIN-BONILLA L, LARREAL Y, BONILLA E. Effect of melatonin on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in mice splenocytes. *Invest Clin.* 2003, 44(1):41-50.
6. ASAI M., GUTIÉRREZ R. Neurobiología de los péptidos opioides. *Salud Mental.* 1994, 17(2): 30-41.
7. ASAI, M., MAYAGOITIA, L., GARCÍA, D., MATAMOROS-TREJO, G., VALDÉS-TOVAR, M., LEFF, P. Rat brain opioid peptides-circadian rhythm is under control of melatonin. *Neuropeptides.* Aceptado Sep 2007.
8. ASAI, M., ZUBIETA, M., MATAMOROS-TREJO, G., LINARES, G., AGUSTÍN, P. Diurnal variations of opioid peptides and Synenkephalin in vitro release in the amygdala of kindled rats. *Neuropeptides.* 1998, 32(3): 293-299.
9. ATKINS GB, HU X, GUENTHER MG, RACHEZ C, FREEDMAN LP, LAZAR MA. Coactivators for the orphan receptor RORalpha. *Mol Endocrinol.* 1999, 13(9):1550-7.
10. ATRE D, BLUMENTHAL EJ. Melatonin: immune modulation of spleen cells in young, middle-aged and senescent mice. *Mech Ageing Dev.* 1998, 103(3):255-68.
11. BARJAVEL M.J., MAMDOUH Z., RAGHBATE N., BAKOUCHE O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol.* 1998, 160(3):1191-7.
12. BARLOW-WALDEN LR, REITER RJ, ABE M, PABLOS M, MENENDEZ-PELAEZ A, CHEN LD, POEGGELER B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* 1995, 26(5):497-502.
13. BECKER-ANDRE M, WIESENBERG I, SCHAEREN-WIEMERS N, ANDRE E, MISSBACH M, SAURAT JH, CARLBERG C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates and orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem.* 1994, 269(46):28531-4.
14. BENÍTEZ-KING G, ANTÓN-TAY F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia.* 1993, 49(8):635-41.
15. BENÍTEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTÓN-TAY F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 1993, 53:201-7.

16. BENÍTEZ-KING G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006, 40(1):1-9.
17. BENÍTEZ-KING G. El papel de la melatonina como modulador de la organización del citoesqueleto. *Salud Mental.* 2000, 23(1) : 18-22.
18. BENÍTEZ-KING G., HERNÁNDEZ M.E., TOVAR R., RAMÍREZ G. Melatonin activates PKC- $\alpha$  but not PKC- $\epsilon$  in N1E-115 cells. *Neurochem Int.* 2001, 39(2):95-102.
19. BENÍTEZ-KING G. Melatonina: del conocimiento básico a la aplicación clínica en psiquiatría. *Salud Mental.* 1999, 22 : 57-61.
20. BENÍTEZ-KING G. PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. *J Pineal Research.* 2000, 29(1):8-14.
21. BINKLEY S. A timekeeping enzyme in the pineal gland. *Sci Am.* 1979, 240(4): 50-5.
22. BIRCH NP, DAVIES AD, CHRISTIE DL. Identification of a 27-kDa enkephalin-containing protein associated with bovine adrenal chromaffin granule membranes by immunoblotting. *FEBS Lett.* 1986, 197:173-178.
23. BLASK DE, DAUCHY RT, SAUER LA. Putting cancer to sleep at night : the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine.* 2005, 27(2):179-88.
24. BLASK DE, SAUER LA, DAUCHY RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 2002, 2(2):113-32.
25. BLOM B., LIGTHART S.J., SCHOTTE R., SPITS H. Developmental origin of pre-DC2. *Hum Immunol.* 2002, 63(12):1072-1080.
26. BONGIORNO L, MARZANO M, MARINI M, RODA LG, URBANI A, SPAGNOLI G. Age increases leucine enkephalin hydrolysis in human plasma. *Gerontology.* 1999, 45(1):10-6.
27. BOUTIN JA, AUDINOT V, FERRY G, DELAGRANGE P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci.* 2005, 26(8):412-9.
28. BUSCEMI N, VANDERMEER B, PANDYA R, HOOTON N, TJOSVOLD L, HARTLING L, BAKER G, VOHRA S, KLASSEN T. Melatonin for treatment of sleep disorders. *Evid Rep Technol Assess (Summ).* 2004, 108:1-7.
29. CABOT PJ, CARTER L, SCHAFER M, STEIN C. Methionine-enkephalin and Dynorphin A release from immune cells and control of inflammatory pain. *Pain.* 2001, 93(3):207-12.
30. CALBERG C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* 2000, 917:387-96.
31. CANIATO R, FILIPPINI R, PIOVAN A, PURICELLI L, BORSARINI A, CAPPELLETTI EM. Melatonin in plants. *Adv Exp Med Biol.* 2003, 527:593-7.
32. CARDINALI D.P. Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocrine Reviews.* 1981, 2(3):327-346.

33. CARRILLO-VICO A, CALVO JR, ABREU P, LARDONE PJ, GARCÍA-MAURINO S, REITER RJ, GUERRERO JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004, 18(3):537-9.
34. CARRILLO-VICO A, GARCÍA-PERGAÑEDA A, NAJI L, CALVO JR, ROMERO MP, GUERRERO JM. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci.* 2003, 60(10):2272-8.
35. CARRILLO-VICO A, GUERRERO JM, LARDONE PJ, REITER RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine.* 2005, 27(2):189-200.
36. 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.* 2002, 14(3): 249-57.
37. 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.* 2002, 8(6):1014-8.
38. 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.* 2002, 83(6): 1412-22.
39. CIESLA W. Can high maternal melatonin concentrations be responsible for inducing fetal pathologies, and can melatonin participate in immunohormonal homeostasis by determining prohormone convertase activity? - Hypothesis and facts. *Med Hypotheses.* 1998, 51(4):269-80.
40. CONSTANTINESCU CS, HILLIARD B, VENTURA E, ROSTAMI A. Luzindole, a melatonin receptor antagonist, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pathobiology.* 1997, 65(4):190-4.
41. CONTI A, CONCONI S, HERTENS E, SKWARLO-SONTA K, MARKOWSKA M, MAESTRONI JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 2000, 28:193-202.
42. COSTA EJ, LÓPEZ RH, LAMY-FREUND MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res.* 1995, 18:123-126.
43. CUNNINGHAM A.J., SZENBERG A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology.* 1968, 14 (4):599-600.
44. CURRIER N.L., SUN L.Z., MILLER S.C. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J Neuroimmunol.* 2000, 104(2):101-8.
45. DAS KP, MCMILLIAN MK, BING G, HONG JS. Modulatory effects of [Met]5-enkephalin on interleukin-1 beta secretion from microglia in mixed brain cell cultures. *J Neuroimmunol.* 1995, 62(1):9-17.
46. DIMITRIJEVIC M, STANOJEVIC S, KOVACEVIC-JOVANOVIC V, MILETIC T, VUJIC-REDZIC V, RADULOVIC J. Modulation of humoral responses in the rat by centrally applied Met-Enk and opioid receptor antagonists: functional interactions of brain OP1, OP2 and OP3 receptors. *Immunopharmacology.* 2000, 49(3):255-62.
47. DJERIDANE Y, TOUITOU Y. Melatonin synthesis in the rat Harderian gland: age- and time-related effects. *Exp Eye Res.* 2001, 72(4):487-92.
48. DJERIDANE Y, VIVIEN-ROELS B, SIMONNEAUX V, MIGUEZ JM, PEVET P. Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study. *J Pineal Res.* 1998, 25(1):54-64.

49. 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 Regul Integ Comp Physiol.* 2001, 280(5): 1476-1482.
50. DUBOCOVICH ML, MARKOWSKA M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 2005, 27(2):101-10.
51. DUBOCOVICH ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 1988, 2(12):2765-73.
52. FINOCCHIARO LM, NAHMOD VE, LEUNAY JM. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J.* 1991, 280(Pt 3):727-31.
53. 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 Neuroviro.* 1997, 3(1):16-27.
54. GARCÍA MARTÍNEZ E., La glándula pineal: un transductor fotoneuroendocrino. Material impreso del Precongreso Actualización en Fisiología, 1997.
55. GARCÍA-MAURIÑO S., GONZÁLEZ-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.* 1998, 92(1-2):76-84.
56. GARCÍA-MAURIÑO S., GONZÁLEZ-HABA M.G., CALVO J.R., RAFII-EL-IDRISSI M., SÁNCHEZ-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.* 1997, 159 (2):574-81.
57. GARCÍA-MAURIÑO 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.* 2000, 29(3):129-37.
58. GARCÍA-MAURIÑO S., POZO D., CARRILLO-VICO A., CALVO J.R., GUERRERO J.M. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 1999, 65(20):2143-50.
59. GARCÍA-PERGAÑEDA A, POZO D, GUERRERO JM, CALVO JR. Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Immunol.* 1997, 159(8):3774-81.
60. GREVEL J, YU V, SADEE W. Characterization of a labile naloxone binding site ( $\lambda$  site) in rat brain. *J Neurochem.* 1985, 44(5):1647-56.
61. GUPTA BB, SPESSERT R, VOLLRATH L. Molecular components and mechanism of adrenergic signal transduction in mammalian pineal gland: regulation of melatonin synthesis. *Indian J Exp Biol.* 2005, 43(2):115-49.
62. HARDELAND R, PANDI-PERUMAL SR, CARDINALI DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006, 38(3):313-6.
63. 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).
64. HARDELAND R. New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int J Biometeorol.* 1997, 41:47-57.

65. 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.* 1997, 159(11):5431-40.
66. 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.* 1996, 17(1):75-81.
67. 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.* 1975, 255:577.
68. ILES K.E., FORMAN H.J. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res.* 2002, 26(1-3):95-105.
69. ITOH MT, ISHIZUKA B, KUDO Y, FUSAMA S, AMEMIYA A, SUMI Y. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 1997, 136(1):7-13.
70. ITOH MT, ISHIZUKA B, KURIBAYASHI Y, AMEMIYA A, SUMI Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod.* 1999, 5(5):402-8.
71. IUVONE PM, BROWN AD, HAQUE R, WELLER J, ZAWILSKA JB, CHAURASIA SS, MA M, KLEIN DC. Retinal melatonin production: role of proteasomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamine N-acetyltransferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002, 43:564-572.
72. JANKOVIC BD, MARIC D. Enkephalin-induced stimulation of humoral and cellular immune reactions in aged rats. *Ann NY Acad Sci.* 1991, 621:135-147.
73. JANKOVIC BD, MARIC D. Enkephalins and immunity I: In vivo suppression and potentiation of humoral immune response. *Ann N Y Acad Sci.* 1987, 496:115-25.
74. JANKOVIC BD, VELJIC J, PESIC G, MARIC D. Enkephalinase-inhibitors modulate immune responses. *Int J Neurosci.* 1991, 59(1-3):45-51.
75. JETTEN AM, KUREBAYASHI S, UEDA E. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001, 69:205-47.
76. KANE CD, MEANS AR. Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *EMBO J.* 2000, 19(4):691-701.
77. KAVELAARS A., HEIJNEN C.J. Expression of preproenkephalin mRNA and production and secretion of enkephalins by human thymocytes. *Ann NY Acad Sci.* 2000, 917 : 778-783.
78. 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.* 2001, 11(2):144-50.
79. KOTLER M, RODRÍGUEZ C, SAINZ RM, ANTOLIN I, MENENDEZ-PELAEZ A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res.* 1998, 24(2):83-9
80. KOWALSKI J, GABRYEL B, LABUZEK K, HERMAN ZS. Methionine-enkephalin and leucine-enkephalin increase interleukin-1 beta release in mixed glia cultures. *Neuropeptides.* 2002, 36(6):401-6



81. KOWALSKI J, MAKOWIECKA K, BELOWSKI D, HERMAN ZS. Augmenting effect of methionine-enkephalin on interleukin-6 production by cytokine-stimulated murine macrophages. *Neuropeptides*. 2000, 34(3-4):187-92.
82. KOWALSKI J. Augmenting effect of opioids on nitrite production by stimulated murine macrophages. *Neuropeptides*. 1998, 32(3):287-91.
83. KOWALSKI J. Effect of enkephalins and endorphins on cytotoxic activity of natural killer cells and macrophages/monocytes in mice. *Eur J Pharmacol*. 1997, 326(2-3):251-5.
84. KOWALSKI J. Immunomodulatory action of class mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in mice. *Neuropeptides*. 1998, 32(4):301-6.
85. 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*. 2002, 21(5): 719-30.
86. KUNZ D, SCHMITZ S, MAHLBERG R, MOHR A, STOTER C, WOLF KJ, HERRMANN WM. A new concept for melatonin deficit: on pineal calcification and melatonin excretion. *Neuropsychopharmacology*. 1999, 21(6):765-72.
87. KVETNOV IM, INGEL IE, KVETNAIA TV, MALINOVSKAYA NK, RAPOPORT SI, RAIKHLIN NT, TROFIMOV AV, YUZHAKOV VV. Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002, 23(2):121-32.
88. 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*. 2001, 47(5): 54-62.
89. LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227:680-5.
90. LEE PP, PANG SF. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol Signals*. 1993, 2:181-193.
91. 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*. 1958, 80 : 2587.
92. 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*. 1998, 12(6): 815-24.
93. LI PF, HAO YS, ZHANG FX, LIU XH, LIU SL, LI G. Signaling pathway involved in methionine enkephalin-promoted survival of lymphocytes infected by simian immunodeficiency virus in the early stage in vitro. *Int Immunopharmacol*. 2004, 4(1):79-90.
94. LISTON D. R., VANDERHAEGHEN J. J., ROSSIER J. Presence in brain of synenkephalin, a proenkephalin-immunoreactive protein which does not contain enkephalin. *Nature*. 1983, 302(3):62-65.
95. LIU XH, HUANG DA, YANG FY, HAO YS, DU GG, LI PF, LI G. A new cytokine: the possible effect pathway of methionine-enkephalin. *World J Gastroenterol*. 2003, 9(1):169-173.

96. LÓPEZ-GONZÁLEZ MA, MARTIN-CACAO A, CALVO JR, REITER RJ, OSUNA C, GUERRERO JM. Specific binding of 2-[125I]-melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J Neuroimmunol* 1993, 45(1-2):121-6.
97. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193:265-275.
98. 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.* 2001, 58(14): 2129-35.
99. MAESTRONI G.J., CONTI A. Immuno-derived opioids as mediators of the immuno-enhancing and anti-stress action of melatonin. *Acta Neurol.* 1991, 13 (4):356-60.
100. 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.* 1994, 54 (17): 4740-3.
101. 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.* 1987, 68: 384-391.
102. 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.* 1988, 63 (3): 465-9.
103. MAESTRONI G.J., CONTI A., PIERPAOLI W. The pineal gland and the circadian, opiate, immunoregulatory role of melatonin. *Ann NY Acad Sci.* 1987, 496:67-77.
104. 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.* 1994, 54(9):2429-32.
105. MAESTRONI G.J. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol.* 1998, 43(3):186-92.
106. MAESTRONI G.J. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res.* 1995, 18(2):84-89.
107. MAESTRONI GJ, CARDINALI DP, ESQUIFINO AI, PANDI-PERUMAL SR. Does melatonin play a disease-promoting role in rheumatoid arthritis? *J Neuroimmunol.* 2005, 158(1-2):106-11.
108. MAESTRONI GJ, CONTI A. The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4+, Thy-1+ cells to release opiate agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J Neuroimmunol.* 1990, 28(2):167-76.
109. MAESTRONI GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001, 10(3):467-76
110. MAGRI F, SARRA S, CINCHETTI W, GUAZZONI V, FIORAVANTI M, CRAVELLO L, FERRARI E. Qualitative and quantitative changes of melatonin levels in physiological and pathological aging and in centenarians. *J Pineal Res.* 2004, 36(4):256-61.
111. MARIC D, JANKOVIC BD. Enkephalins and immunity II: In vivo modulation of cell mediated immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 1987, 496:126-36.

112. MARKOWSKA M, MROZKOWIAK A, SKWARLO-SONTA K. Influence of melatonin on chicken lymphocytes in vitro: involvement of membrane receptors. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002, 23 Suppl 1:67-72.
113. MARKS, N., SACHS, L., STERN, F. Conversion of Met-enkephalin-Arg6-Phe7 by a purified brain carboxypeptidase (cathepsin A). *Peptides.* 1981, 2 (2), 159-164.
114. MAROTTI T, BALOG T, MAZURAN R, ROCIC B. The role of cytokines in Met-enkephalin-modulated nitric oxide release. *Neuropeptides.* 1998, 32(1):57-62.
115. MATHIS JP, LINDBERG I. Posttranslational processing of Proenkephalin in AtT-20 cells: evidence for cleavage at a Lys-Lys site. *Endocrinology.* 1992, 131(5):2287-2296.
116. MAYO JC, SAINZ RM, TAN DX, ANTOLIN I, RODRÍGUEZ C, REITER RJ. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine.* 2005, 27(2):169-78.
117. MAZUMDER S., NATH I., DHAR M.M. Immunomodulation of human T cell responses with receptor selective enkephalins. *Immunol Lett.* 1993, 35(1):33-8.
118. MEDIRATTA PK, DAS N, GUPTA VS, SEN P. Modulation of humoral immune responses by endogenous opioids. *J Allergy Clin Immunol.* 1988, 81(1):27-32.
119. METTERS KM, ROSSIER J. Affinity purification of synenkephalin-containing peptides, including a novel 23.3-kilodalton species. *J Neurochem.* 1987, 49:721-728.
120. MEUNIER JC. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 1997, 340(1):1-15.
121. MIGUEZ JM, RECIO J, SANCHEZ-BARCELO E, ALDEGUNDE M. Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines, and catecholamines in the pineal gland: a comparative study in rat and Syrian hamster. *J Pineal Res.* 1998, 25(2):106-15.
122. MILLER SC, PANDI-PERUMAL SR, ESQUIFINO AI, CARDINALI DP, MAESTRONI GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol.* 2006, 87(2):81-7.
123. MISSALE C, GOVONI S, CROCE L, BOSIO A, SPANO PF, TRABUCCHI M. Changes of beta-endorphin and Met-enkephalin content in the hypothalamus-pituitary axis induced by aging. *J Neurochem.* 1983, 40(1):20-4.
124. 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.* 2001, 20(8):989-96.
125. 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.* 1996, 65(1):21-30.
126. MORREY K.M., McLACHLAN J.A., SERKIN C.D., BAKOUCHE O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol.* 1994, 153(6):2671-80.
127. MUNDEY K, BENLOUCIF S, HARSANYI K, DUBOCOVICH ML, SEE PC. Phase dependent treatment of delayed sleep phase syndrome with melatonin. *Sleep.* 2005, 28(10):1214-6.

128. 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.* 2002, 531(3):475-82.
129. NAJI L, CARRILLO-VICO A, GUERRERO JM, CALVO JR. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci.* 2004, 74(18):2227-36.
130. NGUYEN K., MILLER B.C. CD28 costimulation induces delta opioid receptor expression during anti-CD3 activation of T cells. *J Immunol.* 2002, 168(9):4440-5.
131. NOTHACKER H.P., REINSCHIED R.K., MANSOUR A., HENNINGSSEN R.A., ARDATI A., MONSMA F.J. Jr, WATSON S.J., CIVELLI O. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci.* 1996, 93:8677-8682.
132. OGAWA N. Neuropeptides and their receptors in aged-rat brain. *Acta Med Okayama.* 1985, 39(4):315-9.
133. OKA T. Enkephalin receptor in the rabbit ileum. *Br J Pharmacol.* 1980, 68(2):193-5.
134. OKATANI Y, WAKATSUKI A, KANEDA C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal brain. *J Pineal Res.* 2000, 28(2):89-96.
135. OLSON G., OLSON R., KASTIN J. Endogenous opiates: 1988 Peptides. 1989, 10:1253-1280.
136. REHMAN HU, MASSON EA. Neuroendocrinology of ageing. *Age and Ageing.* 2001, 30:279-287.
137. PADRÓS, M.R., SARAVIA, F., VINDROLA, O. Antibodies against the amino-terminal portion of pro-enkephalin inhibits DNA synthesis in human peripheral mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.* 1995, 61:79-83.
138. PADRÓS 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.* 1989, 45(19):1805-1811.
139. PARK HT, BAEK SY, KIM BS, KIM JB, KIM JJ. Developmental expression of 'RZR beta, a putative nuclear- melatonin receptor' mRNA in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett.* 1996, 217(1):17-20.
140. PARK HT, KIM YJ, YOON S, KIM JB, KIM JJ. Distributional characteristics of the mRNA for retinoid Z receptor beta (RZR beta), a putative nuclear melatonin receptor, in the rat brain and spinal cord. *Brain Res.* 1997, 747(2):332-7.
141. PERT C, SNYDER S. Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science.* 1973, 179:1011-14.
142. PETKOV VD, PETKOV VV, STANCHEVA SL. Age-related changes in brain neurotransmission. *Gerontology.* 1988, 34(1-2):14-21.
143. PETKOV VV, PETKOV VD, GRAHOVSKA T, KONSTANTINOVA E. Enkephalin receptor changes in rat brain during aging. *Gen Pharmacol.* 1984, 15(6):491-5.
144. PINTO LR Jr, SEABRA M de L, TUFIK S. Different criteria of sleep latency and the effect of melatonin on sleep consolidation. *Sleep.* 2004, 27(6):1089-92.

145. POEGGELER B, THUERMAN S, DOSE A, SCHOENKE M, BURKHARDT S, HARDELAND R. Melatonin's unique radical scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res.* 2002, 33(1):20-30.
146. POZO D, GARCÍA-MAURIÑO S, GUERRERO JM, CALVO JR. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res.* 2004, 37(1):48-54.
147. 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 Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J.* 1997, 11(6): 466-73.
148. 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.* 1992, 48(2) : 491-500.
149. RADULOVIC J, DIMITRIJEVIC M, LABAN O, STANOJEVIC S, VASILJEVIC T, KOVACEVIC-JOVANOVIC V, MARKOVIC BM. Effect of Met-enkephalin and opioid antagonists on rat macrophages. *Peptides.* 1995, 16(7):1209-13.
150. 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.* 1996, 20(1):33-8.
151. RAFII-EL-IDRISSI M., CALVO J.R., HARMOUCH A., GARCÍA-MAURIÑO S., GUERRERO J.M. Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. *J Neuroimmunol.* 1998, 86(2):190-7.
152. 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.* 1992, 51(2):293-6.
153. REINSCHIED R.K., NOTHACKER H.P., BOURSON A., ARDATI A., HENNINGSEN R.A., BUNZOW J.R., GRANDY D.K., LANGEN H., MONSMA F.J. Jr, CIVELLI O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science.* 1995, 270 (5237): 792-4.
154. 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.* 1999, 890:471-85.
155. 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.* 1993, 15:103-115.
156. REITER R.J., The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 1993, 49: 654-664.
157. REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC, QI W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys.* 2001, 34(2):237-56.
158. RITTNER HL, MACHELSKA H, STEIN C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J Leukoc Biol.* 2005, 78(6):1215-22.
159. ROIT I.M., BROSTOFF J., MALE D.K., *Inmunología*; 3a. edición; Ediciones Científicas y Técnicas S.A.; España, Capítulos 2 y 3. (1994).

160. ROSEN H., BEHAR O., ABRAMSKY O., OVADIA H. Regulated expression of proenkephalin A in normal lymphocytes. *J Immunol.* 1989, 143 : 3703-3707.
161. 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.* 1995, 16:322-361.
162. 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.* 2002, 277(1):251-258.
163. RUFO-CAMPOS M. Melatonina y epilepsia. *Rev Neurol.* 2002, 35(Supl 1):S51-S58.
164. SANDYK R, AWERBUCH GI. Relationship of nocturnal melatonin levels to duration and course of multiple sclerosis. *Int J Neurosci.* 1994, 75(3-4):229-37.
165. SARAVIA, F., ASE, A., ALOYZ, R., KLEID, M.C., RODRÍGUEZ-VIDA, 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.* 1993, 132 (4): 1431-1437.
166. SARAVIA, F., PADRÓS, M.R., ASE, A., ALOYZ, R., DURAN, S., VINDROLA, O. Differential response to a stress stimulus of Proenkephalin peptide content in immune cells of naive and chronically stressed rats. *Neuropeptides.* 1998, 32: 351-359.
167. SCHRÄDER M, DANIELSSON C, WIESENBERG I, CALBERG C. Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. *J Biol Chem.* 1996, 271(33):19732-19736.
168. SCHULZ R, WUSTER M, HERZ A. Pharmacological characterization of the epsilon-opiate receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981, 216(3):604-6.
169. 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.* 2000, 917:764-70.
170. 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.* 2001, 167(2):1097-102.
171. 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.* 1998, 840:420-4.
172. SIMON EJ, HILLER JM, EDELMAN I. Stereospecific binding of the potent narcotic <sup>3</sup>H-etorphine to rat brain homogenates. *Proc Natl Acad Sci.* 1973, 70:1947-49.
173. 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.* 1999, 6(5):355-60.
174. SKWARLO-SONTA K, MAJEWSKI P, MARKOWSKA M, OBLAP R, OLSZANSKA B. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003, 81(4):342-9.
175. SMIRNOV AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Moscow).* 2001, 66(1):19-26.
176. SOFIC E, RIMPAPA Z, KUNDUROVIC Z, SAPCANIN A, TAHIROVIC I, RUSTEMBEGOVIC A, CAO G. Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. *J Neural Transm.* 2005, 112(3):349-58.

177. SRINIVASAN V, MAESTRONI GJM, CARDINALI DP, ESQUIFINO AI, PANDI-PERUMAL SR, MILLER SC. Melatonin, immune function and aging. *Immunity & Ageing*. 2005, 2:17.
178. SRINIVASAN V, PANDI-PERUMAL SR, MAESTRONI GJ, ESQUIFINO AI, HARDELAND R, CARDINALI DP. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res*. 2005, 7(4):293-318.
179. STEFULJ J, HORTNER M, GHOSH M, SCHAUENSTEIN K, RINNER I, WOLFLER A, SEMMLER J, LIEBMANN PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*. 2001, 30(4):243-7.
180. STEINER D.F. The protein convertases. *Curr Op Chem Biol*. 1998, 2:31-39.
181. 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*. 1995, 270(13):7037-40.
182. STITES D.P., TERR A.I., PARSLow T.G., *Inmunología básica y clínica; 9a. edición; Editorial El Manual Moderno; México (1998).*
183. SULOWSKA Z, MAJEWSKA E, KRAWCZYK K, KLINK M, TCHORZEWSKI H. Influence of opioid peptides on human neutrophil apoptosis and activation in vitro. *Mediators Inflamm*. 2002, 11(4):245-50.
184. TAN DX, REITER RJ, MANCHESTER LC, YAN MT, EL-SAWI M, SAINZ RM, MAYO JC, KOHEN R, ALLEGRA M, HARDELAND R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2002, 2(2):181-97.
185. TANG F, TANG J, CHOU J, COSTA E. Age-related and diurnal changes in Met5-Enk-Arg6-Phe7 and Met5-enkephalin contents of pituitary and rat brain structures. *Life Sci*. 1984, 35(9):1005-14.
186. TERENIUS L, WAHLSTROM A. Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta Physiol Scand*. 1975, 94(1):74-81.
187. TERENIUS L. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fractions from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1973, 33:377-84.
188. TIJMES M, PEDRAZA R, VALLADARES L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*. 1996, 61(2):65-8.
189. URATA Y., HONMA S., GOTO S., TODOROKI S., IIDA 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*. 1999, 27(7-8):838-47.
190. VALDÉS-TOVAR M, ASAI M, MATAMOROS-TREJO G. Efecto de la melatonina sobre la concentración de los péptidos opioides en el sistema inmune de la rata. *Salud Mental*. 2003, 26(3):46-56.
191. VANECEK J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Reviews*. 1998, 78: 687-721.
192. VIGANO D, LISSONI P, ROVELLI F, ROSELLI MG, MALUGANI F, GAVAZZENI V, CONTI A, MAESTRONI G. A study of light/dark rhythm of melatonin in relation to cortisol and prolactin secretion in schizophrenia. *Neuroendocrinol Lett*. 2001, 22(2):137-41.

193. VIJAYALAXMI, THOMAS CR Jr, REITER RJ, HERMAN TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol.* 2002, 20(10):2575-601.
194. VINDROLA O., PADRÓS M.R., BAUTISTA D., Opioides endógenos en la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. Material impreso del precongreso: Actualización en Fisiología. (1997).
195. 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.* 1990, 86 : 531-537.
196. VON GALL C., STEHLE J.H., WEAVER D.R. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002, 309(1):151-62.
197. VUJIC V, STANOJEVIC S, DIMITRIJEVIC M. Methionine-enkephalin stimulates hydrogen peroxide and nitric oxide production in rat peritoneal macrophages: interaction of mu, delta and kappa opioid receptors. *Neuroimmunomodulation.* 2004, 11(6):392-403.
198. VUJIC-REDZIC V, DIMITRIJEVIC M, STANOJEVIC S, KOVACEVIC-JOVANOVIC V, MILETIC T, RADULOVIC J. Peripheral effects of methionine-enkephalin on inflammatory reactions and behavior in the rat. *Neuroimmunomodulation.* 2000, 8(2):70-7.
199. WAJS E, KUTOH E, GUPTA D. Melatonin affects proopiomelanocortin gene expression in the immune organs of the rat. *Eur J Endocrinol.* 1995, 133: 754-60.
200. WIESENBERG I, MISSBACH M, KAHLEN JP, SCHRADER M, CALBERG C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23(3):327-33.
201. WIESENBERG I, MISSBACH M, CALBERG C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci.* 1998, 12(2-3):143-50.
202. 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.* 2000, 76(2):396-406.
203. 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.* 2000, 10(3):236-43.
204. 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.* 1998, 54(2):288-97.
205. WU YH, SWAAB DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res.* 2005, 38(3):145-52.
206. WURTMAN R.J. The effects of light on the human body. *Sci Am.* 1975, 233(1):68-77.
207. YANG SX, LI XY. Enhancement of interleukin-1 production in mouse peritoneal macrophages by methionine-enkephalin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1989, 10(3):266-70.
208. YANG SX, LI XY. Influence of methionine-enkephalin on interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1992, 13(2):131-6.



- 
209. YOUNG M.W., The tick-tock of the biological clock. *Sci Am.* 2000, 282(3):46-53.
210. ZAGON IS, GOODMAN SR, McLAUGHLIN PJ. Characterization of zeta(zeta): a new opioid receptor involved in growth. *Brain Res.* 1989, 482(2):297-305.
211. 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.* 1998, 54(2):243-51.
212. ZURAWSKI G, BENEDIK M, KAMB BJ, ABRAMS JS, ZURAWSKI SM, LEE FD. Activation of mouse T-helper cells induces abundant preproenkephalin mRNA synthesis. *Science.* 1986, 232(4751):772-5.
213. ANISIMOV VN, POPOVICH IG, ZABEZHINSKI MA, ANISIMOV SV, VESNUSHKIN GM, VINOGRADOVA IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta.* 2006, 1757(5-6):573-89.
214. DeVEALE B, BRUMMEL T, SEROUDE L. Immunity and aging: the enemy within?. *Aging Cell.* 2004, 3(4):195-208.
215. KOWALD A. The mitochondrial theory of aging. *Biol Signals Recept.* 2001, 10(3-4):162-75.
216. KUJOTH GC, HIONA A, PUGH TD, SOMEYA S, PANZER K, WOHLGEMUTH SE, HOFER T, SEO AY, SULLIVAN R, JOBLING WA, MORROW JD, VAN REMMEN H, SEDIVY JM, YAMASOBA T, TANOKURA M, WEINDRUCH R, LEEUWENBURGH C, PROLLA TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science.* 2005, 309(5733):481-4.
217. MIGLIACCIO E, GIORGIO M, PELICCI PG. Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. 2006, 8(3-4):600-8.