

11281

10
Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA SECRECION DE LA GLANDULA
DE HARDER COMO REGULADOR DE LA
FUNCION DE LA GLANDULA PINEAL DE
LA RATA JOVEN *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A:

M. EN C. GENARO GABRIEL ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EN C. ALFREDO FERIA VELASCO

MEXICO, D. F.

1999

273658

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina.

Doctorado en Ciencias Biomédicas (Morfología).

Alumno: M. en C. Genaro Gabriel Ortíz.

Director de Tesis: Dr. en C. Alfredo Feria Velasco.

A MI ESPOSA:

Irma E. Velázquez Brizuela

Creo en tí por tu paciencia y comprensión,
creo en tí por tu cariño para mí,
creo en tí por mi cariño para ti,
porque sin tí yo no estaría aquí.

A MIS HIJOS:

Irma Gabriela y Genaro Ernesto
mis grandes amores.

A MI MADRE Y HERMANOS:

Siempre estaré con ustedes.

y vienen a mi mente aquellos que me alentaron.....

Al Dr.en C. Alfredo Feria Velasco.

Director de tesis, maestro, guía y amigo.

Pienso que tus enseñanzas perdurarán de generación a generación.

To Dr. Russel J. Reiter.

Thanks for your advice, support and friendship

A la Dra. Margarita V. González del Pliego y al Dr. Alfonso Cárabez Trejo.

Gracias por sus consejos e indicaciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de Mexico.

Que me dió la oportunidad de ser uno más de sus estudiantes.

A mis amigos y maestros Españoles

Que me enseñaron nuevas metodologías que fueron determinantes en esta tesis: Juan, Darío, Joaquín, MaríaTeresa y Marta.

Sólo el conocimiento de los hechos es fértil; que la forma fundamental para la certidumbre es proporcionada por las ciencias experimentales; que la mente, tanto en filosofía como en ciencia evita el mero verbalismo y el error, en la condición de adherirse sin cesar a la experiencia y renunciar a todo lo que se da *a priori*; que, por último, el dominio "de las cosas en sí mismas" es inaccesible y que nuestro pensamiento puede alcanzar sólo las relaciones y las leyes.

A. Compte.

Si non esses falli omnino nos posses.

Genaro Gabriel Ortíz. 1999.

**EFECTO DE LA SECRECION DE LA GLANDULA DE HARDER
COMO REGULADOR DE LA FUNCION DE LA GLANDULA PINEAL
DE LA RATA JOVEN *in vitro*.**

**EFFECTO DE LA SECRECION DE LA GLANDULA DE HARDER COMO REGULADOR
DE LA FUNCION DE LA GLANDULA PINEAL DE LA RATA JOVEN. *In vitro.***

Presenta: M en C Genaro Gabriel Ortiz.

Director de Tesis: Dr. en C. Alfredo Feria Velasco

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F.; y el Department of Cellular and Structural Biology. The University of Texas, Health Science Center at San Antonio. San Antonio Texas. USA.

INDICE

1. RESUMEN

1.1 RESUMEN EN INGLES

2. INTRODUCCION

2.1. LA GLANDULA PINEAL

2.1.1 ANATOMIA

2.1.2 COMPOSICION BIOQUIMICA

2.1.3 FISIOLOGIA

2.2. LA GLANDULA DE HARDER

2.2.1 EVOLUCION DE LA GLANDULA DE HARDER

2.2.2 MORFOLOGIA DE LA GLANDULA DE HARDER

2.2.3 PROCESO DE MADURACION DE LAS CELULAS ACINARES

2.2.3.1 CELULAS TIPO I

2.2.3.2 CELULAS TIPO II

2.2.3.3 FORMAS TRANSICIONALES

2.2.3.4 CELULAS TIPO III y IV

2.2.3.5 DESARROLLO DE LAS VESICULAS

2.2.4 CELULAS MIOEPITELIALES

2.2.5 PIGMENTOS DE LA GLANDULA DE HARDER

2.2.5.1 HARDEROPORFIRINAS

2.2.5.2 PROPIEDADES QUIMICAS DE LAS PORFIRINAS

2.2.5.3 PROPIEDADES FISICAS DE LAS PORFIRINAS

2.2.5.4 BIOQUIMICA DEL PIGMENTO

2.2.6 DIMORFISMO Y REGULACION ENDOCRINA DE LA GLANDULA DE HARDER

2.2.6.1 CELULAS DEL MACHO

2.2.6.2 CELULAS DE LA HEMBRA

2.2.6.3 ASPECTOS FISIOLÓGICOS

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
4. HIPOTESIS
5. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES
6. MATERIAL Y METODOS
 - 6.1 OBTENCION DE EXTRACTOS DE GLANDULA DE HARDER
 - 6.2 CUANTIFICACION DE NORADRENALINA EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y ORGANICOS DE LA GLANDULA DE HARDER
 - 6.3 CUANTIFICACION DE MELATONINA
 - 6.4 ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA
 - 6.5 ANALISIS ESTADISTICO
7. RESULTADOS
8. DISCUSION
9. CONCLUSION
10. REFERENCIAS.
11. LISTA DE ABREVIATURAS
12. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.
13. ARTICULOS

1. RESUMEN

La glándula pineal es un órgano multifacético, al cual se le ha relacionado con alguna actividad neuroendócrina, endócrina o con la regulación de los ritmos biológicos. Específicamente la actividad secretora de la glándula se le relaciona con: síntesis de melatonina-serotonina, síntesis de péptidos del tipo arginina-vasotocina y proteínas del tipo inhibidor de gonadotrofinas. El primer grupo de sustancias ha sido el más estudiado y su síntesis es regulada por el núcleo supraquiasmático. Uno de los problemas que existe en Biología Celular y Cronobiología, es saber cuándo y cómo se establece el ritmo de melatonina y, qué y quién lo regula. De esta manera se ha relacionado a la glándula de Harder con la regulación de la glándula pineal.

A la glándula de Harder se le atribuyen una gran variedad de funciones: fuente de lípidos termorreguladores, de feromonas, órgano fotoprotector, inmunorregulador e importantemente parte del eje retina-pineal. A su vez la glándula de Harder presenta un ritmo circadiano en la síntesis de Harderporfirinas.

El propósito de este trabajo fue demostrar *in vitro* que los extractos de glándula de Harder tienen la capacidad de estimular la glándula pineal (síntesis de melatonina) de ratas jóvenes, y que éste fué independiente de su inervación β -adrenérgica (noradrenalina). Para probar esto, se utilizaron glándulas pineales de rata de 15 días de desarrollo posnatal, las cuales fueron incubadas con extractos obtenidos bajo distintas condiciones de luz de glándulas de Harder de ratas de 15 días de desarrollo posnatal.

El extracto orgánico de glándulas de Harder obtenido bajo un ritmo de luz/obscuridad normal, estimuló la síntesis de melatonina en pineal individual *in vitro*. La presencia de vesículas claras con núcleo denso, cintillas sinápticas y una mayor cantidad de retículo endoplásmico rugoso fueron los datos más importantes a nivel de ultraestructura. Conclusión: Se demostró que las sustancias químicas presentes en la glándula de Harder estimularon la síntesis de melatonina.

1.1 ABSTRACT

The Harderian gland are large tubulo-alveolar organs located at the orbital cavity of many vertebrates. It appears to be a multipotent organ proposed functions. It is well documented that the Harderian gland influence the pineal gland activity. In the early states of development serotonin and melatonin synthesis is regulated by an extrapineal system in which the Harderian gland play an important role. The aim of the present work was to study the effects of differents Harderian gland extracts obtained under differents light conditions under melatonin concentration, the structure and ultrastructure (transmission and scanning electron microscopy) of the pineal gland *in vitro*. We used two differents extracts (acuous and organic) obtained from Harderian gland of 15 days old male rats under: I) normal rhythm; II) constant darkness; III) constant light. Pineal glands from 15 days old male rats, were incubated 2 or 4 h in polystyrene dishes at 11:00 and 23:00 h with the acuous or organic Harderian glands extracts (I, II and III). A significant difference was observed in the melatonin concentration in the pineal glands incubated with organic extracts obtained under normal rhythm, in comparison with those obtained under constant dark or light, and independent of adrenergic stimulation. We do not observed modifications in the cell number or in the mitotic index. The pineal gland exhibited an important increase of clear vesicles in those groups incubated with organic extracts obtained under normal rhythm and constant darkness.

The interaction between pineal-Harder *in vivo* during the development is poor understood. We studied the effects of Harderian gland extracts (acuous and organic) during the early pineal development (*in vitro*) in rats; and we do not observed differences (by biochemical methods) at 3 to 7 days old. When we incubated the Harderian gland extracts with 15 days old pineal glands, we concluded that the effects of Harderian gland extracts (specially organics) were able to stimulated the synthesis of melatonin, also exhibited changes in the structure and ultrastructure of the pinealocyte.

11. LISTA DE ABREVIATURAS.

RN.	Ritmo normal.
LC.	Luz constante.
OC.	Obscuridad constante.
M.	Molar.
ml.	mililitro.
mg.	miligramo.
μ g.	microgramo.
Kg.	Kilogramo.
MEM.	Medio esencial mínimo.
COMT.	Catecol-Orto-metil-transferasa.
CO ₂	Bióxido de Carbono.
O ₂	Oxígeno.
ng	nanogramos.
st	estándar.
u max.	unión máxima.
Li.	Lámina intercalaris.
Tp.	Tallo pineal.
P.	Organo pineal (pineal superficial).
μ .	Micras.
T ₃ .	Triyodotironina.
T ₄ .	Tetraydotironina.
NMDA.	N-metil-D-aspartato.
GIS.	Sustancia inhibidora de las gonadotrofinas.
SNC.	Sistema nervioso central.
RNA.	Acido ribonucleico.
Cu	Cobre.
Mg	Magnecio.

Zn.	Zinc.
NAT.	N-acetil-transferasa.
HIOMT.	Hidroxi-indol-Orto-metiltransferasa.
TRH.	Hormona liberadora de tiroides.
MPTP.	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.
°C.	Grados centígrados.
Suc-CoA.	Succinil-Coenzima A.

2. INTRODUCCION

2.1. LA GLANDULA PINEAL

Desde el siglo III antes de Cristo, Herófilo relacionó a la glándula pineal con funciones reguladoras de la memoria, 450 años más tarde Galeno la relacionó con los nódulos linfáticos y posteriormente Descartes en el siglo XVII, la interpreta como la convección del espíritu de la sangre hacia los ventrículos cerebrales. De ahí que se ubicara el alma en la glándula pineal, idea que perduró durante 250 años (11, 61). El nombre actual de la glándula proviene de un anatomista inglés: Thomas Gibbson (en: "The anatomy of human bodies epitomized" 1682), del latín "*pineus*", ya que su forma es semejante a una piña de conífera. (76).

En mamíferos, la investigación sistemática de la pineal comienza alrededor de 1880, con autores como Ahlborn y de Graaf, y no es sino hasta 1943 en que Bargmann propone la regulación de la glándula vía Sistema Nervioso Central (S.N.C) (5,77).

Durante la evolución filogenética la apariencia así como la función del complejo pineal revelan importantes diferencias entre diversas especies, y podemos definir fundamentalmente tres estadios; la etapa de fotorreceptor (funcional en peces y anfibios), en que la señal lumínica ambiental es transformada en señal neuronal aferente al S.N.C a través del nervio pineal. Una etapa intermedia (transductor fotoendógeno desarrollado en aves), en la cual los fotorreceptores presentes tienen cierta capacidad de transformar energía lumínica en respuesta secretora. Por último, la etapa de transductor neuroendócrino en los mamíferos, la cual pierde su propiedad fotorreceptiva y la conexión se produce en la retina neural (13,15,19).

Se ha postulado que esta última etapa, está estrechamente relacionada con modificaciones hormonales en varias especies (15). La vinculación no es clara, pero existen evidencias de su participación en la regulación de la función de diversos órganos, como son: hipotálamo, hipófisis, tiroides, suprarrenales y gónadas (34). Por lo anterior, se designa al cuerpo pineal como neurotransductor

endócrino, es decir, un órgano que convierte un impulso eléctrico neural proveniente de la retina en una respuesta endócrina; la melatonina. Además hay evidencia acerca de otros compuestos pineales; como algunas proteínas de bajo peso molecular que como la melatonina, tienen efectos importantes sobre el S.N.C al modificar la actividad eléctrica cerebral normal (15, 63-66).

2.1.1 ANATOMIA.

La glándula pineal (*epifisis cerebri*) de los mamíferos es una pequeña estructura lenticular intracraneal unida por un tallo al techo del tercer ventrículo entre la comisura habenuar y la comisura posterior por arriba del techo del mesencéfalo, ubicada entre los tubérculos cuadrigéminos superiores (76).

Embriológicamente se desarrolla a partir de la porción mediana del prosencéfalo que origina la placa del techo diencefálico, la porción más caudal de éste se abulta dorsalmente y forma un divertículo cuyas paredes engruesan hasta ocupar gradualmente la cavidad que constituye a la glándula pineal, que alcanza su máximo desarrollo en la etapa posnatal y posteriormente presenta cambios regresivos (76).

Dicha evaginación la constituyen dos clases de células (4) que participan en la formación de la glándula, por un lado, las neuroectodérmicas, contenidas en el divertículo del techo mismo, y que van a originar los dos tipos de células: los pinealocitos, y la glía; y por otro, las células mesenquimatosas de la piamadre que reviste el divertículo, y que van a derivar en fibroblastos que constituyen la cápsula, trabéculas y tabiques que subdividen más o menos la glándula en lobulillos (61). El aspecto de los lobulillos varía en distintos individuos, y consisten en conjuntos de pinealocitos y células neurógliales separadas parcialmente por trabéculas irregulares y tabiques incompletos de tejido conectivo, que llevan un abundante riego capilar proveniente de dos ramas de las arterias coroideas posteriores (78). En la rata, estos capilares están fenestrados, lo cual facilita la secreción de los pinealocitos hacia la sangre. Al avanzar la vida del individuo, se

acumulan en la glándula residuos de material calcificado (arenilla cerebral), indicio de un fenómeno degenerativo (76).

Las células más abundantes en estos lobulillos son los pinealocitos, células de gran tamaño con núcleos voluminosos y nucléolos destacados, su citoplasma presenta acúmulos de material basófilo (RNA) y gran cantidad de mitocondrias, y poseen prolongaciones extensas derivadas del cuerpo celular que semeja una maraña y va a constituir el parénquima de la glándula junto con las prolongaciones de las células neurógliales, las cuales se identifican por su núcleo más aplanado y condensado, la mayoría es de forma rectangular y su citoplasma es basófilo (2,4).

El desarrollo ontogénico de la pineal en la rata se puede dividir en tres fases: a) morfogénica, que abarca del 12vo día de vida embrionaria hasta el nacimiento, b) la fase de proliferación celular que se inicia el 16vo día de vida intrauterina y termina pocos días después del nacimiento, y c) la de diferenciación celular, que inicia en el nacimiento y termina de 8 a 12 semanas después (4).

2.1.2 COMPOSICION BIOQUIMICA.

En la glándula pineal de los mamíferos se encuentran altas concentraciones de Cu, Mg, y Zn en comparación con otras regiones cerebrales (83), su presencia se debe, por un lado a estar relacionados con las enzimas propias de la glándula y por otro, a su asociación con pigmentos y concreciones conocidas como arenilla cerebral (64). El almacenamiento de compuestos inorgánicos en la pineal ha sido usado para evaluar algunos datos funcionales, como por ejemplo el flujo sanguíneo con ayuda de potasio radioactivo, o la barrera vascular pineal con nitrato de plata (84).

Del 3% al 10% del peso húmedo de la glándula está constituido por lípidos que conforman la fracción lipídica, y más de la mitad son fosfolípidos (17). Se encuentran en forma de pequeñas gotas alrededor del núcleo, y raramente en la periferia de las prolongaciones citoplasmáticas, por lo que su significado como material de secreción (total), sólo se ha demostrado en parte (2). Se ha observado

que en animales expuestos a luz continua, disminuye notablemente la cantidad de lípidos (47), efecto que es bloqueado al seccionar los nervios ópticos, lo cual apoya la regulación circádica del funcionamiento de la glándula (7).

La naturaleza de los carbohidratos presentes en la glándula no se ha determinado con exactitud, debido a su labilidad, sin embargo se ha demostrado la presencia en concentraciones importantes de algunos derivados de monosacáridos como el ácido neuramínico y el ácido siálico, los cuales forman parte de lípidos, polisacáridos y mucoproteínas localizadas en el glucocálix de la membrana celular (47). Otro de los compuestos presentes, y que es el almacén nutritivo de los tejidos animales, es el glucógeno, el cual sufre un decremento en su concentración en ratas expuestas a luz continua.

Por lo que respecta a los aminoácidos, son importantes las concentraciones de aquellos susceptibles de donar un grupo metilo (s-adenosil-metionina) requerido en la biosíntesis de la melatonina (15), y principalmente la presencia de una gran cantidad de triptófano circulante, el cual es captado por el pinealocito e hidroxilado en la posición 5 del anillo indólico por la triptófano-hidroxilasa para formar 5-hidroxitriptófano, que al ser descarboxilado da origen a la 5-hidroxitriptamina o serotonina cuyo destino metabólico específicamente a nivel de la pineal consta de dos pasos más; la transferencia de un grupo acetil proveniente de la acetil coenzima A y forma la acetil serotonina, este importante paso es mediado por la n-acetil-transferasa (NAT), la cual se considera como la enzima limitante, para posteriormente por acción de la hidroxindol orto-metil transferasa (HIOMT) y la donación de un grupo metilo, convertirse en 5-metoxitriptamina o melatonina (24,45,47,52,53), ambas enzimas a su vez experimentan una regulación circadiana y han sido objeto de múltiples estudios, ya que al demostrar su presencia, el tejido en cuestión tiene la capacidad de sintetizar melatonina, tal es el caso de retina, glándula de Harder y tracto gastrointestinal (3,13,15,40,41,51,84).

2.1.3 FISILOGIA.

La inervación de la glándula proviene principalmente de la porción posganglionar (ganglio cervical superior), del sistema nervioso autónomo, y se ha demostrado que las terminales nerviosas llegan directamente a las células pineales (31,32). La actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis de la serotonina y melatonina en la pineal está controlada por estimulación beta-adrenérgica del pinealocito (38,39).

Se han sugerido varias vías de inervación. La más investigada es la que conduce al estímulo fotónico que proviene de la retina, y pasa a través de la proyección retino-hipotalámica, hacia el núcleo supraquiasmático, de donde salen fibras nerviosas hacia el fascículo prosencefálico medio que luego pasan hacia el ganglio cervical superior, para terminar la conexión con la pineal a través de los nervios conarios que penetran en su región distal (32,39) (Fig1).

Se ha acumulado evidencia que indica la existencia de otra vía de inervación de la pineal, consistente en pequeñas fibras, de origen también simpático, que llegan a ella a través del tallo, el cual parece contener fibras de la comisura habenuar y la comisura posterior en varios mamíferos (39).

En los mamíferos, la función de la glándula pineal no se ha dilucidado por completo. Existen trabajos que la relacionan con la maduración posnatal del cerebro (30,64,70,71), también con la secreción de las hormonas hipofisarias (31), para lo cual se ha sugerido la existencia de una regulación bidireccional entre la pineal y el sistema hipófisis-hipotálamo en los mamíferos (28,62,65).

Específicamente se le atribuye una función secretora, ya que desde el punto de vista metabólico los pineocitos son muy activos y secretan dos sustancias; serotonina y melatonina, de estructura semejante, sin embargo, no secretan ambas simultáneamente (66).

La melatonina (indol derivado del triptófano) es sintetizada en la noche, en tanto que en las horas diurnas se forma serotonina (61,63,66). La concentración en la rata de ambas experimenta cambios cíclicos notables de 24 horas (9,10). Es

al parecer la luz, el estímulo que inhibe la formación de melatonina y disminuye la concentración de las enzimas que la forman (9,60,62,66,77).

La melatonina se descubre en 1958 en anfibios, y se le llamó factor aclarador de la piel por el efecto que produce en ellos. En ratas y hamsters hembras, su déficit provoca hiperfuncionamiento gonadal, ya que tiene un efecto directo sobre el hipotálamo, y retarda la aparición del estro, o bien la pinealectomía origina desarrollo sexual precoz, ya que probablemente inhibe en forma directa la secreción gonadal o bien a los factores liberadores (6,33,54,63), hay trabajos que proponen una regulación de la actividad pineal por parte de las hormonas gonadales (33,48,54). En animales neonatos no puede sintetizarse, sin embargo se ha demostrado que la melatonina materna es transportada a través de la placenta (38) y de la leche, juega un importante papel en la maduración sexual (72), incluso en el humano se le atribuye una relación en la regulación gonadal (72).

En algunas especies está demostrado un efecto de la glándula pineal sobre la tiroides, puesto que la exposición de un animal a obscuridad continua causa hipertrofia de la glándula pineal con depresión de la función tiroidea, efecto que se consigue también mediante la administración de melatonina, mientras que la exposición a luz constante atrofia la glándula e incrementa la secreción de hormonas tiroideas en varias especies, efecto que se logra también con la pinealectomía. Probablemente el efecto depresor sea causado a través de la inhibición en la síntesis y liberación de la TRH (36), hay experimentos que demuestran que si se modifica el ciclo de luz-obscuridad 180 grados, se registra un cambio en la actividad de la pineal y en tan sólo 6 días se sincroniza al nuevo ritmo, lo cual indica que el ritmo diario es endógeno pero sincronizado a la luz ambiental, por lo que se requiere un reloj que sincronice la actividad al nuevo ritmo (8-10,14,21,76).

El reloj biológico central que actúa como oscilador, e influye a las células pineales parenquimatosas para regular las variaciones en los niveles de

melatonina y serotonina en el ritmo endógeno pineal de tipo circádico, es el núcleo supraquiasmático; se ha demostrado experimentalmente en la rata que las lesiones a este nivel provocan la desaparición del ritmo diario en el metabolismo de las indolaminas, y muy probablemente suceda también en el humano (52). Por tal motivo, la glándula pineal ha sido objeto de diversas investigaciones, ya que proporciona un modelo experimental para estudios de ritmos circadianos, además de la regulación que ejerce sobre otros órganos (22,23).

En cuanto a las variaciones circadianas que presentan los productos de la glándula pineal, encontramos que las hormonas producidas por la tiroides, poseen también una estrecha dependencia de las condiciones de luz prevalecientes.

En experimentos con ratas ciegas (ablación quirúrgica del nervio óptico), se mantienen los ritmos de síntesis de serotonina y melatonina (45), lo cual se ha relacionado con algún mecanismo (no bien conocido), mediado por la glándula de Harder como el fotorreceptor extrarretinal responsable, quizá a través de las porfirinas que sintetiza (79-81).

La melatonina es un potente antioxidante y barredor (scavenger), esto se ha comprobado en distintos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, como son: a) isquemia-reperfusión en gerbo; b) sepsis inducida con lipopolisacárido de *Escherichia coli*; c) intoxicación con el herbicida paraquat. En estos modelos el común denominador es el daño celular producido por la generación de radicales libres y en todos la melatonina ha mostrado ser un importante componente del sistema antioxidante del organismo (49,50,56,73,74).

Además, la relación radicales libres-envejecimiento, es un tema (teoría) que actualmente se encuentra como una línea de prioridad en investigación en muchos laboratorios (66-69). Últimamente se ha trabajado con la correlación entre melatonina-envejecimiento, ya que la disminución de melatonina con la edad (>40 años en el hombre), coincide con la aparición de enfermedades degenerativas, como son el Parkinson y el Alzheimer y/o el cáncer. En el caso de Parkinson se ha demostrado que en modelos inducidos con MPTP (ratones C57/B6), el daño

observado en el sistema nigro-estriado es menor en aquellos animales a los cuales se les administró melatonina (1).

2.2. LA GLANDULA DE HARDER.

La glándula de Harder fué descubierta y descrita por primera vez en el siglo XVIII por Johan Jacob Harder, un médico y naturalista suizo nacido en 1656. Anatómicamente existen grandes diferencias de estructura y localización de la glándula según la especie; la rata y el ratón desarrollan glándulas de tipo mucoso. En el conejo las glándulas están separadas y se comunican a la superficie exterior mediante conductos. En el cobayo las glándulas Harderianas están separadas y localizadas en la porción nasal, asociadas a la membrana ocular; son excepcionalmente grandes en el león marino, ya que poseen una abundante secreción que actúa como protector contra el agua de mar (36).

En los reptiles las glándulas Harderianas siempre están presentes; los cocodrilos presentan glándulas Harderianas y glándulas lagrimales en posición naso-ventral, y con conductos simples; en las serpientes no existen glándulas lagrimales, pero las Harderianas son grandes y vierten su secreción (como un aceite) dentro del saco conjuntival, a partir de las esquinas de estos sacos conjuntivales la secreción se vierte dentro de la nariz por un sólo conducto naso-lacrimal y se abre dentro del órgano vómero-nasal de Jacobson, desde aquí se introduce a la boca y actúa como secreción salivatoria accesoria para la lubricación de las fauces, al abrirse durante la alimentación y la deglución.

Los quelonios presentan un conducto simple en cada una de sus glándulas y no tienen conducto naso-lagrimal (36). En los anfibios existe una membrana ocular pasiva que forma parte del párpado inferior, a diferencia de la pseudomembrana de algunos peces Teleosteos (esqueleto de hueso verdadero) y de la membrana ocular de los vertebrados. La lubricación del ojo en los anfibios se efectúa por el desarrollo de las glándulas Harderianas en el margen del párpado superior, las glándulas nasales se hipertrofian para formar las grandes glándulas Harderianas, que ocupan un gran espacio en la mitad nasal de la órbita, éstas son temporalmente las precursoras de las glándulas lagrimales de éstos animales (36).

En los peces no existe aparato lagrimal, pero existen cuatro diferentes tipos de

secreciones provenientes de las glándulas Harderianas. -

- A.- para el ojo.
- B.- para la nariz.
- C.- para el órgano vómero-nasal de Jacobson.
- D.- secreciones accesorias para las glándulas salivales.

2.2.1 EVOLUCION DE LA GLANDULA DE HARDER.

Al adaptarse los animales a la vida terrestre tuvieron que desarrollar un mecanismo para el mantenimiento de la humedad en la córnea, las glándulas lagrimales fueron las primeras en desarrollarse en los anfibios; las glándulas lagrimales y las Harderianas parecen haberse desarrollado de igual manera en el proceso evolutivo, poseen aberturas desde el párpado inferior hacia la nariz, lo que hace pensar que es posible que la secreción de éstas glándulas no tiene como única función lubricar la córnea, sino que además ayuda a mantener la humedad de las fosas nasales. Por otra parte se ha relacionado con mecanismos termorreguladores (57,59)

2.2.2 MORFOLOGIA DE LA GLANDULA DE HARDER.

La glándula de Harder ha sido considerada como una glándula mixta de tipo lagrimal accesorio (20). De naturaleza apócrina esta glándula es un complejo túbulo-alveolar localizado en la parte posterior del globo ocular en aquellos animales que poseen un tercer párpado.

En el conejo presenta macroscópicamente 2 lóbulos, denominados lóbulo blanco, y rojo. En el análisis químico de la glándula se encontraron diferencias de contenido lipídico entre ambos lóbulos, el principal componente del lóbulo rojo es el éter-diacil-glicerol; el contenido de este lípido, es bajo en el plasma sanguíneo y en otros tejidos, pero ha sido encontrado en el hígado de algunos peces condrosteos como los tiburones, en éstos animales el éter-diacil-glicerol puede reemplazar a los triglicéridos del hígado, se piensa también que los ésteres de

colesterol pueden ayudar en el proceso de cicatrización (29).

En el hámster hay grandes diferencias en la glándula Harderiana, como lo indica la presencia del pigmento negro parduzco proveniente de las glándulas de la hembra (62). Las glándulas del hámster macho, poseen tipos distintos de células que la hembra (48), estas diferencias han hecho del hámster el modelo más estudiado (fig 2).

Al examinar electromicroscópicamente las glándulas Harderianas de ratas adultas e infantiles se han encontrado dos tipos principales de células (59,62):

- 1.- células acinares.
- 2.- células mioepiteliales

2.2.3 PROCESO DE MADURACION DE LAS CELULAS ACINARES.

La maduración de las células acinares está representada por cuatro tipos de células: I,II,III y IV. Estas células muestran un incremento gradual en el tamaño de sus vesículas secretoras según la edad del animal. Estas vesículas se desarrollan a partir de membranas y de pequeñas vesículas generadas en el aparato de Golgi. Las células del tipo I y II se presentan en las ratas, ratones, y cobayos jóvenes o infantiles, y los tipos II,III y IV en animales adultos (59,62).

Los cuatro tipos de células no son formas estrictamente separadas unas de otras ya que hay entre ellas una continua transición (35).

Las células acinares de ratas adultas e infantiles, son piramidales y presentan núcleos basales. En las ratas jóvenes los acinos están formados por células de tipo I y II, y en los adultos de tipos II, III y IV.

Ahora describiremos la estructura sub-celular de cada uno de los diferentes tipos celulares:

2.2.3.1 CELULAS TIPO I.

Estas son células poco diferenciadas, contienen un número de vesículas rodeadas por una gruesa membrana, estrechamente asociadas a las vesículas existe un gran número de mitocondrias. La base del citoplasma es clara, finamente

granular y en él se observan ribosomas, finas vesículas y gránulos. Las vesículas están acomodadas en grupos de dos a seis. Este tipo de células se presentan en animales jóvenes (35).

2.2.3.2 CELULAS TIPO II.

Las células tipo II aparecen en las glándulas acinares de las ratas infantiles y en ellas se observan grandes vesículas. Las vesículas grandes son menos numerosas y siempre son más grandes que las células tipo I. Se calcula que el diámetro de una vesícula grande en las células I y II es de alrededor de $1.05 \mu\text{m}$. Como ya se ha mencionado, existen también en la glándula infantil formas transicionales entre las células I y II. (35).

2.2.3.3 FORMAS TRANSICIONALES.

En estas células intermedias el número de vesículas es más grande que en las células inmaduras del tipo I (35,59). Existe también un incremento gradual en el número de vesículas en el aparato de Golgi, y da la impresión de que la alta densidad electrónica de la célula de tipo II es el resultado de un sobredesarrollo del aparato de Golgi. Por otra parte, las grandes vesículas parecen desarrollarse a partir del aparato de Golgi y es, en el primer estadio una pequeña membrana, la cual va aumentando gradualmente de tamaño. El aumento adicional en el tamaño de las vesículas se debe a la incorporación en ellas de pequeñas vesículas; el límite o frontera de las vesículas grandes parece ser una línea ininterrumpida consistente en una serie de semicírculos que sugiere que las membranas y las vesículas pequeñas del aparato de Golgi se van a incorporar a las vesículas grandes.

2.2.3.4 CELULAS TIPO III y IV.

De las células tipo II, que se caracterizan por contener un denso lecho de citoplasma y pocas vesículas, hay una transición gradual hacia células maduras y cuyo citoplasma es más claro, también existe un incremento en el tamaño de las vesículas grandes, y su tamaño promedio es de $1.37 \mu\text{m}$.

Las células de tipo III contienen menos vesículas grandes que las tipo IV, en

éstas el citoplasma está totalmente ocupado por las vesículas y solo está representado el citoplasma por pequeños cordones entre dichas vesículas.

Las membranas limítrofes en la células de tipo IV muestran un adelgazamiento gradual y a veces están fenestradas. Las células de tipo III y IV ya son capaces de sintetizar pigmento a diferencia de las de tipo I y II, que todavía son inmaduras

El incremento gradual en el número y diámetro de las vesículas grandes, y el paso en el aclaramiento del lecho del citoplasma son los principales rasgos de maduración acinar, se incrementa el número de células acinares que se llenan de vesículas grandes, las cuales se desprenden de la terminación apical de las células y entran al lumen acinar.

2.2.3.5 DESARROLLO DE LAS VESICULAS.

Si se considera la relación inversa entre el aclaramiento del citoplasma de las células tipo III y IV y el incremento en el número y diámetro de las vesículas grandes, se podría sugerir que la génesis de dichas vesículas está relacionada con la desaparición gradual del sobredesarrollo del aparato de Golgi. Los primeros pasos de este proceso son muy perceptibles en las células de ratas infantiles: las vesículas grandes aparecen en el aparato de Golgi como pequeñas membranas, después aumentan de tamaño e incorporan más y más membranas y finas vesículas desde dicho aparato de Golgi, éste segundo paso de desarrollo de las vesículas grandes, ocurre en células de tipos II, III, y IV; pero es raramente observable debido a la pronunciada densidad del lecho del citoplasma.

2.2.4 CELULAS MIOEPITELIALES.

La presencia de células mioepiteliales en la glándula de Harder no es de sorprender, ya que la glándula se relaciona filogenética y ontogénicamente con las glándulas lacrimales que poseen células mioepiteliales (57,59).

El significado fisiológico de las células mioepiteliales en la glándula de Harder es el ser elementos contráctiles para la expulsión de productos de

2.2.5 PIGMENTO DE LA GLANDULA DE HARDER

2.2.5.1 HARDEROPORFIRINAS

El pigmento fue estudiado por Derrien y Turchini en 1924, ellos efectuaron disecciones de cabezas de ratas y notaron que el color rojo fluorescente de la glándula se debe al pigmento, una porfirina sintetizada ahí: la Harderoporfirina; la cual por su solubilidad recuerda a la cáscara de huevo. Thomas describió la presencia de protoporfirina en muestras de glándulas de Harder, lo que fué confirmado por Chick en 1940. Mc Elroy describió la presencia de dos tipos de protoporfirinas en las ratas: la porción principal es una porfirina sintetizada en la misma glándula, la fracción menor es coproporfirina, un pigmento derivado de los ácidos biliares, que ayuda a darle coloración a las heces fecales (36). Figge encontró que las glándulas de los ratones con alta susceptibilidad al sarcoma Sheffield RD/3 presentaban un color fluorescente más intenso que los ratones con baja susceptibilidad, como también demostró que la cantidad de porfirina se incrementaba al aumentar el estadio del tumor. En 1946 Bittner y Watson descubrieron una protoporfirina en la glándula de Harder de ratones de varias edades; y Kennedy encontró que al incubar homogenados de glándulas de Harder con porfobilinógeno derivado de los pigmentos biliares, se producía uroporfirina III, una fracción porfirínica que ayuda a darle coloración a la orina, lo cual indica que las glándulas son capaces de sintetizar su propio pigmento. Tomio y Grinstein reportaron en 1968 que el contenido de porfirinas de las glándulas Harderianas de ratas normales adultas es de casi 15 $\mu\text{g}/100$ mg de peso, constituido por:

- A.- Protoporfirina IX.- 87 % .
- B.- Coproporfirina III.- 11 %.
- C.- Porfirina tricarbóxica.- 2 % (35).

El precursor biológico de las porfirinas es un monopirrol con cadenas laterales de ácidos acético y propiónico, el porfobilinógeno.

Dentro del grupo de las porfirinas se encuentran uroporfirinas, derivados de ácidos biliares que se encuentran en la orina, aunque no se presentan exclusivamente en ésta; son porfirinas tetracéticas y tetrapropiónicas. De los isómeros posibles de las uroporfirinas solo se encuentran en la naturaleza la uroporfirina I y la uroporfirina III; la uroporfirina I presenta sus sustituyentes químicos en sucesión alternada, en cambio, este orden se invierte en la cuarta unidad pirrol de la uroporfirina III (29,42).

Si se descarboxilan las cadenas laterales del ácido acético de las uroporfirinas se producen coproporfirinas, que también son tetraacéticas y tetrapropiónicas, presentes en la naturaleza (coproporfirinas I y II).

Cabe considerar a la mesoporfirina IX (porfirina tetrametílica, dietílica y dipropiónica) derivada de la coproporfirina III por descarboxilación de los dos grupos de ácido propiónico. La conversión de los dos grupos etilo de la mesoporfirina IX en hidroxietilo originan hematoporfirina IX (porfirina tetrametílica, bis-hidroxietílica, y dipropiónica); la deshidratación de los grupos hidroxietilo produce protoporfirina IX (porfirina tetrametílica, divinílica, y dipropiónica). (31,44).

2.2.5.2 PROPIEDADES QUIMICAS DE LAS PORFIRINAS.

Por tener grupos carboxilo (COOH), las porfirinas corrientes forman sales con facilidad, de las cuales las sales amoniacaes y las sódicas son las más solubles y las menos solubles respectivamente. Por los nitrógenos pirrólicos y los grupos carboxilo, las porfirinas naturales son compuestos anfotéricos que se comportan como ácidos o bases cuyo punto isoeléctrico (pH en el cual se encuentran equilibradas las cargas de un aminoácido) está en el pH de 3.0 a 4.5; por ello las porfirinas en el pH fisiológico transportan cargas negativas y se unen con facilidad a proteínas básicas (catiónicas en pH neutro).

Los grupos carboxilo de las porfirinas se esterifican (se les agrega un radical hidroxilo y liberan agua) con facilidad. Casi todos los métodos de obtención de éstas sustancias a partir de fuentes naturales, previamente entran en la conversión a ésteres metílicos. Los átomos de nitrógeno con algunos metales, ocupan la posición central en el anillo porfirínico, (cobre y zinc en su estado natural) se combinan con las porfirinas, sin embargo los compuestos férricos tienen más importancia de tipo biológica, por ejemplo, las ferroporfirinas (hemes) se combinan con proteínas y compuestos orgánicos más sencillos, y en algunos casos también con gases (42).

2.2.5.3 PROPIEDADES FISICAS DE LAS PORFIRINAS.

Las porfirinas poseen espectros de absorción característicos. La absorción de luz en el extremo ultravioleta es muy intensa. En general las porfirinas son más fácilmente solubles en solventes orgánicos que en agua. Las que sin embargo poseen mayor número de grupos carboxilo son menos solubles en solventes orgánicos y más solubles en agua. A causa del distinto número de grupos carboxilo de las diversas porfirinas pueden efectuarse extracciones diferenciales a partir de los solventes orgánicos en fases acuosas de pH apropiado. Las porfirinas y sus ésteres metílicos también pueden separarse e identificarse por cromatografía (29,42,43).

2.2.5.4 BIOQUIMICA DEL PIGMENTO.

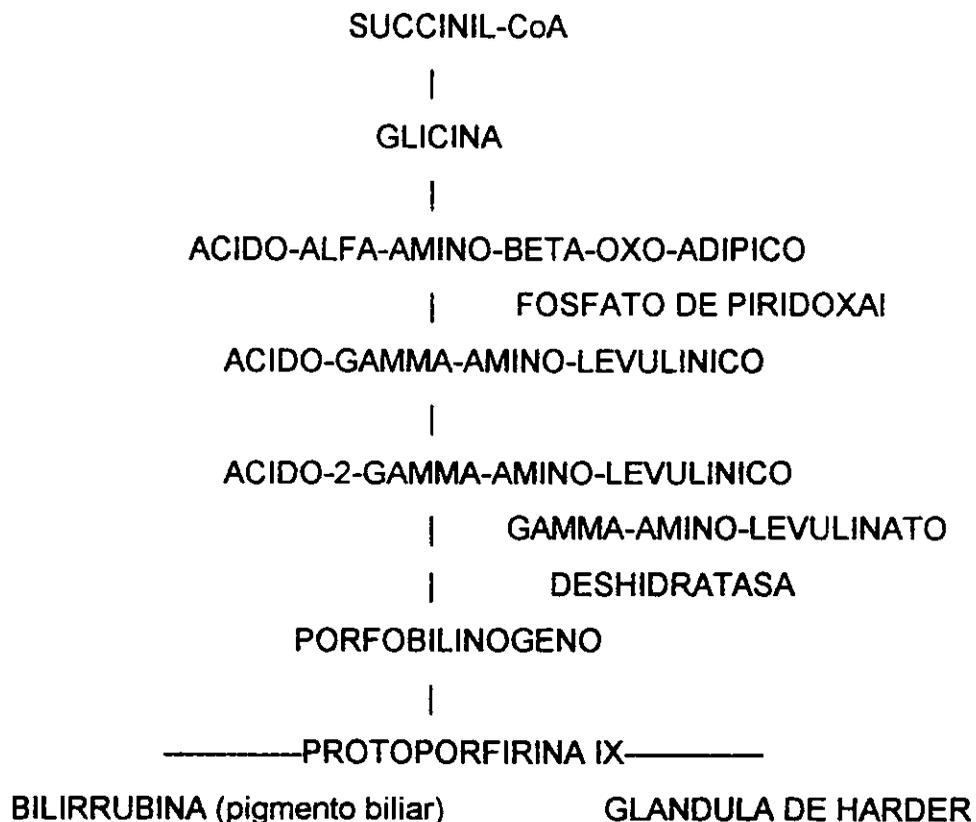
Bioquímicamente la porfirina es un compuesto constituido por 4 moléculas pirrónicas enlazadas en un circuito cerrado, unidas por puentes metínicos (C = con tres valencias y la cuarta valencia compartida con un pirrol).

Las porfirinas derivan de la "porfina", un tetrapirrol cíclico que no posee cadenas laterales sustituyentes, las porfirinas se designan y clasifican al basarse en los sustituyentes que forman las cadenas laterales, por ejemplo; etioporfirinas, mesoporfirinas, coproporfirinas, uroporfirinas, protoporfirinas, etc; y son las más

importantes las protoporfirinas que contienen cuatro grupos metilos, dos grupos vinilo, y dos grupos de ácido propiónico. Pueden describirse 15 protoporfirinas isómeras, pero sólo la protoporfirina IX se encuentra en la naturaleza, se halla en la hemoglobina y en la mayor parte de los citocromos. Las protoporfirinas forman complejos quelados tetradentados con iones hierro, cobre, magnesio, zinc, níquel y cobalto; en los que el metal se mantiene unido por cuatro enlaces coordinados (43).

La biosíntesis de las porfirinas, en la cual la glicina y la succinil-CoA son los precursores principales, constituyen el papel fundamental que desempeñan el núcleo de porfirina en la hemoglobina, en la clorofila, y en los citocromos; los tetrapirroles se constituyen apartir de cuatro moléculas de un derivado monopirrólico, el porfobilinógeno.

El porfobilinógeno se biosintetiza y se convierte en protoporfirina IX de la siguiente manera:



Esta vía metabólica quedó dilucidada en los tejidos animales principalmente gracias a estudios enzimáticos con isótopos radioactivos realizados por el Dr. Shemin y colaboradores (18). Primeramente la glicina reacciona con la succinil-CoA para formar ácido-alfa-amino-beta-oxo-adípico ligado a la enzima, que después se descarboxila y forma ácido-gamma-amino-levulínico, reacción que es catalizada por una enzima dependiente de fosfato de piridoxal proveniente del retículo endoplásmico liso de las células hepáticas, entonces dos moléculas del gamma-amino-levulinato se condensan entre sí para formar porfobilinógeno gracias a la acción de la enzima gamma-amino-levulinato-deshidratasa. El mecanismo de esta reacción completa implica la formación intermedia de una base de Schiff entre el grupo óxido de una molécula de ácido-gamma-amino-levulínico y el grupo épsilon-amino de un residuo de lisina de la enzima. (18).

Tanto la sintetasa como la hidratasa son enzimas reguladoras, resultan inhibidas por el grupo "hemo", por la hemoglobina, y otras hemoproteínas; que son productos finales de esta ruta biosintética. Después, cuatro moléculas de porfobilinógeno actúan como precursores del tetrapirrol cíclico protoporfirina, estas pasan por una compleja serie de reacciones; el hierro no se incorpora hasta que se ha completado la molécula de protoporfirina. La incorporación de hierro requiere de la presencia de la ferroquetalasa, una enzima que se localiza en las mitocondrias, y gracias a otra enzima la hemosintetasa, el hierro se une a la protoporfirina y a la proteína globina, para formar así la hemoglobina.

Se ha demostrado por medio de pruebas histoquímicas que dentro de las secreciones de la glándula de Harder se pueden encontrar: a) Fosfolípidos; b) Hierro; c) Triglicéridos; d) Colesterol y sus ésteres; e) Fosfatasa ácida y alcalina; f) Lipasa; g) Proteínas y h) Glucógeno.

2.2.6 DIMORFISMO Y REGULACION ENDOCRINA DE LA GLANDULA DE HARDER

En el hámster dorado existe marcado dimorfismo sexual en la glándula de Harder; el macho posee dos tipos diferentes de células, y la hembra solo un tipo.

2.2.6.1 CELULAS DEL MACHO.

En el macho, la célula tipo I forma una columna simple y contiene numerosas vesículas llenas de lípidos. Célula tipo II es una célula más grande y contiene grandes vesículas (Fig 2).

2.2.6.2 CELULAS DE LA HEMBRA.

En la hembra la célula tipo I. es igual a la mencionada de tipo I de los machos, esta organizada en una columna simple y contiene grandes vesículas llenas de lípidos (Fig 3).

Las células en el macho sin castrar son de dos tipos, o representan dos diferentes estadios en el ciclo de secreción de la glándula. Estos dos tipos celulares tienen una estructura diferente y las células del tipo II dependen de los andrógenos para su aparición; estas mismas células de tipo II contienen probablemente un factor inhibitorio que suprime la producción de porfirina por las células de tipo I y por la glándula normal del macho. Al eliminar la producción de andrógenos mediante la castración, la célula tipo II desaparece y se eleva considerablemente la producción de porfirinas. Por otro lado, si los tipos I y II de la glándula del hámster dorado provienen de una misma célula primaria, entonces los andrógenos inducen la transición de la célula I a la célula II; y la eliminación de estas hormonas, los andrógenos, produce el cese de dicha transición por lo que las células de tipo II desaparecen gradualmente, y en este caso parecería que la habilidad de las células tipo I para cambiar a las tipo II es incompatible con la producción de porfirina, y solo en presencia de las tipo I se produce porfirina (59,62).

La castración en el hámster dorado macho da como resultado una

significativa reducción en el peso de la glándula de Harder, la desaparición de las células tipo II, la presencia de más gránulos de porfirina (concreciones) en el lumen acinar, así como los niveles de coproporfirina y protoporfirina se elevan considerablemente. (62).

La hipofisectomía provoca cambios en peso de la glándula en un periodo de tres semanas. Sin embargo, la administración de Tiourea o la remoción quirúrgica de la glándula, así como la hipofisectomía causa una considerable disminución en la concentración de porfirinas, mientras que la ceguera bilateral provocó un aumento en el contenido de dichas porfirinas; asimismo, después de la ovariectomía o de la administración de Tiroxina. De esta manera se observó que el peso de la glándula Harderiana está íntimamente relacionado con la actividad funcional de ésta (25-28).

En la rata hembra, la obscuridad continua durante 35 días disminuyen el pigmento de glándula en comparación con ratas expuestas a 12 hrs. de luz por 12 hrs. de obscuridad; este efecto ocurre en ausencia de los ojos y de los ovarios, y sugiere que una parte de los efectos de la luz sobre las porfirinas es directa en relación con la producción de pigmento, la porfirina. (20). La ovariectomía provoca diferentes efectos en la rata y en el hámster hembra (59,81) en una rata de 40 días de nacida, y 8 días después de la ovariectomía los contenidos de porfirina son menores que en animales intactos. En el hámster, los contenidos de porfirina siguen sin cambio durante las tres semanas posteriores a la ovariectomía. La administración de estradiol no altera los niveles de porfirina en ambas especies, rata y hámster. En los hámsters machos la testosterona tiene un efecto inhibitorio en la producción de pigmento por la glándula de Harder; en la rata hembra la administración de testosterona durante 5 días no producen alteración en la producción de porfirinas. Ni la ovariectomía ni los tratamientos con testosterona alteraron el peso de la glándula de las hembras.

La ovariectomía en las ratas hembras adultas también hace que disminuyan los contenidos de porfirina en comparación con los animales intactos o testigos.

Los tratamientos de 5 días de duración con testosterona, progesterona o estradiol a ratas operadas no altera el contenido o las concentraciones dichas porfirinas. La administración de estradiol/progesterona aumenta la concentración del pigmento.

2.2.6.3 ASPECTOS FISIOLÓGICOS.

La glándula de Harder se relaciona fisiológicamente con varios elementos del sistema endócrino y reproductor. En el ojo, dentro de las funciones exócrinas específicas de la glándula de Harder se puede citar que dicha glándula ayuda a la lubricación del párpado por medio de sus secreciones, y que junto con las glándulas tarsales, ayuda a prevenir una sobredescarga de lágrimas (36).

Endócrinamente la glándula de Harder juega un importante papel en la regulación de la producción de melatonina por la glándula pineal, por lo cual se relaciona con las enzimas N-acetil-transferasa (NAT) e Hidroxi-indol-orto-metil-transferasa (HIOMT) en la producción de N-acetil-serotonina y melatonina .

La actividad de la HIOMT en la glándula pineal depende de las condiciones lumínicas, en ratas expuestas a la luz, se inhibe la actividad enzimática, el efecto esta mediado por una vía que incluye retina, núcleo supraquiasmático, supraventricular y paraventricular hipotalámicos, nervios simpáticos, médula cervical superior, glándula Pineal, y de alguna manera glándula de Harder. Los estudios más importantes sobre la fisiología de la glándula se refieren a los efectos que, en condiciones de iluminación controlada, tiene sobre los mecanismos bioquímicos y funcionales del organismo, así como las relaciones que existen entre la glándula de Harder y la glándula pineal.(12,36,55,57,81).

En los últimos años se han acumulado datos fisiológicos y bioquímicos importantes que sugieren que la glándula de Harder actúa como transductor neuroendócrino (que convierte un estímulo físico en una respuesta de tipo químico), que interviene en la regulación de la melatonina en la glándula pineal. Se cree que las Harderoporfirinas intervienen como reguladores de las frecuencias luminosas (80-82). Se sabe, que además de las porfirinas existen otras sustancias que regulan funciones inmunes y fisiológicas de acuerdo a la especie, por ejemplo

la lubricación del globo ocular y su contenido de sales (en el delfín), la regulación de la temperatura (en el gerbo etc), pero las evidencias son muy pocas acerca de como lo hacen (7,8,36,46,55,57,80-82).

Llama la atención que en condiciones de luz continua se conserva el ciclo de variación de la actividad de la HIOMT (hidroxi-indol-O-metil-transferasa) y los niveles de serotonina en la glándula pineal. Estos datos pueden sugerir que la secreción de la glándula de Harder, aumenta por el estímulo lumínico continuo y desempeña una función importante como elemento condicionante en la modificación del ciclo de síntesis de melatonina por la glándula pineal, pero existen otros reportes en los cuales se inhibe la síntesis de porfirinas en luz constante, así queda una interrogante; el saber que regula o modula a pineal; por otro lado, en virtud de que la obscuridad continua produce pocos cambios en el patrón de secreción de la glándula de Harder, se pensaría que en estas condiciones, no hay factor que modifique el patrón original del ciclo de la producción de melatonina previamente establecido (58). Para integrar los hallazgos obtenidos de la glándula de Harder con los datos de la glándula pineal, se toma en cuenta las condiciones de la iluminación ambiental, se postula que en condiciones de luz continua, aumenta la liberación de secreción en la glándula de Harder, la cual se ha demostrado que contiene porfirinas que se liberan por el sistema de conductos secretores de la conjuntiva, a través de la absorción los componentes activos de la secreción que llegarían a la circulación sanguínea y actuarían a nivel de la glándula pineal donde producirían inhibición de la actividad de la enzima HIOMT y posiblemente de la enzima NAT de la serotonina. Esta activación podría ser directa sobre la glándula pineal a través del ganglio cervical superior, o por medio del bloqueo de elementos periféricos productores de catecolaminas, con disminución en la liberación de estas hacia la circulación. (59,62,80-82).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La glándula pineal sintetiza tres grandes grupos de sustancias: los metoxindoles del tipo serotonina-melatonina, péptidos de bajo peso molecular como la argininasotocina, así como proteínas del tipo GIS (sustancias inhibitoras de gonadotrofinas), de estos grupos de sustancias los metoxindoles (serotonina-melatonina) son los más abundantes, así como los más estudiados.

En la glándula pineal, el mecanismo regulador de la síntesis de melatonina esta modulado por la luz a través de un sistema de neurotransducción formado por la retina y vías nerviosas que terminan en la pineal. Este sistema depende de la madurez del individuo para su funcionamiento.

Durante la etapa inicial de desarrollo posnatal en varias especies, incluida la rata, no sabemos con precisión como y cuales son los elementos y/o los estímulos que determinan el patrón cíclico de la síntesis de la melatonina. Existen evidencias de dos sistemas de control: uno humoral y el otro de estimulación neural directa. En el control humoral, se piensa en la glándula de Harder como uno de los reguladores de la pineal, pero no se sabe como lo hace.

En los últimos años, diversos grupos de trabajo apoyan la teoría de que las secreciones de la glándula de Harder serían unas de las responsables de la regulación de la glándula pineal, más no se conoce como lo hace. No se sabe desde cuando se ejerce influencia sobre pineal, puesto que ésta es capaz de mantener un ritmo endógeno en una etapa de desarrollo temprano, aún cuando no ha madurado el sistema retina-pineal.

4. HIPOTESIS:

Dado que la regulación de la función pineal se ejerce en el animal adulto por medio de un complejo neuronal que involucra retina, nervio óptico, núcleo supraquiasmático y el ganglio cervical superior.

Si el tracto, retina-pineal depende de su maduración posnatal para su funcionamiento y es al final dependiente de la luz ambiental para la regulación de la síntesis de melatonina.

Si en las etapas del desarrollo inicial, la pineal es capaz de mantener un ritmo endógeno.

Se ha sugerido que existe un mecanismo humoral de regulación que puede involucrar a la glándula de Harder,

La hipótesis de este trabajo es que las secreciones de la glándula de Harder, son capaces de estimular la síntesis de melatonina, en etapas tempranas del desarrollo de la glándula pineal en la rata.

5. OBJETIVO GENERAL:

Contribuir al conocimiento de los mecanismos de regulación de la función de la glándula pineal, por la glándula de Harder en la rata, durante la fase de proliferación-diferenciación, *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Demostrar que los extractos de la glándula de Harder tienen efecto sobre la concentración de melatonina en pineales mantenidas *in vitro*.
- 2) Descartar la participación β -adrenérgica
- 3) Analizar con detalle la estructura de pineales incubadas con extractos de glándula de Harder.

6. MATERIAL Y METODOS:

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley (*Ratus norvegicus*) hembras de 18 días de gestación, éstas fueron obtenidas de la casa comercial Harlan (Houston, Tx.USA). Se hicieron 2 grupos (I y II), el primero para la obtención de los extractos de la glándula de Harder, el segundo para obtener pineales de 15 días de desarrollo posnatal y retarlas con los extractos obtenidos de las glándulas de Harder.

Estas ratas gestantes se colocaron en jaulas individuales en una habitación sin ventanas, con ritmos de luz-obscuridad de 14:10 horas respectivamente, temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y control de humedad (50%). Las ratas recibieron agua y alimento (chow estandar para roedor) *ad libitum* y fueron observadas día a día hasta la fecha del parto. Al parir las ratas se separaron en los grupos I y II.

Grupo I.- Este se dividió en tres subgrupos: a) animales mantenidos en un ritmo normal de luz (RN); b) animales mantenidos en luz constante (LC); c) animales mantenidos en obscuridad constante (OC). Cada subgrupo se colocó en habitaciones cronobiológicas con estricto control de ingreso. Bajo estas condiciones se mantuvieron en cajas individuales la madre con su camada por 15 días; al final se sacrificaron las camadas para después obtener las 2 glándulas de Harder de cada rata de la región posterior-superior e interna de la cavidad orbitaria. Estas fueron colectadas en forma individual ya sea en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.3-7.4 (10 ml) o en una mezcla de solventes: cloroformo-metanol-ether (2:1:1) 10ml, según fuera el caso.

6.1 OBTENCION DE EXTRACTOS DE GLANDULA DE HARDER.

1. Extractos acuosos:

El peso promedio de las dos glándulas fué de 80 ± 5 mg por animal (rata de 15 días). Estas se colocaron en un tubo de ensayo con 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.3-7.4, y se homogeneizaron en frío (Wheaton-stirrer). El homogeneizado fué centrifugado a 580 g por 30 minutos a

4°C (centrífuga Sorvall), el sobrenadante fué separado e inmediatamente congelado a -70°C. Con este método se trató de obtener sustancias hidrosolubles (proteínas, péptidos etc). El volumen que se obtuvo fue de 250 ml para cada subgrupo (RN, LC, OC), (30 ratas por subgrupo) (diagrama 1).

2. Extractos orgánicos:

Para un peso promedio de 80 ± 5 mg de las dos glándulas por animal se utilizaron 10 ml de una mezcla de solventes a base de cloroformo-metanol-éter (2:1:1). Este se homogenizó en frío (Wheaton-stirrer). El homogeneizado fue centrifugado a 580 g por 30 minutos a 4°C (Sorvall-centrifuge). El sobrenadante se separó, se evaporó y se resuspendió en medio esencial mínimo (MEM-Sigma) e inmediatamente congelado a -70°C. Con este método se trató de obtener lípidos no polares. El volumen que se obtuvo fué de 250 ml de cada subgrupo (RN, LC, OC) (diagrama 1).

6.2 CUANTIFICACION DE NORADRENALINA EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y ORGANICOS DE GLANDULA DE HARDER (diagrama 1).

Para este objetivo se utilizó el estuche comercial: AMICYL-Test™ KATACOMBI. Este ensayo se basa en un radioinmunoanálisis de la casa comercial Gesellschaft für immunchemie und immunobiologie, MBH-IBL, flughafehsts. 52A D-22335 Hamburg, Alemania. El estuche comercial se compone de una placa de extracción por afinidad, estandar de noradrenalina. Reactivos para el radioinmunoanálisis: acilación de noradrenalina; catecol-O-metiltransferasa de hígado de rata; S-adenosil-L-metionina como coenzima; amortiguador Tris-HCL; noradrenalina marcada (^{125}I); antisuero de noradrenalina de conejo; antisuero vs noradrenalina; antisuero para precipitar y testigos normales (para comparar los experimentales).

Este radioinmunoensayo es una reacción enzimática y química para medir derivados de noradrenalina (31).

Se tomaron 5 alícuotas de 1 ml cada una de cada extracto:

- 1.- Extracción de Noradrenalina por afinidad de la muestra biológica
- 2.- Conversión de noradrenalina a normetanefrina por la COMT
- 3.- Transformación a derivados: N-acilnormetanefrina por la S-adenosil-L-metionina como coenzima de la COMT
- 4.- Elaboración de curva estándar de testigos (positivos y negativos)
- 5.- Medición de la actividad de los extractos vs curvas estándar en un contador de centelleo líquido.

Grupo II. Este grupo de ratas con sus camadas se mantuvieron en condiciones normales de luz (14:10) durante 15 días de su desarrollo posnatal, al final de este tiempo, las camadas fueron sacrificadas por decapitación e inmediatamente se realizó la pinealectomía bajo condiciones óptimas de cirugía. Este grupo fue dividido en 2 grandes apartados experimentales:

1) Cuantificación de melatonina en las glándulas pineales y en la mezcla de incubación en ratas de 15 días de desarrollo posnatal incubadas con extractos de glándula de Harder (RN, OC, LC).

2) Estructura y ultraestructura de pineales de ratas de 15 días de desarrollo posnatal incubadas con extractos de glándulas de Harder (RN, LC, OC).

Las pineales fueron colectadas en cajas Falcón de cultivo de tejidos con una proporción de:

- 1) 270 μ l de medio esencial mínimo
- 2) 30 μ l de albúmina al 5%
- 3) 100 μ l de extracto o 10 μ l de isoproterenol (concentración final=1 μ M) por pozo, por pineal

6.3 CUANTIFICACION DE MELATONINA (diagrama 2).

1.- Se cuantificó la melatonina en las glándulas pineales y en las mezclas de incubación (salvo los testigos negativos= medio sin pineal). En este experimento se utilizaron 200 ratas de 15 días de desarrollo posnatal divididas en 4 subgrupos (N=50 cada uno). En 2 subgrupos se cuantificó a las 11:00 horas, con 2 diferentes

tiempos de incubación de 2 y 4 horas con los extractos RN, LC y OC. En los otros 2 subgrupos se cuantificó a las 23:00, también con 2 diferentes tiempos de incubación de 2 y 4 horas con los extractos RN, LC y OC. Los dos tiempos de incubación se realizaron en una estufa de cultivo de tejidos bajo una atmósfera de CO₂-O₂ de 5% y 95% respectivamente (22).

TABLA 1a

CUANTIFICACION DE MELATONINA EN PINEALES Y MEZCLA DE INCUBACION: 11:00 HORAS.

Grupos	Agonista	Medio	RN	LC	OC
Extractos	Orgánico	Orgánico	Orgánico	Orgánico	Orgánico
	Acuoso	Acuoso	Acuoso	Acuoso	Acuoso

Con 2 tiempos de incubación 2 y 4 horas (experimentos independientes).

TABLA 1b

CUANTIFICACION DE MELATONINA EN PINEALES Y MEZCLA DE INCUBACION: 23:00 HORAS.

Grupos	Agonista	Medio	RN	LC	OC
Extractos	Orgánico	Orgánico	Orgánico	Orgánico	Orgánico
	Acuoso	Acuoso	Acuoso	Acuoso	Acuoso

Con 2 tiempos de incubación 2 y 4 horas (experimentos independientes).

PROTOCOLO DE ENSAYO DE MELATONINA POR RADIOINMUNOANALISIS O METODO DE GUILDHAY.

Partimos de la curva estándar de melatonina; se tomaron alícuotas de 20 ng/ml de melatonina estándar almacenadas a -20°C. Una alícuota fué diluida a 1000 pg/ml y se realizaron una serie de diluciones para obtener la curva estándar:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pg/ml	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	1,9
pg/ tubo	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	1,95	0,97	0,48

Reactivos:

- 1) Antisuero antimelatonina de cabra (Stockgrand LTD)
- 2) Melatonina marcada con tritio ³H
- 3) amortiguador de tricina-azida de sodio
- 4) carbón activado+ dextrans
- 5) Liquido de centelleo (liquiscint brant).

Se tomó la pineal y 50 μ l de la mezcla de incubación a la cual se le agregó 50 μ l de amortiguador tricina-azida de sodio, esto fué homogenizado en frío en un tubo eppendorf; del homogenizado se tomaron 5 μ l y se le agregaron 550 μ l del amortiguador y se dividió en dos muestras de 250 μ l (siempre se hizo por duplicado).

PROTOCOLO GENERAL

GRUPOS	Tubo No	Buffer	Muestra/St	Tritio	Antisuero
Totales	1-3	850	-----	100	-----
Blancos	4-6	350	-----	100	-----
U. Máxima	7-9	250	-----	100	100
Curva St.	10-29	-----	250	100	100
Muestras	30- ?	-----	250	100	100

El volumen máximo por vial, aceptable con este método no debe ser mayor a 450 μ l sin carbón activado.

Después de hacer la mezcla, se agitó vigorosamente (Vortex) y se incubó toda la noche a 4°C.

Durante el segundo día de experimentación a todos los tubos se les agregó 0.5 ml de la mezcla carbón activado-dextrán, se agitó vigorosamente (vortex) y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 3000 g por 15 minutos, se tomaron 750 μ l del sobrenadante y se les agregó líquido de centelleo (7.5 ml), se agitó y se contó en un detector beta (contador de centelleo líquido-Beckman) durante 10 minutos.

6.4 ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA (diagrama 2).

2.- Después de las incubaciones con los distintos extractos y a los distintos tiempos, las glándulas pineales fueron fijadas por inmersión en una solución de glutaraldehído al 2.5% amortiguado en solución de fosfatos 0.1M, pH 7.3-7.4 durante 15 minutos, posteriormente se lavaron con la misma solución amortiguadora (tres cambios rápidos) y se posfijaron en tetraóxido de osmio al 1% amortiguado en cacodilatos durante 20 minutos. Las glándulas se lavaron en amortiguador de fosfatos 0.1M (x3) y fueron deshidratadas en soluciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90% y absoluto), para después hacer dos cambios de óxido de propileno y se dejaron en una mezcla de óxido de propileno-Poly/bed (resina Epoxy) 1:1 de 14 a 16 horas a 4°C. La inclusión se hizo en moldes de plástico con resina Poly/bed a 60°C por 24 horas.

Los bloques obtenidos fueron separados del molde de plástico y fueron cortados en un ultramicrotomo Reichter OMU-3. De estos bloques se obtuvieron cortes semifinos que fueron teñidos con azul de toluidina y fueron analizados en un microscopio Olympus provisto de un sistema de análisis de imágenes. De estos cortes se midió en cada grupo (RN, LC y OC): celularidad y número de pinealocitos, tanto en corteza como en médula así como índice mitótico. De estos

cortes se escogieron las areas para hacer cortes finos y montarlos en rejillas de cobre previamente recubiertas con formvar. Los cortes fueron contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo y fueron observados, analizados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-1200EX.

Tres pineales por grupo se procesaron bajo el método de Anderson basado en una fijación previa con glutaraldehído al 2% amortiguado en fosfatos 0.1M y desecadas con CO₂ (punto crítico), las pineales fueron colocadas en soportes de aluminio y cubiertas con oro. Estas se observaron, analizaron y fotografiaron en un microscopio de barrido JEOL-840A (2).

TABLA 2a

ANALISIS ESTRUCTURAL Y ULTRAESTRUCTURAL DE GLANDULAS PINEALES INCUBADAS CON EXTRACTOS DE GLANDULAS DE HARDER (11:00 y 23:00 h)

Testigo	Ritmo normal	Luz constante	Obscuridad constante
—	Orgánico	Orgánico	Orgánico
Grupos			
—	Acuoso	Acuoso	Acuoso

Al grupo testigo no se le administró ningún extracto.

N=5 ratas por grupo.

TABLA 2b

ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE GLANDULAS PINEALES INCUBADAS CON EXTRACTOS DE GLANDULAS DE HARDER (11:00 y 23:00 h)

Testigo	Ritmo normal	Luz constante	Obscuridad constante
—	Orgánico	Orgánico	Orgánico
Grupos			
—	Acuoso	Acuoso	Acuoso

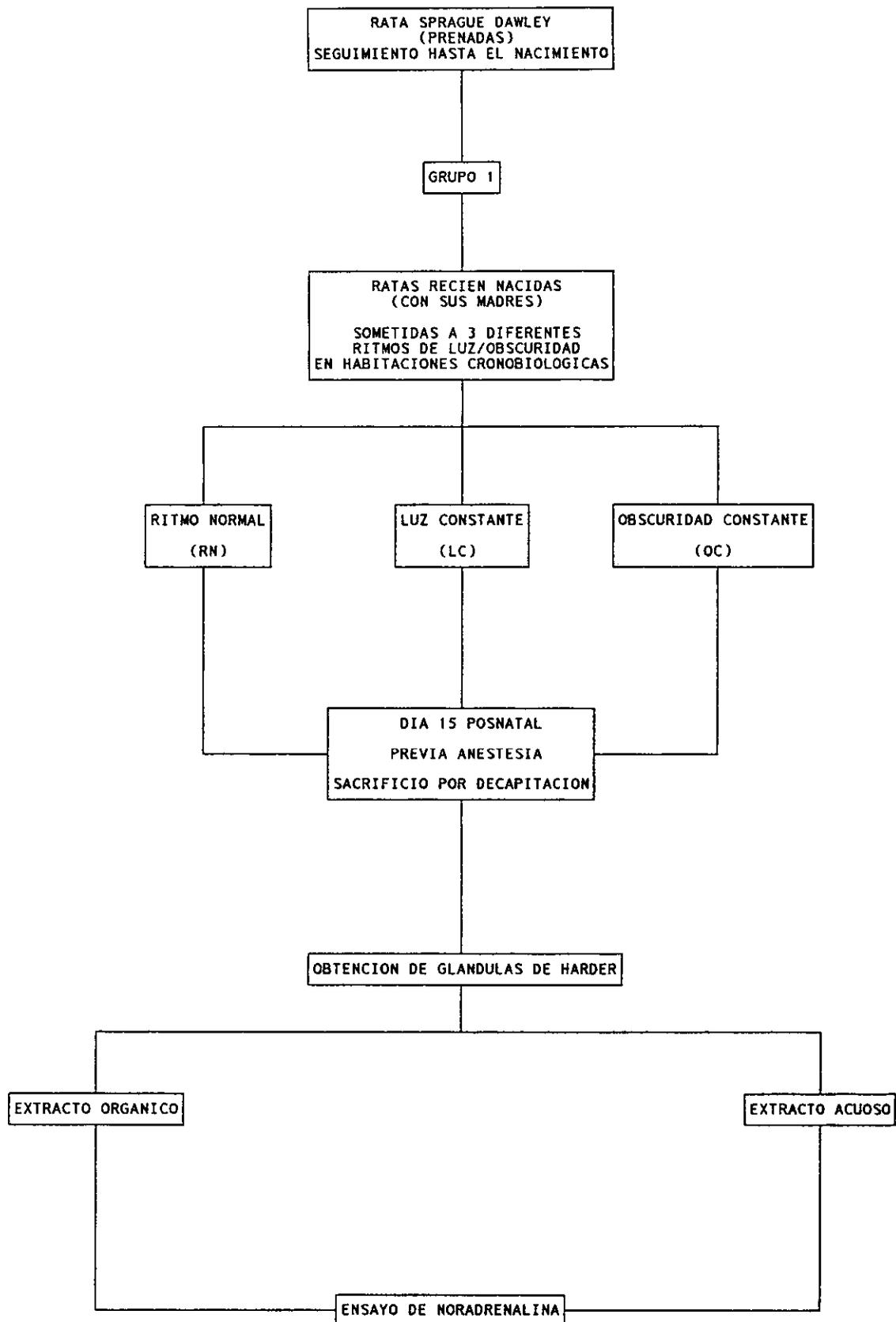
A el grupo testigo no se le administró ningún extracto

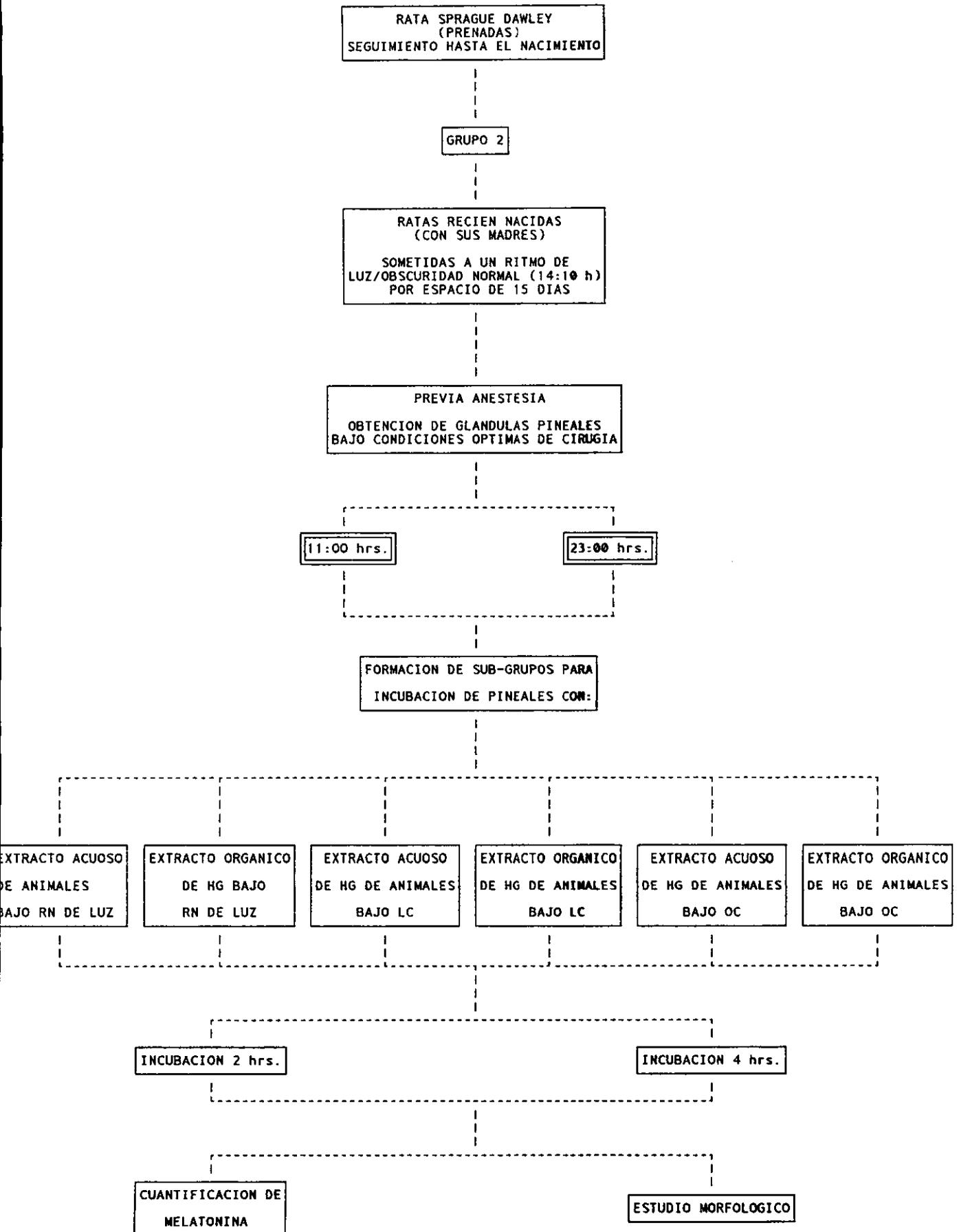
N= 3 ratas por grupo.

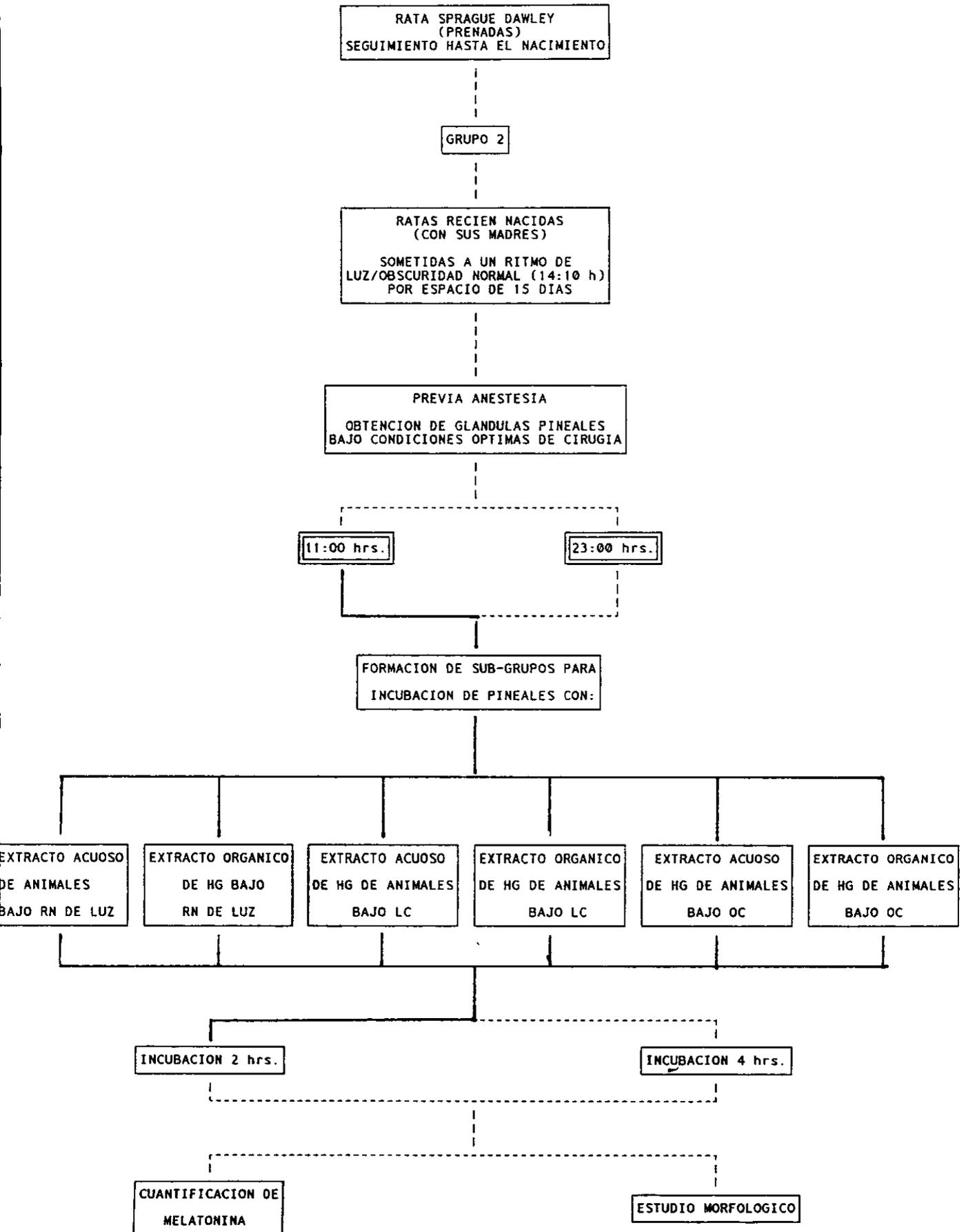
6.5 ANALISIS ESTADISTICO

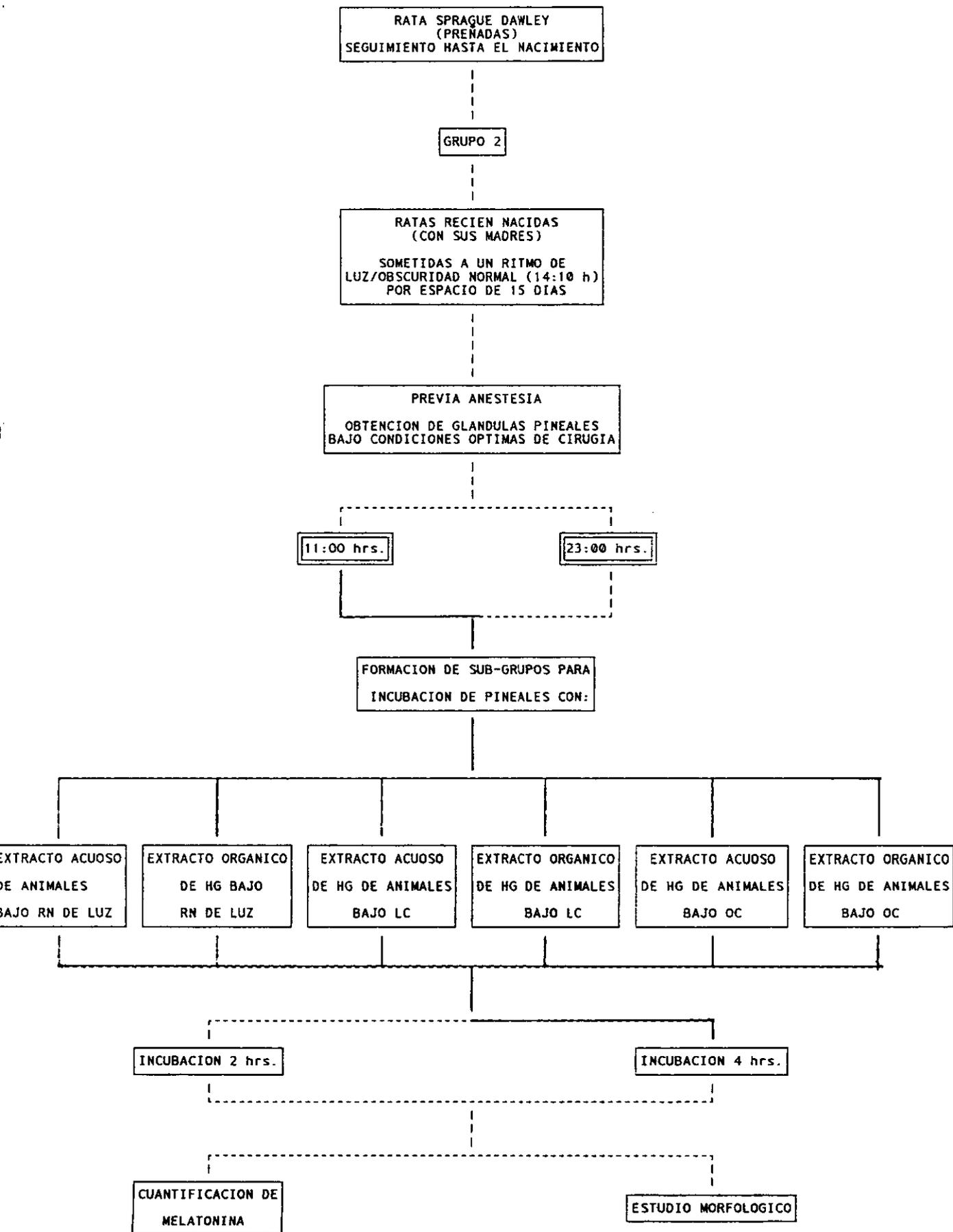
Para los datos bioquímicos se utilizó el programa QuatroPro, así como el Sigma-Stat, con ésto se obtuvo la estadística descriptiva, análisis de varianza seguida de la Student-Newman-Keuls, t-test. El nivel de aceptación significativa fue cuando $P < 0.05$.

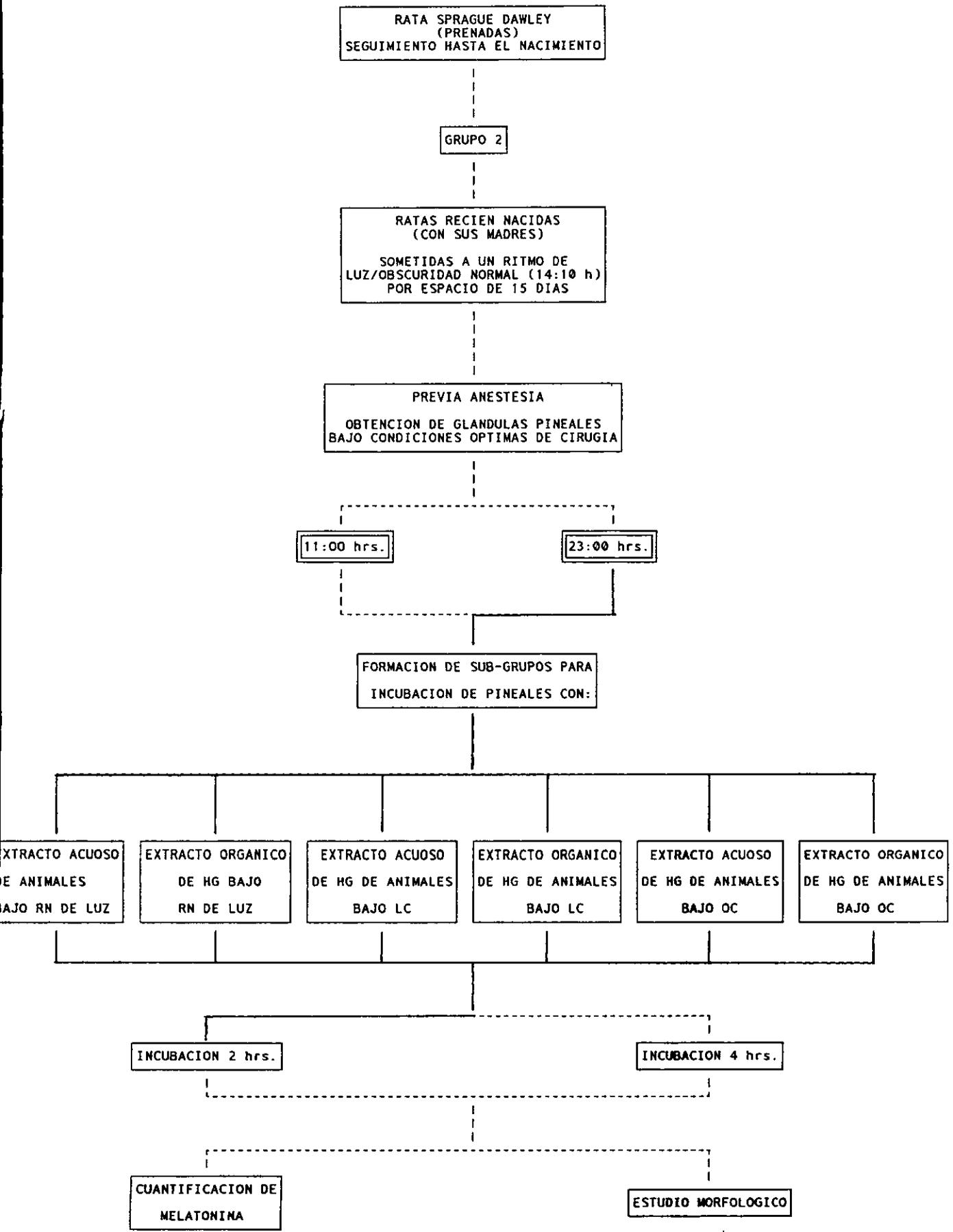
En los estudios estructurales y ultraestructurales el análisis se realizó tanto en la laminilla como en la rejilla con un sistema de análisis de imágenes incorporado a los microscopios, así como un paquete de informática-estadística descriptiva. En estos experimentos se utilizó: análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba Student-Newman-Keuls,t-test. El nivel de aceptación significativa fue cuando $P < 0.05$

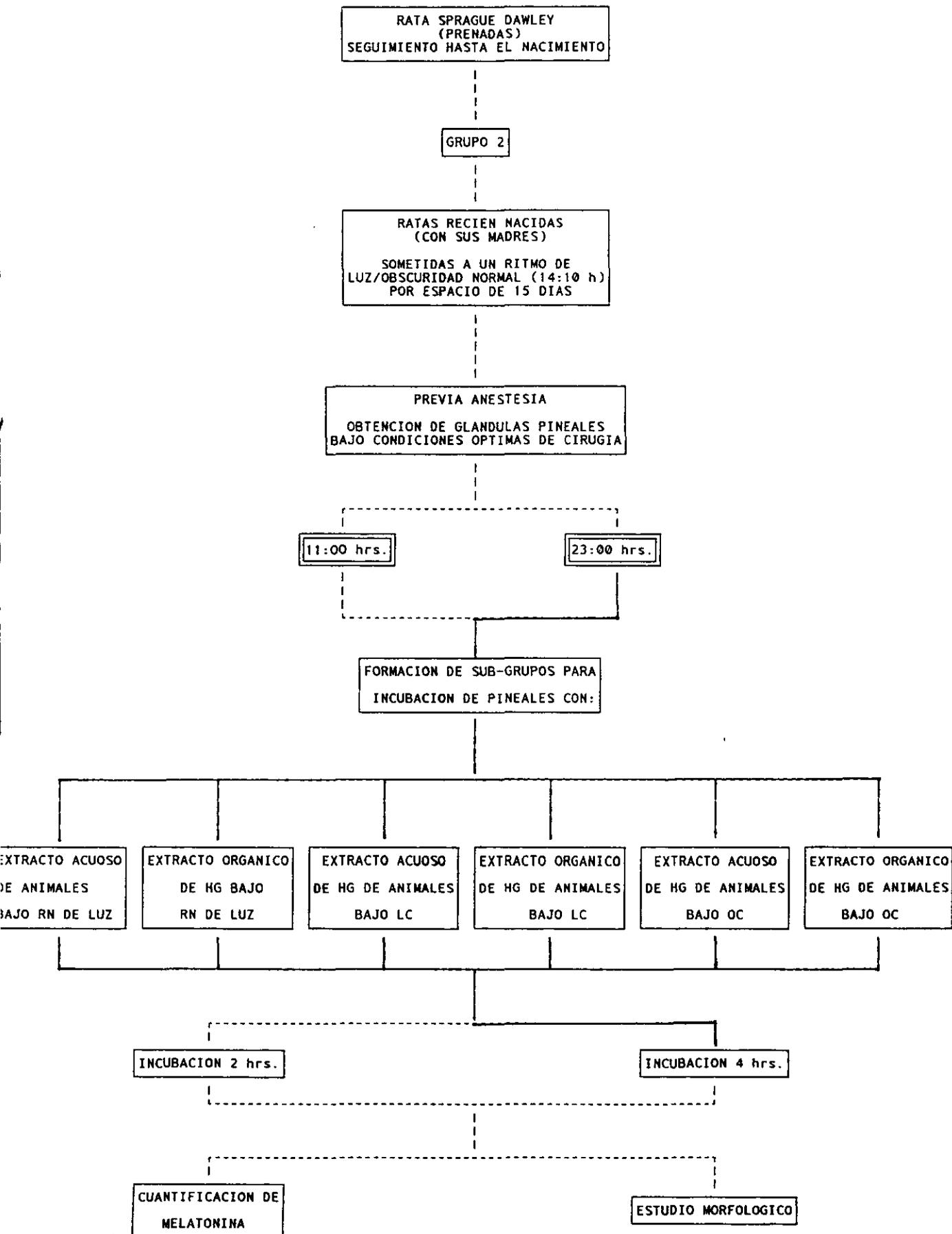












7. RESULTADOS

CUANTIFICACION DE NORADRENALINA EN EXTRACTOS OBTENIDOS DE GLANDULAS DE HARDER BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ.

El único grupo que mostró la presencia de noradrenalina fué el extracto acuoso obtenido bajo condiciones de ritmo de luz normal ($10.92 \pm 2.8 \mu\text{g/ml}$). En los demás grupos, uno de ellos (luz constante-extracto acuoso:LC-Ac) mostró la presencia de noradrenalina solo en una alícuota de 5 ensayadas (Fig 4).

CUANTIFICACION DE MELATONINA EN PINEALES DE RATAS DE 15 DIAS DE DESARROLLO POSNATAL INCUBADAS CON EXTRACTOS DE GLANDULAS DE HARDER (RN-OC-LC).

Grupo No 1 Concentración de melatonina medida a las 11:00 horas con 2 horas de incubación (diagrama 2a).

El testigo negativo (medio de cultivo sin pineal) mostró la cantidad de melatonina menor observada en todos los grupos ($0.53 \pm 0.24 \text{ pg/ml}$). Por otra parte el testigo positivo (pineales incubadas con un agonista β adrenérgico) fué el que mostró la concentración mayor de melatonina en este experimento ($15.38 \pm 0.25 \text{ pg/ml}$). Cuando comparamos la concentración de melatonina en pineales retadas con los distintos extractos (acuosos y orgánicos), el grupo que fué incubado con el extracto orgánico obtenido bajo ritmo normal mostró la mayor concentración de melatonina ($8.73 \pm 0.13 \text{ pg/ml}$), seguida del grupo incubado con el extracto orgánico obtenido bajo obscuridad constante ($7.84 \pm 0.21 \text{ pg/ml}$). Los niveles más bajos de melatonina se apreciaron en los grupos tratados con extractos acuosos (3.76 ± 0.37 ; 0.66 ± 0.32 ; $1.75 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$) en especial los obtenidos bajo luz constante (Fig 5a).

Grupo No 2 Concentración de melatonina medida a las 11:00 horas con 4 horas de incubación (diagrama 2b).

La respuesta del testigo negativo (medio sin pineal) así como la del testigo positivo (agonista) fué similar a la del experimento anterior. Solo se observó un aumento en la concentración de melatonina en el grupo de obscuridad constante,

en especial con el extracto acuoso; este incremento fué leve, por lo demás la respuesta fué similar al experimento anterior (fig 5b).

Grupo No 3 Concentración de melatonina medida a las 23:00 horas con 2 horas de incubación (diagrama 2c).

El testigo positivo (agonista) mostró la concentración mayor de melatonina (15.38 ± 0.25 pg/ml) y la menor fué la observada en el testigo negativo (medio de incubación sin pineal). Al comparar los distintos grupos, estos mostraron concentraciones similares de melatonina que la de los experimentos realizados a las 11:00 horas. La diferencia entre ellos se observó en el grupo de ritmo normal-extracto acuoso con una mayor concentración (4.2 ± 0.8 pg/ml), este incremento fue de un 100 % (fig 6a).

Grupo No 4 concentración de melatonina medida a las 23:00 con 4 horas de incubación (diagrama 2d).

Las modificaciones observadas fueron mínimas, ya que la concentración de melatonina en cada experimento fueron similares a las anteriores. Nuevamente, la diferencia se observó en el grupo mantenido en ritmo normal e incubado con extracto acuoso, esta fué de décimas de pg (comparada con el mismo grupo, con 2 horas de incubación), (fig 6b).

MORFOLOGIA GENERAL

(SOMATOMETRIA)

El peso somático de la rata fué de 30 ± 5 g (fig 7a). El peso de la glándula pineal fué de 1.2 ± 0.2 g durante el día y en la noche este fué de 1.5 ± 0.2 g; este fué regular durante todo el estudio (fig 7b).

El peso de las glándulas de Harder mostró diferencias significativas: Animales testigo sometidos a un ciclo de luz normal (RN)= 10/14 luz:oscuridad = 0.040 ± 0.002 mg; animales sometidos a luz continua (LC) = 0.028 ± 0.002 mg; Animales sometidos a oscuridad continua (OC) = 0.033 ± 0.002 mg. Los pesos

corporales correspondientes fueron: RN = 30 ± 0.4 g; LC = 25 ± 0.3 g y OC 27 ± 0.3 g (fig 8).

El complejo pineal fue observado íntegro, básicamente este comprende tres partes: a) *lamina intercalaris* o pineal profunda (LI); b) tallo pineal (TP) y órgano pineal (P). El 90 por ciento de las pineales utilizadas en este estudio mostraron una estructura macroscópica que corresponde al tipo I según la clasificación más utilizada, en donde I= complejo pineal formado por LI, TP y P comunicados en forma continua por parénquima; II= complejo pineal formado por LI, TP y P también comunicados pero no existe parénquima en el TP; III= complejo pineal formado solo por LI y P, en estos complejos no existe continuidad.

En este trabajo solamente se estudió el órgano pineal o pineal superficial (fig 13a). La cantidad de tejido conectivo determinó la estructura interna de la pineal. En la rata de 15 días posnatales se pudo observar las dos partes fundamentales de su estructura interna: la corteza y la médula (fig 13b y c). La glándula pineal es un órgano primordialmente celular, en la corteza las células se encuentran densamente empacadas y junto con el tejido conectivo y los vasos se forma una capa continua a manera de cinta, cuyo espesor es irregular (50 a 100 μ). Si bien se pudo observar mas de 6 tipos distintos de células (pericitos, mastocitos, células plasmáticas, linfocitos, células musculares) nos ocupamos sólo de los pinealocitos y células gliales ya que estos representan más del 90 %.

MICROSCOPIA OPTICA

Descripción histológica: corteza. Esta se observó en forma continua a manera de una cinta clara alrededor de toda la glándula tanto en cortes longitudinales como coronales. Las células densamente empacadas permitieron ver grandes núcleos con poca cromatina así como un nucléolo central. El citoplasma se observó como una delgada. En pocas células, se pudo observar prolongaciones citoplásmicas. En la parte más superficial, las células presentaron un arreglo paralelo de una a cuatro células de espesor, mientras que en la profundidad de la corteza, este arreglo se perdía. El borde limitante entre la corteza

y la médula estuvo muy bien definido. Se pudieron distinguir dos tipos de células unas claras (pinealocitos) y otras oscuras (células gliales), en esta zona predominaron los pinealocitos (célula clara) en una proporción de 5:1 con las células gliales. La célula clara se encontró en forma difusa mientras que la oscura se observó por lo general alrededor de los vasos. El tejido conectivo se observó como zonas claras o espacios vacíos. Por otra parte la cantidad de vasos sanguíneos fué mayor en la parte más superficial de la corteza de la glándula pineal. El parénquima pineal (médula), presentó la típica apariencia en cordones con amplios espacios claros en su alrededor. Se observaron los dos tipos predominantes de células: claras y oscuras con una proporción de 4:1 (respectivamente) y con la misma distribución que en la corteza. Los pinealocitos tendieron a agruparse mientras que las células gliales se mantuvieron asociadas a los vasos sanguíneos o bien dispersas entre los cordones de pinealocitos, en el tejido conectivo. Los pinealocitos presentaron un núcleo redondo y grande con uno o más nucléolos, por lo general excéntricos; el citoplasma, finamente granular mostró una o más prolongaciones las que terminaron cerca de otro pinealocito o en la cercanía de un vaso sanguíneo. Las células gliales, presentaron un núcleo alargado, muchas veces rectangular o fusiforme en el que se observó una delicada red de cromatina con grumos dispersos; el nucleoplasma, finamente granular pocas veces mostró la presencia del nucléolo. El citoplasma, más denso y grumoso presentó pocas prolongaciones.

La estructura histológica mostró diferencias en las pineales de ratas incubadas con extractos orgánicos de los animales mantenidos bajo un ritmo normal de luz:oscuridad (RN), así como en los de oscuridad constante (OC). Si bien el patrón general de la glándula no mostró diferencias, tampoco observamos alteraciones en cuanto al número de células o del índice mitótico. Las diferencias se presentaron, como un mayor número de células con alto contenido de vesículas claras, tanto en la corteza, como en la médula (especialmente esta última), tanto en los experimentos de 2, como de 4 horas de incubación (estos grupos no

mostraron diferencias entre ellos). En lo que corresponde a la hora de incubación, se encontró un ligero aumento de pinealocitos, con vesículas claras a las 23:00 horas de incubación con respecto de los grupos experimentales de las 11:00 horas (Fig. 9a y b).

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

La glándula pineal presentó a esta edad del desarrollo (15 días posnatales), una estructura dividida en dos zonas perfectamente delimitadas: corteza y médula, sí bien en otros mamíferos existe controversia de la existencia de estas dos zonas, en la rata no existe punto de discusión. La corteza mostró una profundidad que osciló entre 50 y 100 μ . Su organización mostró en la parte más superficial una delgada capa de tejido conectivo que penetró al interior para formar una delicada trama, en ésta se observaron los vasos sanguíneos fenestrados y con células gliales en su alrededor. Las células densamente empacadas fueron de dos tipos predominantemente: pinealocitos y células gliales (fig 10a) (>90%). En algunas partes se observaron grupos celulares, primordialmente gliales, en un arreglo paralelo. Los pinealocitos mostraron una distribución homogénea, éstos se agruparon entre sí o con otros elementos celulares y las células gliales se asociaron a vasos sanguíneos (fig 12b, 12c y 11c). La médula pineal mostró su típica apariencia acordonada.

GRUPO TESTIGO, O PINEALES INCUBADAS SOLO EN MEDIO DE CULTIVO (11:00 Y 23:00 h).

Si bien existen en la literatura estudios que describen a la glándula pineal a los 15 días de desarrollo posnatal en la rata (Calvo y Boya, 1983), estos sólo describen las generalidades. Por lo tanto en el siguiente apartado se definirá la estructura del pinealocito y después se comparará con la de aquellos incubados con los distintos extractos de glándulas de Harder.

El pinealocito estuvo distribuido, tanto en la corteza, como en la médula; su forma de asociación (corteza) fué en agregados de distinto espesor (5 a 20 células). En la médula, se asoció a otros elementos celulares o entre sí e

íntimamente relacionados con especializaciones de membrana y recubiertos de tejido conectivo para formar cordones irregulares. Estos dejaron amplios espacios en los que se observó elementos gliales y vasos sanguíneos. Una de las características más regulares de los pinealocitos fué la presencia de vesículas claras con grumos densos en su interior, descritas en la mayoría de mamíferos. La célula glial también mostró vesículas claras, pero sin grumos electrodensos en su interior y en menor cantidad.

Los pinealocitos fueron de forma irregular con un número variable de prolongaciones citoplásmicas, las cuales terminaron en expansiones citoplásmicas. Se pudieron diferenciar dos poblaciones, unas con núcleo de contorno regular y otra con núcleos indentados, de éstos a su vez se observaron formas transicionales, las cuales se manifestaron con distinta densidad a los electrones.

El núcleo fué oval o irregular con un número variable de invaginaciones citoplásmicas. El nucleoplasma fué claro con finos grumos de diámetro variable en él se observó un nucléolo excéntrico (fig 10c).

El retículo endoplásmico rugoso fué un componente constante de los pinealocitos y generalmente se encontró en un porcentaje moderado. Consistió en cisternas únicas o múltiples, las cuales variaron en número; por lo general, se observaron en la cercanía del núcleo, en forma de agregados de más de 2 cisternas (fig 10b). En cambio las cisternas únicas, fué común verlas en la periferia celular o en sus prolongaciones. La asociación con vesículas de distintos tamaños fué común, así como con gránulos electrodensos o finamente granulares (fig 10d).

El retículo endoplásmico liso consistió en cisternas largas y vesiculadas, cuya cantidad varió de acuerdo a su localización. Lo más común fué observar cisternas únicas asociadas a vesículas claras en la cercanía del núcleo, en sus prolongaciones citoplasmáticas o en sus terminales.

El aparato de Golgi se observó bien desarrollado y consistió en una asociación de cisternas con una gran cantidad de vesículas de diámetro variable; la mayoría de ellas fueron claras y presentaban uno o más grumos densos al haz

de los electrones. Estos complejos (Golgi-vesículas) se observaron en las prolongaciones celulares. La mayoría de las vesículas con grumos mostraron un halo claro y algunas presentaron más de un grumo, éstos de distintos tamaños y distinta densidad (fig 12c).

Una gran cantidad de mitocondrias fueron observadas en el pinealocito; de distintas formas y tamaños (predominaron las redondas) éstas mostraron, en algunos pinealocitos, arreglos cristalinos (fig 10c).

Las poblaciones de lisosomas se agruparon en distintas regiones del pinealocito. En la cercanía del aparato de Golgi se observaron aquellos que contenían material granular y en la periferia, así como en las prolongaciones, se observaron aquellos que poseían material amorfo y electrodensos en su interior. Su número varió de célula a célula.

Otras estructuras comunes observadas en el pinealocito de 15 días de desarrollo posnatal fueron:

Cintas sinápticas: estas estructuras se observaron en forma constante en todos los pinealocitos y consistieron de una parte electrodensa que adoptó distintas formas; bastones, esferas, láminas y anillos rodeados de vesículas claras (tabla 1 y 2).

En el pinealocito fué común observar microfilamentos, microtúbulos, cuerpos multivesiculares y diversas formas de inclusiones citoplásmicas. Por último, se observaron especializaciones de membrana, tales como uniones estrechas, desmosomas, hemidesmosomas y terminales nerviosas. Otro de los hallazgos frecuentes fueron células apoptóticas.

Las diferencias encontradas entre las pineales de las 11:00 vs 23:00 horas fueron: una mayor concentración de retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y vesículas claras y en especial cintas sinápticas en el grupo de las 23:00 horas (tabla 1 y 2).

PINEALES INCUBADAS CON EXTRACTOS DE GLANDULAS DE HARDER:
RITMO NORMAL (11:00 Y 23:00 h).

EXTRACTO ORGANICO.

No se modificó el número de células ni su relación. En sus organelos se observó una mayor cantidad de nucléolos, una mayor concentración de retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi con vesículas claras, así como cintas sinápticas en especial a las 23:00 h., (fig 10a-d, tabla 1 y 2).

EXTRACTO ACUOSO.

No se observó ninguna modificación con respecto a los testigos sin tratamiento (fig 10e-h, tabla 1 y 2).

PINEALES INCUBADAS CON EXTRACTOS DE GLANDULAS DE HARDER:
LUZ CONTINUA (11:00 Y 23:00 h, tabla 1 y 2).

EXTRACTO ORGANICO.

No se modificó el número de células o su relación. En sus organelos se observó una menor concentración de vesículas y cintas sinápticas particularmente a las 23:00 h., (fig 11a-b, tabla 1 y 2)

EXTRACTO ACUOSO.

No se observó ninguna modificación con respecto a los testigos sin tratamiento (fig 11c-d, tabla 1 y 2).

PINEALES INCUBADAS CON EXTRACTOS DE GLANDULAS DE HARDER:
OBSCURIDAD CONTINUA (11:00 Y 23:00 h).

EXTRACTO ORGANICO.

No se modificó el número de células o su relación. En sus organelos sólo se observó un ligero aumento de vesículas y cintas sinápticas, grupo de las 23:00h., (fig 12a-d, tabla 1 y 2).

EXTRACTO ACUOSO.

No se observó ninguna alteración con respecto a los testigos (fig. 12e-f, tabla 1 y 2).

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO:

Con esta metodología se corroboró la presencia de dos zonas bien delimitadas: corteza y médula así como su organización en agregados (corteza) y en cordones (médula). No se observó diferencia alguna con las distintas incubaciones de extractos así como con sus tiempos, en las superficies analizadas (fig 13a-c)

8. DISCUSION.

En este estudio comprobamos en pineales de rata de 15 días de desarrollo posnatal (*in vitro*), que los extractos de la glándula de Harder obtenidos en distintas condiciones de luz fueron capaces de estimular la síntesis de melatonina, en especial los orgánicos obtenidos bajo un ritmo normal RN. Así como de modificar la estructura subcelular, en particular aquella relacionada con la síntesis de proteínas.

En primera instancia se comprobó en la glándula pineal la existencia de dos zonas perfectamente delimitadas ya que para algunos autores se pone en tela de juicio (4) la corteza y la médula. Segundo definimos la estructura de la glándula pineal a los 15 días de desarrollo posnatal, tanto desde un punto de vista estructural como ultraestructural. Existen trabajos anteriores que hablan de esta edad, más sólo reportan generalidades como forma, tamaño y algunas diferencias del núcleo y organelos, más no definen cada uno en lo particular (2,4,10,31,33).

El peso de los animales expuestos a diferentes ritmos mostraron lo reportado por muchos autores (59,66): como el animal expuesto a LC, su peso somático así como sus glándulas de Harder son significativamente menores, comparativamente contra el testigo RN. Esto puede explicarse por el estrés al que se somete al animal; por la disminución en su ingesta y por último a los trastornos endócrinos que se derivan al modificar sus ritmos circadianos: llamémosles síntesis de melatonina y esteroides (entre otros).

Los pesos de las pineales a las 11:00 y a las 23:00 horas no mostraron ninguna modificación significativa, sólo una tendencia mayor en los grupos de las 23:00.

En este estudio sólo tratamos 2 tipos de células: pinealocitos y células gliales ya que juntas significan alrededor del 90% de todas las células de la glándula pineal. Asimismo creemos en la existencia de un sólo pinealocito y que las distintas clasificaciones que reportan algunos autores (2,4,10,32,33,39) claros

y oscuros o I y II, no son otra cosa que la misma célula vista en distintos momentos metabólicos, y de ritmo cronobiológico. Para comprobar esto, estamos trabajando en un experimento que relacione células y proteínas marcadoras de estirpes celulares específicas en función de desarrollo posnatal y a distintas horas del día.

Los pinealocitos en este estudio mostraron su típica estructura celular con prolongaciones citoplásmicas, núcleo oval o indentado, vesículas claras con núcleo denso y cintas sinápticas.

A nivel de microscopía óptica se pudo detectar en las pineales incubadas con extractos orgánicos bajo RN y OC un aumento en la concentración de vesículas claras tanto en corteza como en médula, ésto nos habla de una mayor síntesis no sólo de melatonina.

Ultraestructuralmente en los pinealocitos de las glándulas incubadas con extractos orgánicos bajo RN y OC observamos un aumento en el número de nucléolos, una mayor concentración de retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y sobre todo vesículas con núcleo denso y cintas sinápticas (fig 17a-d). El aumento de nucléolos y del retículo endoplásmico rugoso se relaciona directamente con la síntesis de proteínas; el aumento de Golgi y vesículas nos habla de lípidos y carbohidratos complejos; las cintas sinápticas se relaciona con β -receptores. En suma, no es nada fácil explicar los eventos observados, claro está que uno de ellos (para nosotros por el momento el más importante) es el aumento en la síntesis de melatonina, pero, no es lo único que sintetiza pineal, recordemos que también sintetiza: péptidos tipo GIS (sustancias inhibitoras de las gonadotrofinas) y moléculas tipo arginina vasotocina, que de momento permanecen como una de las grandes interrogantes de la función de la glándula pineal.

Otra correlación es la relación Harderoporfirinas-melatonina en la regulación de receptores benzodiazepínicos, NMDA y por otro lado la modulación de actividades inmunes vía segundos mensajeros (proteínas G, óxido nítrico etc).

Por otra parte quiero tratar de explicar el porqué hacer los experimentos a

las 11:00 y a las 23:00 horas. Esto está en base a que la glándula pineal, para los 15 días de desarrollo se comienza a establecer un ciclo circadiano inversamente proporcional al de serotonina vs melatonina, con niveles altos de serotonina y bajos de melatonina durante el día y bajos de serotonina y altos de melatonina por la noche (66,76), en este estudio no intentamos estudiar los ritmos de melatonina. El uso de dos tiempos de incubación (2 y 4 horas) le dá al sistema *in vitro* el tiempo necesario para expresarse. En cada experimento se utilizó un testigo positivo que fué un agonista β -adrenérgico (el isoproterenol), ésto en base a que la glándula pineal es estimulada por fibras nerviosas noradrenérgicas en un 90% (*in vivo*). Como testigo negativo se usó el medio de cultivo sin pineal el cual mostró en todos los experimentos la más baja concentración de melatonina; esto puede explicarse debido ala interferencia de algunos compuestos cíclicos y el anticuerpo vs melatonina el cual es policlonal.

El efecto que se observó con los dos extractos (acuoso y orgánico), fué que el extracto orgánico obtenido de glándulas de Harder bajo un RN y en OC fueron capaces de estimular la síntesis de melatonina en forma significativa. En todos los experimentos, el patrón de respuesta fué similar y sí bien, también observamos concentraciones de melatonina superiores al testigo negativo con los extractos acuosos, ésto en parte, puede ser explicado por la presencia de noradrenalina en esos extractos. Este experimento se realizó con base en tratar de descartar una respuesta noradrenérgica en los extractos.

Podemos pensar que los extractos orgánicos poseen algún compuesto que estimula la glándula pineal y éste o éstos pueden ser porfirinas. Falta detectar la concentración de estos compuestos en los extractos orgánicos y hacer un análisis sistemático de los compuestos que se encuentren en estos extractos.

Los hallazgos estructurales y ultraestructurales coinciden con los resultados bioquímicos.

En la glándula pineal se han descrito 4 etapas de desarrollo:

- a) génesis
- b) proliferación
- c) diferenciación
- d) maduración

En nuestro laboratorio consideramos pertinente agregar en la etapa de diferenciación, una de apoptosis así mismo, agregamos una más después de la de maduración; la de envejecimiento, ya que sí bien algunos autores consideran en la glándula pineal fenómenos regresivos, nosotros pensamos más bien en fenómenos de envejecimiento propios de esta glándula. Por lo tanto proponemos el siguiente esquema:

- a) génesis
- b) proliferación
- c) diferenciación-apoptosis
- d) maduración
- e) envejecimiento

La etapa de génesis se inicia y termina durante la segunda semana de la vida embrionaria. En esta etapa aparece como una evaginación del diencéfalo dorsal procedente del ectodermo. Durante esta etapa las células se disponen en forma de cordones que se agrupan en dos lóbulos éstos finalmente se unen para ser imperceptible una línea de demarcación (4). La etapa de proliferación abarca la última fase del desarrollo "in-útero" de la rata, así como una segunda etapa durante los días 3 al 5 posnatales en donde fué común observar mitosis tanto en corteza como en médula. En la etapa de diferenciación-apoptosis, las células empiezan a mostrar claras muestras de diferenciación desde los 5 días del desarrollo, hasta los 20-25 días posnatales. La mayoría de autores definen esta etapa a partir del día 15 del desarrollo (15), y a pesar de que encontramos pinealocitos desde los 5 días posnatales, sabemos que sus sistemas enzimáticos (NAT y HIOMT) no son todavía maduros para sintetizar melatonina. Esto lo

fundamentamos en base a la cuantificación de melatonina y a la actividad de la NAT en ratas de 3, 7 y 10 días de edad que realizamos y que nos permitió establecer el día 15 como fecha clave para estos experimentos.

La diferenciación celular no debe verse como un evento puramente morfológico o bioquímico, recordemos que la estructura celular no es otra cosa que la expresión de un orden molecular y submolecular.

La diferenciación del pinealocito hoy debe contemplarse íntimamente asociada al proceso de apoptosis, ya que más de un 30% de los pinealocitos ese será su destino (estudios en proceso, del día 0 al 90 posnatales)(4).

La etapa de maduración de la rata abarca del día 60 al 90 en la cual se observa un crecimiento exponencial de la arenilla pineal (concreciones) y donde los organelos mantienen una distribución y un numero constante, y la glándula presenta una estructura estable.

La etapa de envejecimiento se observa a partir de los 120 días de desarrollo posnatal. A esta edad La glándula presenta un menor numero de células, un aumento de tejido conectivo y una disminución y diferente distribución de organelos. Esto coincide con el inicio en la aparición de bajos niveles de melatonina (menor actividad de NAT y HIOMT) en sangre durante el ciclo y coincidentemente la aparición de enfermedades degenerativas (66).

La pineal de rata es un buen modelo de estudio, puesto que en otras especies las tres primeras etapas de su desarrollo ocurren durante la etapa embrionaria-fetal; no así en rata ya que como mencionamos, sólo una (génesis) y parte de otra (proliferación inicial) ocurren antes del nacimiento.

Las dos primeras semanas son muy importantes en el establecimiento de los ritmos de síntesis serotonina-melatonina (64-66). Durante la primera semana, la rata no muestra un ritmo definido y no es hasta que las enzimas NAT y HIOMT maduran en especial NAT, lo cual ocurre después del día 13 posnatal. Así que la pineal, requiere de uno o más reguladores que sincronicen a ésta con el reloj maestro (núcleo supraquiasmático) y con otras regiones del hipotálamo. Sabemos

por otra parte que las glándulas tiroideas (hormonas T_3 y T_4), suprarrenales (esteroides) y el timo (péptidos y hormonas) son importantes en esta etapa (diferenciación-apoptosis), ya que entre estos sistemas (endócrino-inmune-nervioso), se establecerán asas de control y su efecto será sistémico (6,7,15).

Pero lo que no sabemos con precisión durante la segunda etapa de proliferación, así como en el inicio de la diferenciación-apoptosis; cómo se establecen estas vías.

El estudio del desarrollo de ritmos biológicos no es nada fácil puesto que *in vivo* tratamos fenómenos multifactoriales (66,76). Así que por una parte buscamos un buen modelo de diferenciación y luego tratamos de probar *in vitro* si nuestro sistema funciona desde un punto de vista bioquímico-estructural.

Una de las preguntas que tratamos de contestar es si durante la etapa de diferenciación-apoptosis la glándula de Harder tiene alguna interacción con la pineal. Y lo primero que tratamos de contestar es si los extractos de la glándula de Harder son capaces de estimular la síntesis de melatonina *in vitro*. Para esto diseñamos unos experimentos, primeramente para obtener 2 extractos crudos; uno orgánico y otro acuoso de glándulas de Harder bajo tres distintas condiciones de luz/obscuridad a) RN= ritmo normal; b) LC= luz constante y c) OC= obscuridad constante. En estos grupos fué importante tener a ratas gestantes y hacer los grupos arriba mencionados, al primer día de desarrollo posnatal y en cuartos estrictamente cronobiológicos donde sólo 3 personas teníamos acceso a esos animales. El porqué de estos grupos bajo distintos ritmos es obvio: aquellos animales en RN expresaron una normalidad o grupo testigo; por otra parte aquellos bajo LC esperamos una depleción de compuestos principalmente lípidicos y porfirinas, en los grupos OC la depleción es importante más no radical, como ocurre con los de LC. En este trabajo no intentamos describir el ritmo de la melatonina ya que requeriríamos cuando menos otros 3 tiempos de análisis no solo las 11:00 y las 23:00 hrs.

Por último el pinealocito cumple los requisitos para ser considerado como

paraneurona; ésto es, al no poder ser clasificado como neurona, comparten con ellas ciertas similitudes en cuanto a origen, metabolismo, función y estructura:

1.- Células capaces de producir:

a) una sustancia idéntica o similar a un neurotransmisor o posible neurotransmisor

b) una o varias sustancias proteicas, péptidos con efectos hormonales.

2.- Células que poseen un sistema de exocitosis muy parecido al de neurosecreción, con vesículas o gránulos o ambos, relacionados a sus secreciones.

3.- Sistema de receptores que modulan procesos de secreción; noradrenérgicos, colinérgicos etc.

4.- Un mismo origen embrionario (neuroectodermo).

Estos tipos celulares se incluyen en el llamado: Sistema neuroendócrino difuso o tercera división endócrina del sistema nervioso.

El pinealocito cumple los requisitos para ser considerado una paraneurona. Las vesículas como los gránulos secretorios contienen además de proteínas algún tipo de indolamina (serotonina-melatonina). Así, las sustancias almacenadas en las vesículas granulares densas son producidas en respuesta a una información luminosa que llega a pineal vía inervación adrenérgica. En este trabajo se obtuvo una respuesta *in vitro* similar a la adrenérgica con un extracto orgánico de glándula de Harder bajo un ritmo biológico. Esto nos hace pensar que la relación Harder-Pineal posee una interacción más estrecha, de lo que en otros trabajos y con experimentos indirectos se había demostrado (79,81).

9. CONCLUSIONES:

- 1) Los extractos orgánicos obtenidos de glándulas de Harder (bajo ritmo normal) son capaces de estimular la síntesis de melatonina, en pineales de ratas de 15 días *in vitro*.
- 2) Este efecto es independiente de un estímulo noradrenérgico.
- 3) Observamos también que extractos acuosos (bajo ritmo normal) son capaces de estimular la síntesis de melatonina, en pineales de ratas de 15 días *in vitro*.
- 4) Este efecto es noradrenérgico (cuando menos en parte).
- 5) La estructura y ultraestructura pineal se modifican parcialmente con la incubación en extractos orgánicos de glándula de Harder. Estos datos se correlacionan con síntesis: aumento de vesículas de secreción, retículo endoplásmico rugoso y cintas sinápticas.
- 6) Con este estudio se comprueba; que la glándula de Harder contiene algún o algunos compuestos capaces de estimular la síntesis de melatonina en la glándula pineal.

10. REFERENCIAS.

- 1.-Acuña-Castroviejo D., Coto-Montes A., Monti M.G., Ortiz G.G. y Reiter R.J., Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci.* 60:23 (1997) .
- 2.- Anderson E., The anatomy of ovine bovine pineals,lights and electron microscopic studies. *J. Ultraestructure Res.Suppl.* 8:1 (1965).
- 3.- Axelrod J.R., MacLean, P.D., Albers, R.W., y Weisstach, H., Regional distribution of methyl transferase enzymes in the nervous system and glandular tissues. *Regional Neurochem.* Pergamon Press, Oxford 307 . (1961).
- 4.-Calvo J. y Boya J., Posnatal development of cell types in the rat pineal gland. *J. Anat.* 137: 185 (1983).
- 5.- Bargmann W., *Handbuch der Mikroskopischen anatomie des Menschen.* Mollendorff Ed. (Springer, Berlin) Vol.6 pp.309. (1943).
- 6.- Blask D.E., Differential effects of the pineal gland on LH-RH and FSH-RH activity in the medial basal hypothalamus of the male golden Hamster. *Neuroendocrinol.* 28:36. (1979).
- 7.- Bondarenko L.A., The biochemical aspects of pineal gland functioning in the rat in ontogeny. *Ontogenes.* 22:57. (1991).
- 8.- Brown G.M., Chronopharmacological actions of the pineal gland. *Drug Metabol Interact.* 8:189. (1990).

- 9.- Brown G.M., Barr A., Grossi D., Kashur S., Johannson E. y Yie S.M., Urinary 6-sulphatoxymelatonin, an index of pineal function in the rat. *J. Pineal Res.* 10:141.(1991).
- 10.- Browstein M. J., The pineal gland (Minirev.), *Life Sciences* 16:1363 (1975).
- 11.- Bruyn G.W., The seat of the soul. En: Rose C., Bynium W.F. (Comps) *Historical aspects of the neurosciences*, pp 55-81, Raven press, New york. (1985)
- 12.- Buzzell G.R., Pangerl B., Menéndez-Peláez A., Vaughan M.K., Little J.C., Hill S.M., Vaughan G.M. y Reiter R.J., Melatonin and porphyrin in the Harderian glands of the Syrian Hamsters patterns and response to autumnal conditions. *Int-J-Biochem.* 22:1465. (1990).
- 13.- Cardinalli D. P. y Wurtman R.J., Hydroxyindole-O-methyl Tranferases in rat retina and Harderian gland. *Endocrinology* 91: 247. (1972).
- 14.- Cardinalli D.P., Action spectra for effects of light on hydroxyindole-O-methyl transferases in rat pineal, retina and Harderian gland. *Endocrinology* 91: 877-886 (1972).
- 15.- Cardinalli P., *Neuroendocrinología; Glándula Pineal.* (Schiaffini) Salvat editores.p.p. 309. (1985).
- 16.- Chiquione A. D., The identification and electron microscopy of myoepithelial cells in the Harderian Gland. *J. Anat. Record.* 132-4, 569.(1958).
- 17.- Czanorcki J. y Sastry P. S., *The lipids of human pineal gland.* London, Pergamon Press. p.49 (1969).

18.- Davis F.A., The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. An. Ophthalmology Soc. 27:401. (1929).

19.- Dodt E. y Maissl H., The pineal and parietal organs of lower vertebrates. Experientia 33, Birkhauser Verlag. Switzerland p.p. 996. (1982).

20.- Feria-Velasco A. y Tapia-Arizmendi G., Efectos de las condiciones de luz ambiental sobre la ultraestructura de la glándula de Harder en la rata recién nacida. Arch. Invest. Med. (Mex) 9:67. (1978).

21.- Feria-Velasco A., Meléndez C. y Jaramillo J., Sex differences in secretion pattern of neonatal rat Harderian gland under various environmental lighting conditions. Comp. Biochem. Physiol. 74 B: 709. (1983).

22.- Feuer G., Biochemistry of the pineal gland as an endocrine organ. Drug Metabol Drug Interact. 8:203. (1990).

23.- Goldman B.D., Parameters of the circadian rhythm of pineal melatonin secretion affecting reproductive responses in Siberian hamsters. Steroids. 56:218. (1991).

24.- Hoffman R.A., Influence of some endocrine glands, hormones and binding on the histology and porphyrins of the Harderian gland of golden Hamsters. Am J Anat 32:436.(1970).

25.- Hoffman R.A., Habeed P. y Buzzell G.R., Further studies on the regulation of the Harderian glands of golden hamsters by the thyroid gland. J-Comp-Physiol-[B]. 160:269. (1990).

- 26.- Hoffman R.A., Johnson L.B., Vaughan M.K., y Reiter R.J., Interaction of Harderian glands, illumination, and temperature on the thyroid hormones in golden hamsters. *J Comp Physiol B* 158: 697. (1989).
- 27.- Hoffman R.A., Wertz P., y Habeeb P., Harderian glands of golden hamsters: morphological and biochemical responses to thyroid hormones. *J Comp Physiol B* 159:293.(1989).
- 28.- Johnson L.Y., y Reiter R.J., The pineal gland and its effect on mammalian reproduction. *Prog. Reprod Biol.* 4:116 (1978).
- 29.- Jost U., A morphological and biochemical analysis of the Harderian gland in the rabbit. *Cytobiologie* 8: 440. (1974).
- 30.- Kamback D.O., Effect of pinealectomy on fatty acid composition of rat brain myelin. *Endocrinol.* 110: 907. (1982).
- 31.- Kappers J. A., The developmental, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z.Zellforsch.* 52:163 (1960).
- 32.-Kappers J. A., The mammalian pineal organ. *J. Neurovic.Relat. Suppl* 9:140 (1969).
- 33.- Karasek M.K., Ultrastructure of rat pinealocytes in vitro: influence of gonadotropic hormones and LH-RH. *Cell. Tiss. Res.* 195, 547. (1978).
- 34.-Karasek M., Ultrastructural study of the pineal-adenohypophysial relationships in rats. *Progr. Brain. Res.* 52:195 (1979).

- 35.- Kelenyi G., y Orban S., Electron microscopy in the Harderian gland of the rat; maturation of the acinar cells and genesis of the secretory droplets. *Acta. Morph. Acad. Sci. Hung.* 13: 155. (1965).
- 36.- Kennedy G.Y., Harderoporphyrin: a new porphyrin from the Harderian gland of the rat. *Comp. Biochem. Physiol.*36:21. (1970).
- 37.- Klein D.C., Melatonin synthesis: Adenosine 3'5' monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyl-transferase. *Science* 168:979. (1970).
- 38.- Klein D.C., Evidence for the placental transfer of 3H-acetyl-melatonin. *Nature New Biol.* 237:117 (1972).
- 39.- Knight B.K. y Hayes M.M., The pineal Gland. *Anim. Sci.* 3:143 (1973).
- 40.- Kuwano R., and Takahashi T., A simple method for the preparation of the immunoglobulins to hydroxyindole-O-methyl transferase. *J. Neurochem.* 31:809. (1978).
- 41.-Kuwano R., Purification of bovine pineal hydroxyindole-O-methyl transferase by inmunoadsorption chromatography. *J. Neurochem.* 31:815.(1979).
- 42.- Lascelles J., Tetrapyrrole byosynthesis and its regulation. New York, Benjanin, W.A. (1964).
- 43.- Lehninger A.L., *Bioquímica.* 2a. Ed. Omega p.p. 823. (1984).
- 44.- Lerner A.B., y Case J.D., Isolation of melatonin and 5-metoxi indol 3-acetic acid from bovine pineal gland. *J.Biol. Chem.* 235:1992 (1960).

- 45.- Lin H.S., y Hwang T., Fine structural changes in the hamster pineal gland after blinding and superior cervical ganglionectomy. *Cell. Tissue Res.* 158:285. (1975).
- 46.- López-González M.A., Calvo J.R., Rubio A., Goberna R., y Guerrero J.M., Characterization of melatonin binding sites in the Harderian gland and median eminence of the rat. *Life-Sci.* 48:1165. (1991).
- 47.- McNulty J.A., McReynolds H.D. y Bowman D.C., Pineal gland free amino acids and indoles during postnatal development of the rat: correlations in individual glands. *J. Pineal Res.* 9:65. (1990).
- 48.- Menéndez-Peláez A., Buzzell G.R., Rodríguez C., y Reiter R.J., Indole and porphyrin content of the Syrian hamster harderian glands during the proestrous and estrous phases of the estrous cycle. *J-Steroid-Biochem-Mol-Biol.* 38:101. (1991).
- 49.- Melchiorri D., Reiter R.J., Attia A.M., Hara M. y Nistico G., Potent Protective effect of melatonin on *in vivo* paraquat induced oxidative damage. *Life Sci.* 56: 83 (1995)
- 50.- Melchiorri D., Reiter R.J., Sewerynek E., Ortiz G.G. y Nistico G., The pharmacology of melatonin in lipoperoxidation. In *Pineal Update*. PJD. Publications Limited, Westbury, NY. pp 389 (1997)
- 51.- Mennega K., Ueck M. y Reiter R.J., Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. *J. Pineal Res.* 10:159. (1991).
- 52.- Moore R.Y., y Klein D.C., Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* 71:17 (1974).

- 53.- Nagle C.A., y Cardinalli D.P., Uptake and effect of 17-beta-estradiol on pineal hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) activity. *Life. Sci.* 2: 1109. (1972).
- 54.- Ogle T.F., y Kitay J.L., Effects of pinealectomy on adrenal function in vivo and in vitro in female rats. *Endocrinology* 98: 20. (1976).
- 55.-Ortiz G.G., Feria-Velasco A., Guerrero J.M., Agapito-Serrano M.T., Pablos M.I. y Reiter R.J., Pineal effects of Harderian gland extracts obtained under diferents light conditions. *Proc. EPS*, p112 (1996).
- 56.-Ortiz G.G., Guerrero J.M., Sewerynek E., Chuang J.H., Melchiorri D., Oh C.S., Acuña-Castroviejo D., Feria-Velasco A. y Reiter R.J., Melatonin is cytoprotective during neural ischemia-reperfusion injury in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). In *Pineal Update*. PJD. Publications limited. Westbury, NY. pp 389 (1997).
- 57.-Ortiz G.G., Bitzer-Quintero O.K., Falcón-Franco M.A., Sewerynek E., Acuña-Castroviejo D., Feria-Velasco A. y Reiter R.J., La glándula de Harder: un transductor neuroendócrino *Arch. Neuroc. (Mex)* 2(4): 274 (1997).
- 58.-Ortiz G.G., Falcón-Franco M.A., Bitzer-Quintero O.K. y Feria-Velasco A., Sexual differences and circadian rhythms of Harderoporphyryns concentrations in Mongolian gerbil. In *Proc. Congr. Nac. Cien. Fisiol.* Vol 37: 128. (1993).
- 59.-Payne A.P., The Harderian gland: a tercentennial review. *J. Anat.* 185: 1 (1994)
- 60.- Panke E.S., y Reiter R.J., Pineal melatonin concentrations in the Syrian Hamster. *Endocrinology* 104: 194. (1979).
- 61.- Quay W.B., Pineal chemistry in cellular and physiological mechanisms.

Charles C. Thomas, Springfield, Ill. pp 430. (1974).

62.- Reiter R.J. y Klein D.C., Observations on the pineal gland, the Harderian glands, the retina and the reproductive organs of adult female rats exposed to continuous light. *J. Endocrinol.* 51:117. (1971).

63.- Reiter R.J., Photoperiod, pineal and reproduction: En: Reiter R.J. (Ed.) *The pineal.* Eden Press, Montreal pp.71. (1977).

64.- Reiter R.J., Evidence for an endocrine function of the human pineal gland. *J. Neural Trans. Suppl.* 13:247. (1978).

65.- Reiter R.J., The pineal gland and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev* 1:109. (1980).

66.- Reiter R.J., Pineal melatonin rhythm: reduction in aging syrian Hamsters. *Science* 210:1372 (1980).

67.-Reiter R.J., Melchiorri D., Sewerynek E., Poeggler B., Barlow-Walden L., Chuang J.H., Ortiz G.G., y Acuña-Castroviejo D., A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.* 18: 1 (1995)

68.-Reiter R.J., Ortiz G.G. Monti M.G. y Carneiro R.C.G., Cellular and Molecular actions of melatonin as an antioxidant. *Neuroendocrinology: Therapeutic potential of pineal hormone melatonin.* In *Therapeutic Potential of Melatonin.* Maestroni GJM, Conti A, Reiter RJ (eds) *Front. Horm. Res. Basel Karger.* Vol 23 pp81 (1997).

69.-Reiter R.J., Pablos M.I., Agapito M.T., Guerero J.M., Melatonin in the context of the free radical theory of aging. *Ann. NY. Acad. Sci.* 786: 362 (1996)

- 70.- Relkin R., Pinealectomy and brain myelination. *Endocrinol.* 92:1496 (1973).
- 71.- Relkin R. y Schneck L., Effect of pinealectomy on rat brain myelin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:337 (1975).
- 72.- Reppert S.M. y Klein D.C., Transport of maternal [3H] melatonin to suckling rats and the fate [3H] melatonin in the neonatal rat. *Endocrinology* 102: 582 (1978).
- 73.- Sandyk R., Possible role of pineal melatonin in the mechanisms of aging. *Int-J-Neurosci.* 52:85. (1990).
- 74.-Sewerynek E., Ortiz G.G., Reiter R.J., Pablos M.I., Melchiorri D., y Daniels W.M.V., lipopolysaccharide-induced DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin. *Mol. Cell Endocrinol.* 117: 183 (1996).
- 75.-Sewerynek E., Melchiorri D., Reiter R.J., Ortiz G.G., y Lewinsky A., Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *Eur. J. Pharmacol.* 293: 327 (1996).
- 76.- Synder S.H., Control of the circadian rhythm in serotonin content of rat pineal gland. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 53:301 (1965).
- 77.- Tamarkin L., Baird C.J. y Almeida O.F., Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227:714. (1985).
- 78.- Von Bartheld F. y Moll J., The vascular system of the mouse epiphysis with remarks on the comparative anatomy of the venous trunks in the epiphyseal area. *Acta. Anat.* 22:227 (1954).

Figura 8.

Peso de la glándula de Harder de ratas a los 15 días de desarrollo posnatal

Figura 9.

Pinealocitos con alto contenido de vesículas de secreción.

a) Experimentos realizados a las 11:00 h.; b) Experimentos realizados a las 23:00 h.

Fig 10 a y b.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extracto orgánico de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo normal de luz. Experimentos realizados a las 11:00 h.

Fig 10 c y d.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos de glándulas de Harder, obtenidas bajo un ritmo normal de luz. Experimentos realizados a las 23:00 h.

Fig 10 e y f.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo normal de luz. Experimentos realizados a las 11:00 h.

Fig 10 g y h.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo normal de luz. Experimentos realizados a las 23:00 h.

79.- Wetterberg L., Geller E. y Yuwiler A., Harderian gland: and extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats. *Science* 167:844. (1970).

80.- Wetterberg L., Nystrom B. y Nilsson O., Effect of lighting conditions of the porphyrins content and morphology of the Harderian glands and uterine morphology in the golden hamster. *Specialitia Experientia* 28: 1084. (1972).

81.- Wetterberg L., Yuwiler A., Ulrich R., Geller E., y Wallace R., The Harderian gland; influence on pineal hidroxyindole-O-methyl transferases in neonatal rats. *Science* 170: 194. (1970).

82.- Wislosky G.B., y Leduz N., Vital staining of the hemato encephalic barrier by silver nitrate, and trypan blue, and cytological comparision of the neurohypophysis, pineal body, area postrema, intercolumnar tuberclean and supraoptic crest. *J. Comp. Biochem. Physiol.* 96 :371 (1951).

83.- Wong P.Y. y Fritze I., Determination by neuron activated of cooper, manganeses and zinc in the pineal body and other areas of the brain tissue. *J. Neurochem.* 16:1231 (1969).

84.- Wurtman R. J., Axelrod J., Chu, E.W. y Fischer J.E., Changes in the enzymatic synthesis of melatonin in the pineal during the estrous cycle. *Endocrinology* 76:798. (1965).

—

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1.

Relación del tracto retina-pineal.

Figura 2.

Fotomicrografía de un corte histológico de glándula de Harder de hamster macho.

Figura 3.

Fotomicrografía de un corte histológico de glándula de Harder de hamster hembra.

Figura 4.

Cuantificación de noradrenalina en los extractos de glándula de Harder

Figura 5.

Concentración de melatonina en glándulas pineales incubadas con extractos de glándula de Harder. Experimentos realizados a las 11:00 h.

Figura 6.

Concentración de melatonina en glándulas pineales incubadas con extractos de glándulas de Harder. Experimentos realizados a las 23 h

Figura 7a.

Peso somático de ratas a los 15 días de desarrollo posnatal.

Figura 7b

Peso de la glándula pineal de ratas a los 15 días de desarrollo posnatal.

Fig 11 a y b.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de luz constante. Experimentos realizados a las 11:00 h.

Fig 11c y d.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de luz constante. Experimentos realizados a las 23:00 h.

Fig 12 a y b.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extracto orgánico de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de obscuridad constante. Experimentos realizados a las 11:00 h.

Fig 12 c y d.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de obscuridad constante. Experimentos realizados a las 23:00 h.

Fig 12 e y f.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de obscuridad constante. Experimentos realizados a las 11:00 h.

Fig 12 g y h.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de oscuridad constante. Experimentos realizados a las 23:00 h.

Fig 13 a-c.

Fotomicrografía de glándula pineal observada bajo microscopía electrónica de barrido. a) glándula pineal de rata de 15 días de desarrollo posnatal.

Fig 14 a-b.

Fotomicrografías de organelos de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos.

Fig 14 c-d.

Fotomicrografías de organelos de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos.

Figura 1.

Relación del tracto retina-pineal.

Esta vía inicia en la retina para seguir por los nervios ópticos, quiasma óptico, tracto óptico accesorio inferior, para luego internarse en el hipotálamo y hacer contacto con el núcleo supraquiasmático así como núcleos supra y para ventricular. De esta región sale una vía que se dirige a la médula cervical y en esta región hace contacto con el ganglio cervical superior, para finalmente llegar a la glándula pineal. Una hipótesis acerca del desarrollo de los ritmos en la glándula pineal es la intervención de la glándula de Harder.

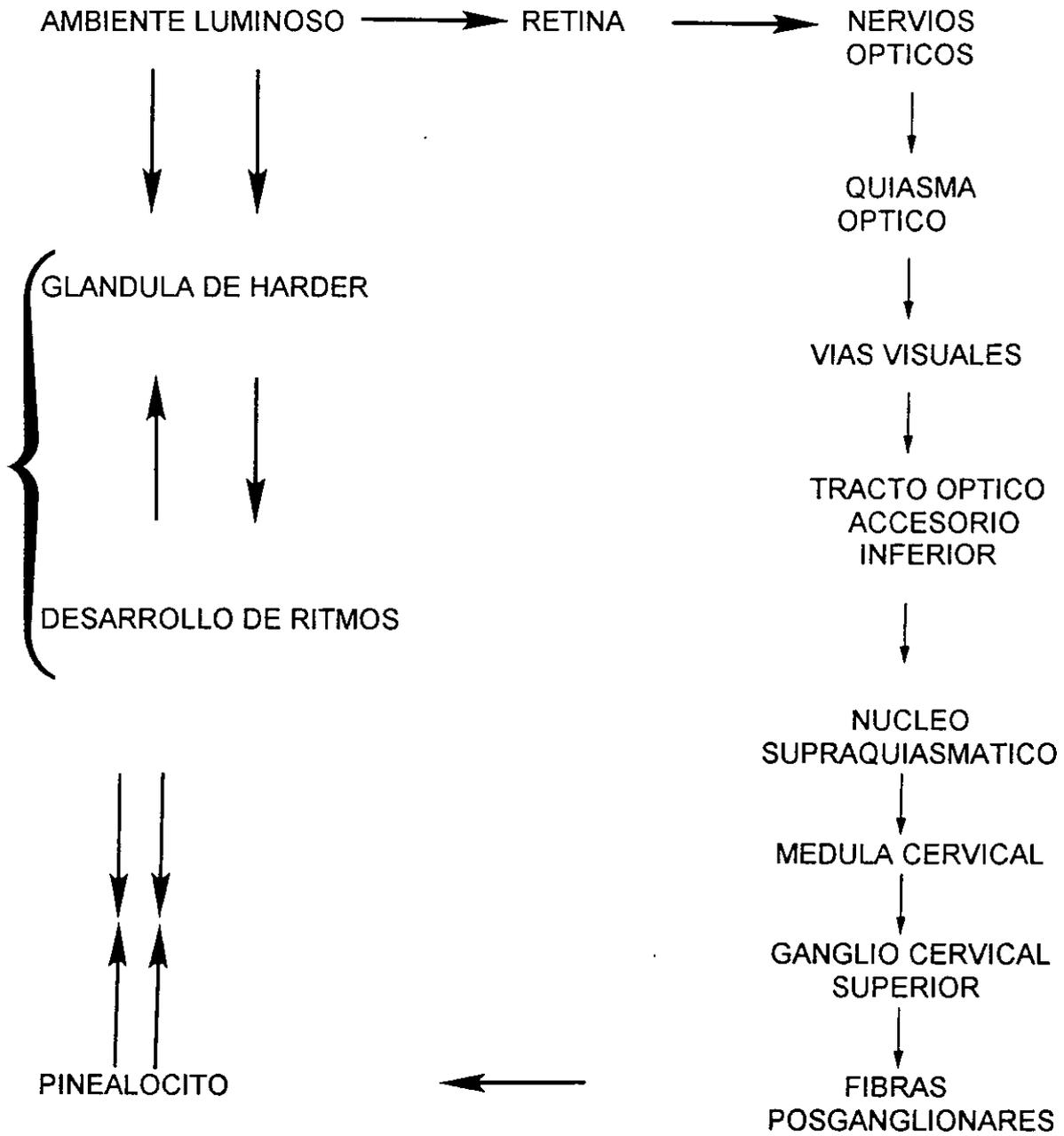


Figura 2.

Fotomicrografía de un corte histológico de glándula de harder de hamster macho. Se puede apreciar la estructura acinar formada de células piramidales en cuyas bases se observan células mioepiteliales (flecha pequeña), la luz del acino (asterisco), en ocasiones con material secretorio. El epitelio acinar muestra dos tipos de células, células tipo II con grandes vesículas (punta de flecha) y otras tipo I con pequeñas (flecha grande).



Figura 3.

Fotomicrografía de un corte histológico de glándula de Harder de hamster hembra. Se puede apreciar la estructura acinar formada de células piramidales en cuyas bases se observan células mioepiteliales (punta de flecha), la luz del acino (asterisco), que muestra abundante material secretorio (asterisco blanco). El epitelio acinar sólo muestra el tipo I celular (flecha).

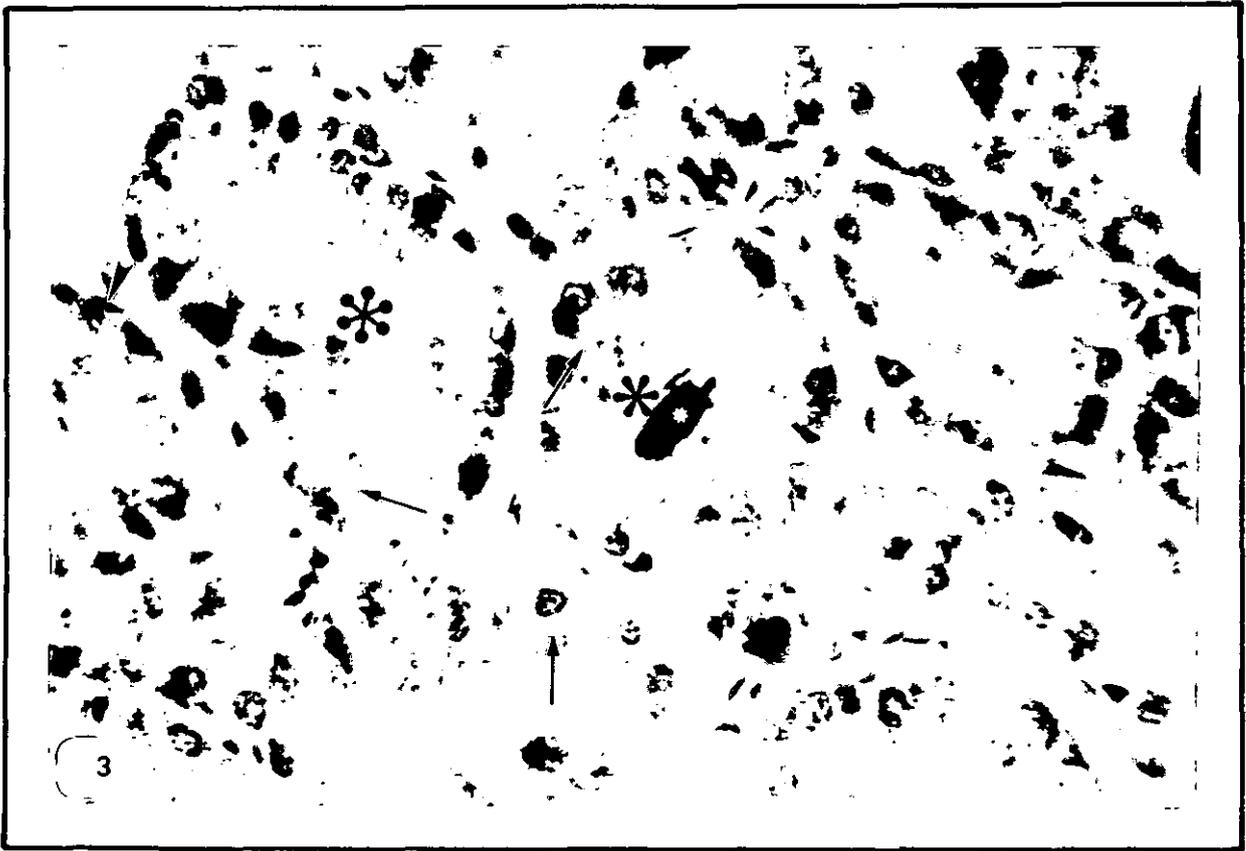


Figura 4.

Cuantificación de noradrenalina en los extractos de glándula de Harder.

RN= ritmo normal, LC= luz constante, OC= obscuridad constante; Ac=extracto acuoso, Or= Extracto orgánico.

En este experimento sólo se detectó en el extracto acuoso obtenido bajo ritmo normal de luz; en el resto de las condiciones, no se obtuvieron valores detectables.

N= 5 alícuotas de cada extracto.

Las cifras representan la media \pm la desviación estándar

CUANTIFICACION DE NORADRENALINA EN EXTRACTOS DE GLANDULA DE HARDER

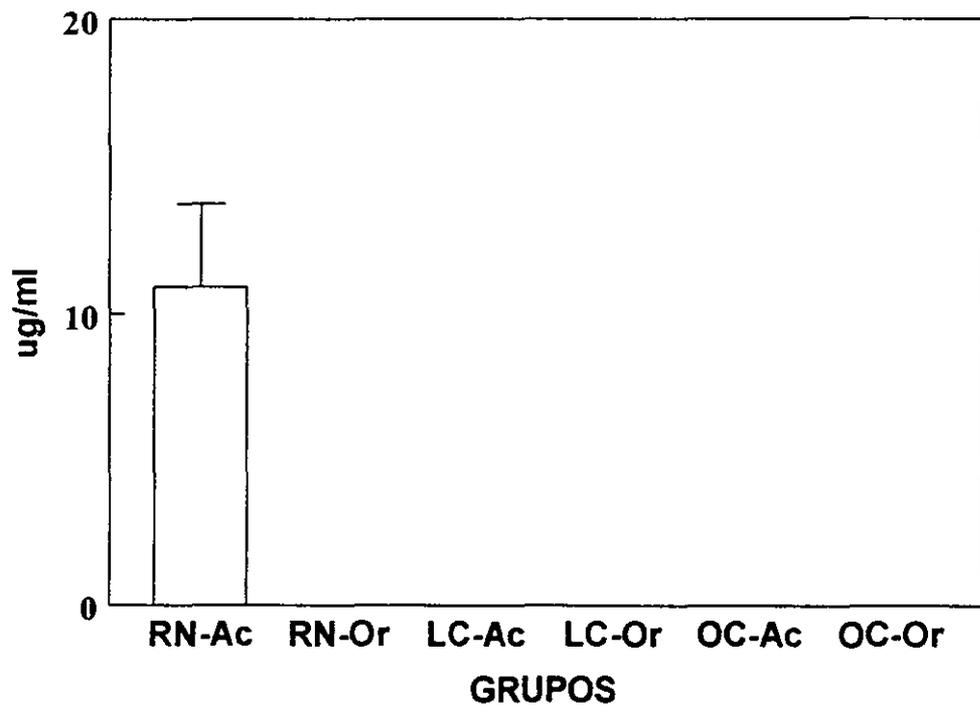


Figura 5.

Concentración de melatonina en glándulas pineales incubadas con extractos de glándula de Harder. Experimentos realizados a las 11:00 horas a) con dos horas de incubación ; b) con cuatro horas de incubación.

Isoproterenol= agonista (testigo positivo)

Medio de incubación (sin pineal)= testigo negativo

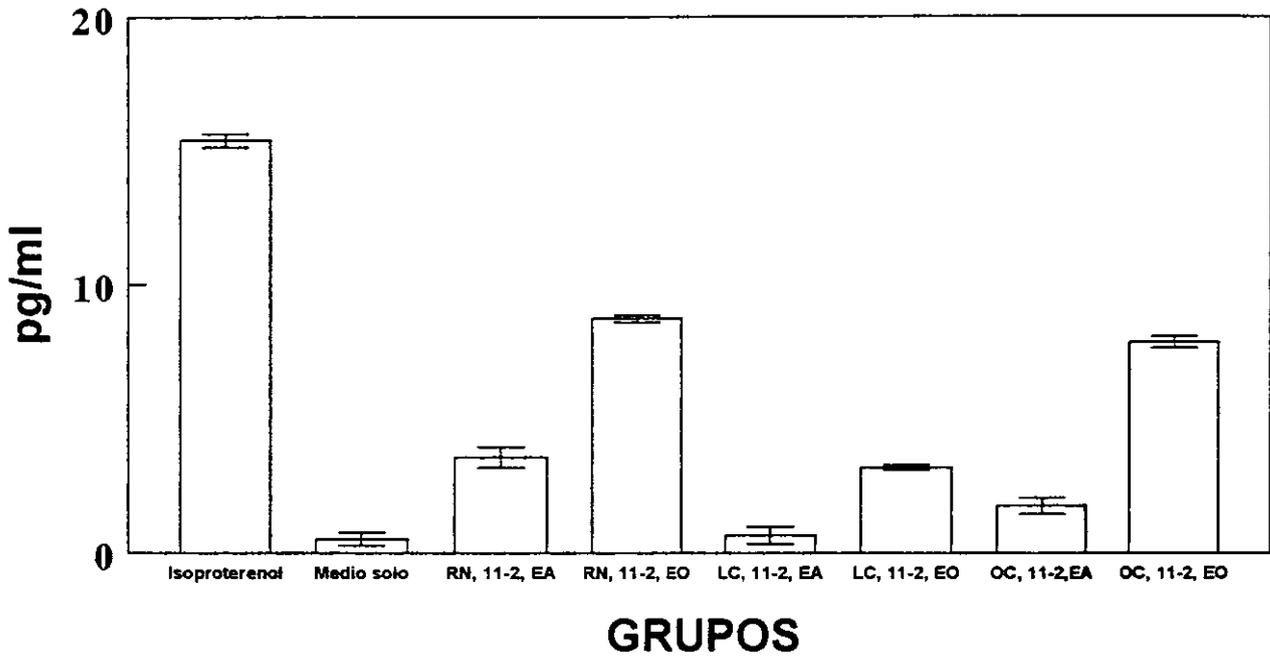
RN= ritmo normal de luz, LC= luz constante, OC= Oscuridad constante.

EA= extracto acuoso

EO= extracto orgánico.

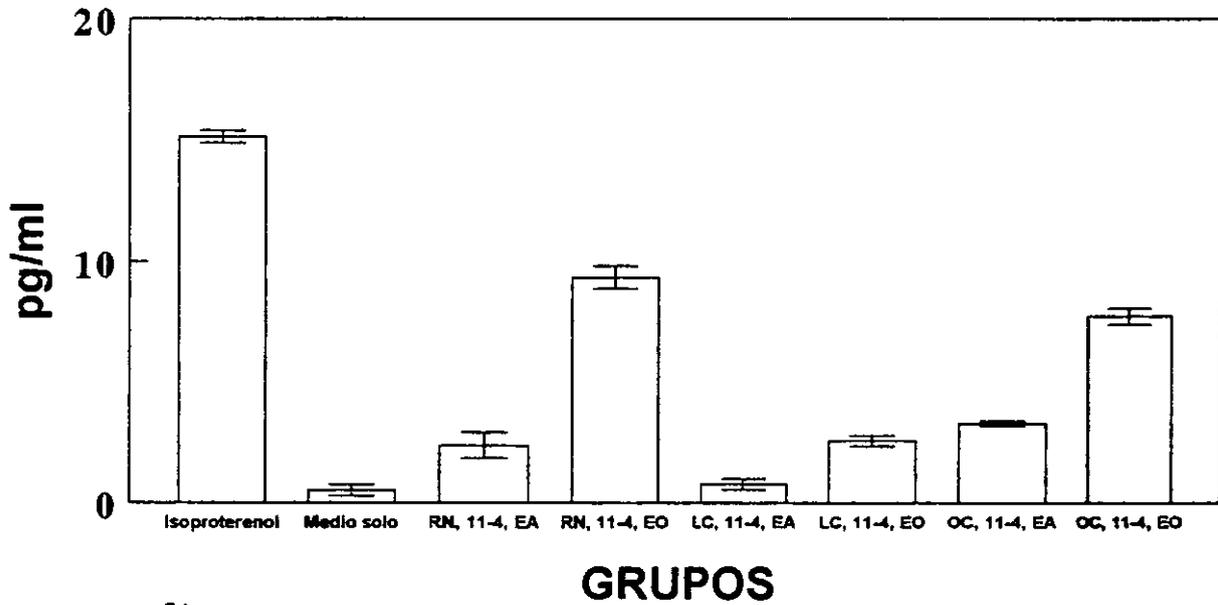
N=5. Cada dato es la media \pm la desviación estándar

CONCENTRACION DE MELATONINA 11:00 H., (2h, INCUBACION)



5a

CONCENTRACION DE MELATONINA 11:00., (4h, INCUBACION)



5b

Figura 6.

Concentración de melatonina en glándulas pineales incubadas con extractos de glándulas de Harder. Experimentos realizados a las 23 horas. a) con dos horas de incubación; b) con 4 horas de incubación.

Isoproterenol= agonista (testigo positivo)

Medio de incubación (sin pineal)= testigo negativo

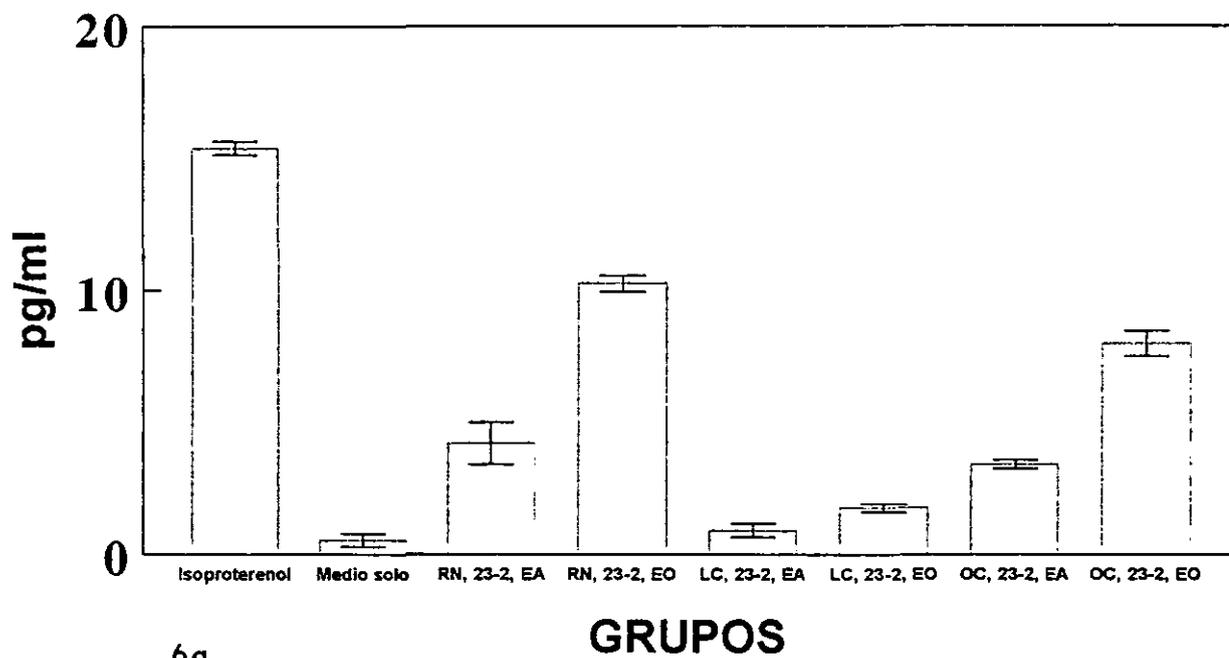
RN= ritmo normal de luz; LC= luz constante; OC=obscuridad constante

EA= extracto acuoso

EO= extracto orgánico

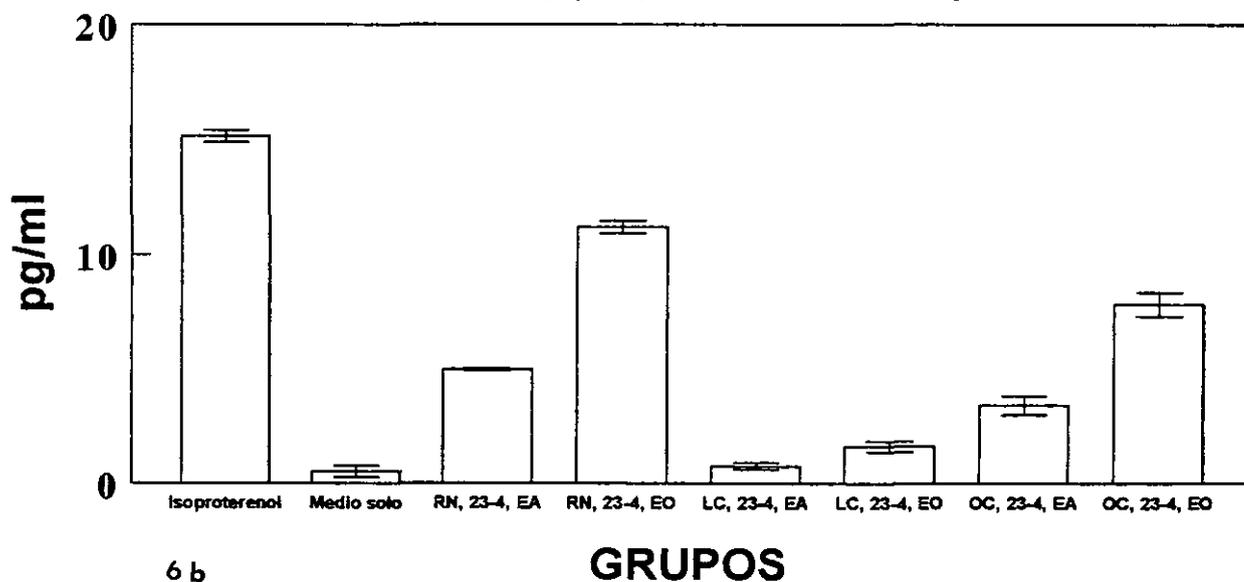
N=5. Cada dato es la media \pm la desviación estándar.

CONCENTRACION DE MELATONINA 23:00 h., (2H DE INCUBACION)



6a

CONCENTRACION DE MELATONINA 23:00., (4h, INCUBACION)



6b

Figura 7a.

Peso somático de ratas a los 15 días de desarrollo posnatal.

N= 50 . Si bien fueron diferentes experimentos el peso de los animales siempre fué homogéneo.

Cada punto es la media \pm la desviación estándar.

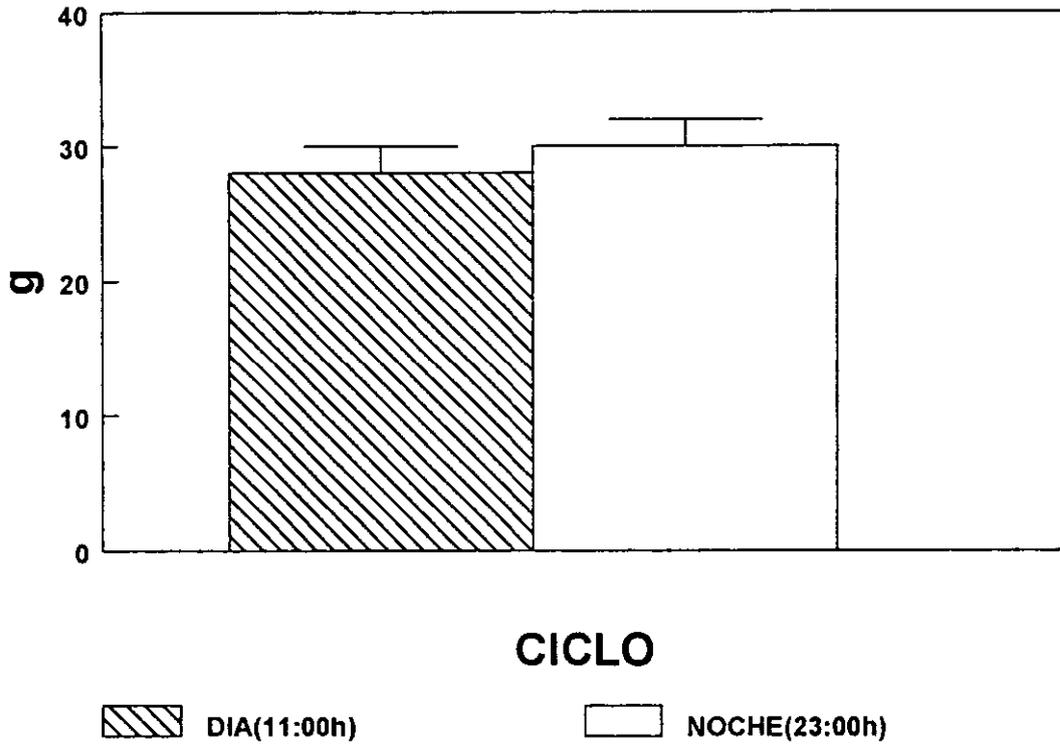
Figura 7b

Peso de la glándula pineal de ratas a los 15 días de desarrollo posnatal.

N= 50. En los diferentes experimentos el peso de las glándulas siempre fué homogéneo.

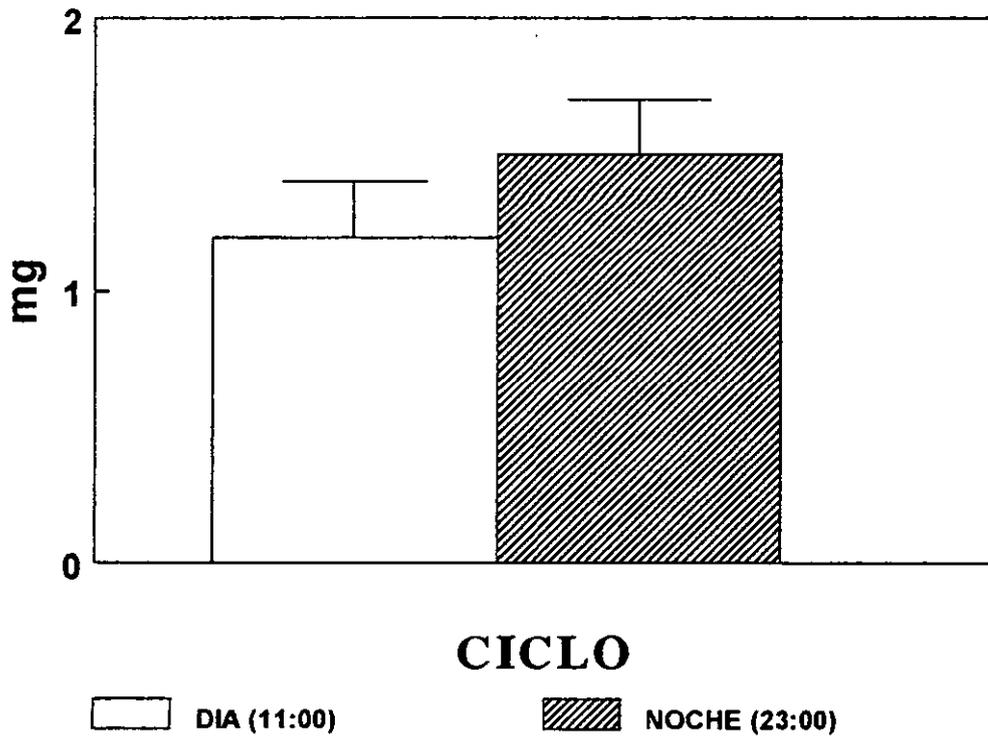
Cada punto es la media \pm la desviación estándar.

PESO SOMATICO DE RATAS DE 15 DIAS DE DESARROLLO PN.



7 a

PESO DE LA GLANDULA PINEAL DE RATAS DE 15 DIAS DE DP.



7 b

Figura 8.

Peso de la glándula de Harder de ratas a los 15 días de desarrollo posnatal.

N=30. Cada punto es el resultado de la media \pm la desviación estándar.

RN= ritmo normal de luz; LC= luz constante; OC=obscuridad constante

PESO DE LA GLANDULA DE HARDER EN RATAS DE 15 DIAS PN

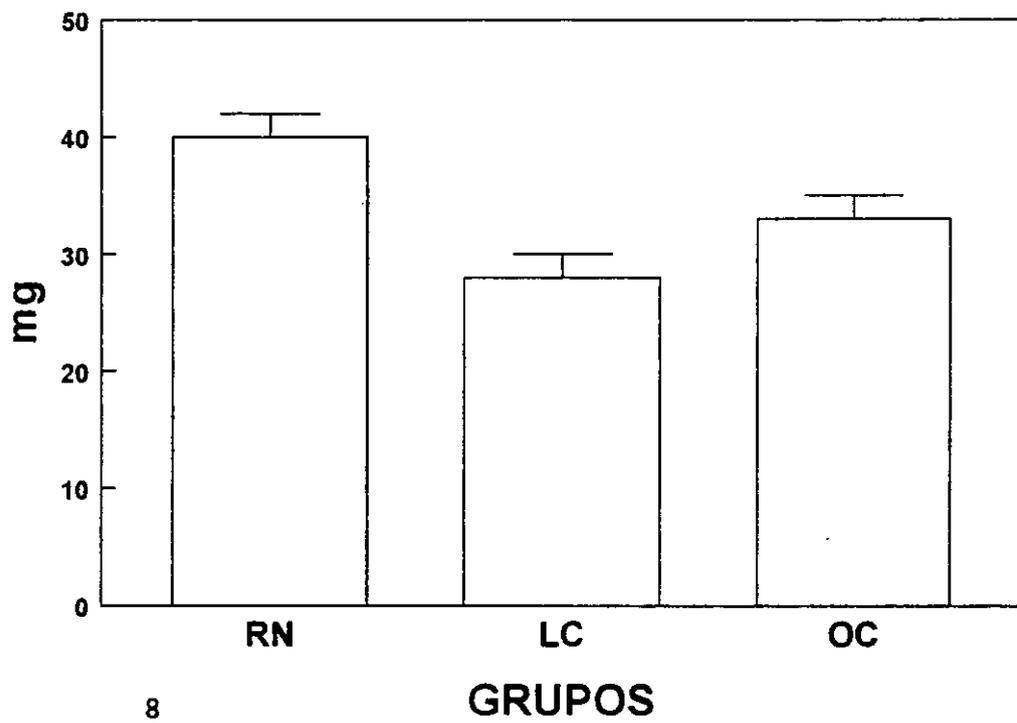


Figura 9.

Pinealocitos con alto contenido de vesículas de secreción.

a) Experimentos realizados a las 11:00 horas; b) Experimentos realizados a las 23:00 horas.

En estos gráficos se registraron el número total de células y de pinealocitos cuantificados con un analizador de imágenes. En los pinealocitos se determinaron y cuantificaron alto contenido de vesículas.

N= 3 pineales. Con un promedio de 10-15 análisis por pineal.

Cntc= Corteza número total de células

Mntc= Médula número total de células

Cps= Pinealocitos en corteza

Mps= Pinealocitos en médula

Pv-C-Ac= Pinealocitos de corteza con vesículas incubados con extracto acuoso

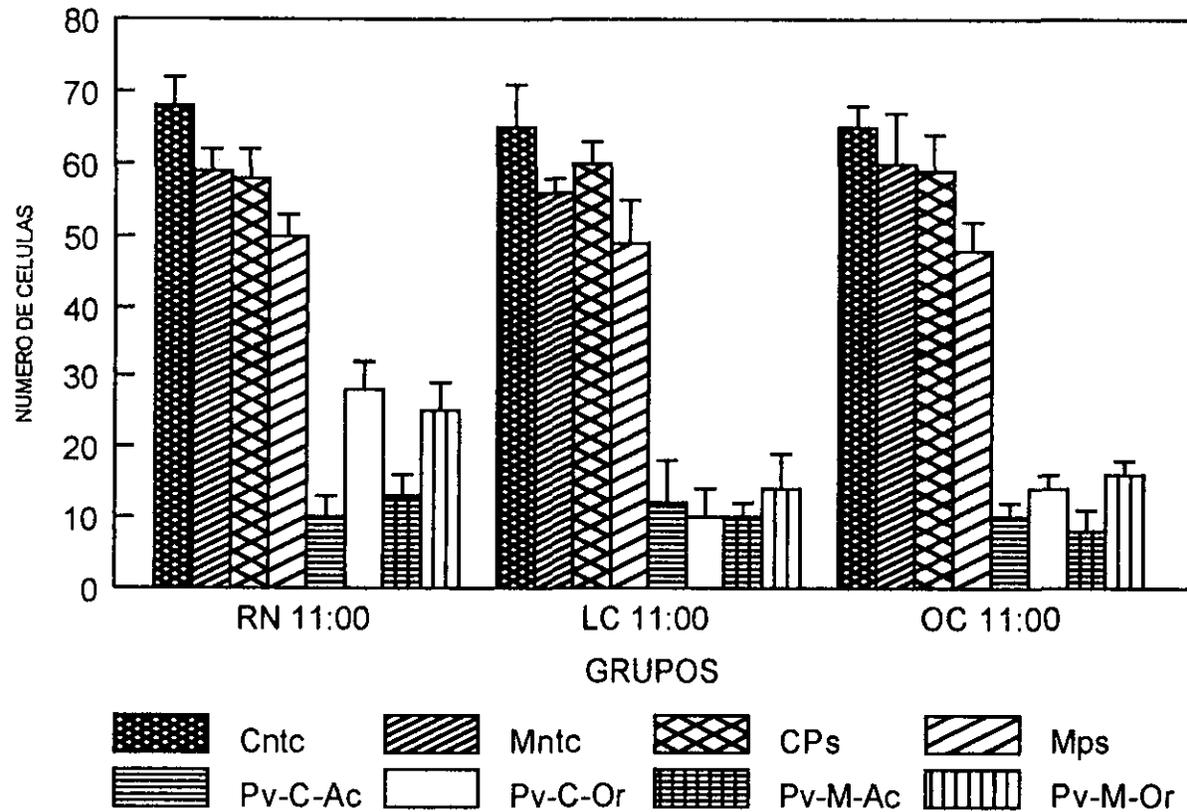
Pv-C-Or=Pinealocitos de corteza con vesículas incubados con extracto orgánico

Pv-M-Ac=Pinealocitos de médula con vesículas incubados con extracto acuoso

Pv-M-Or=Pinealocitos de médula con vesículas incubados con extracto orgánico

RN= ritmo normal de luz; LC= luz constante; OC= oscuridad constante

PINEALOCITOS CON ALTO CONTENIDO
DE VESICULAS DE SECRECION



PINEALOCITOS CON ALTO CONTENIDO
DE VESICULAS DE SECRECION

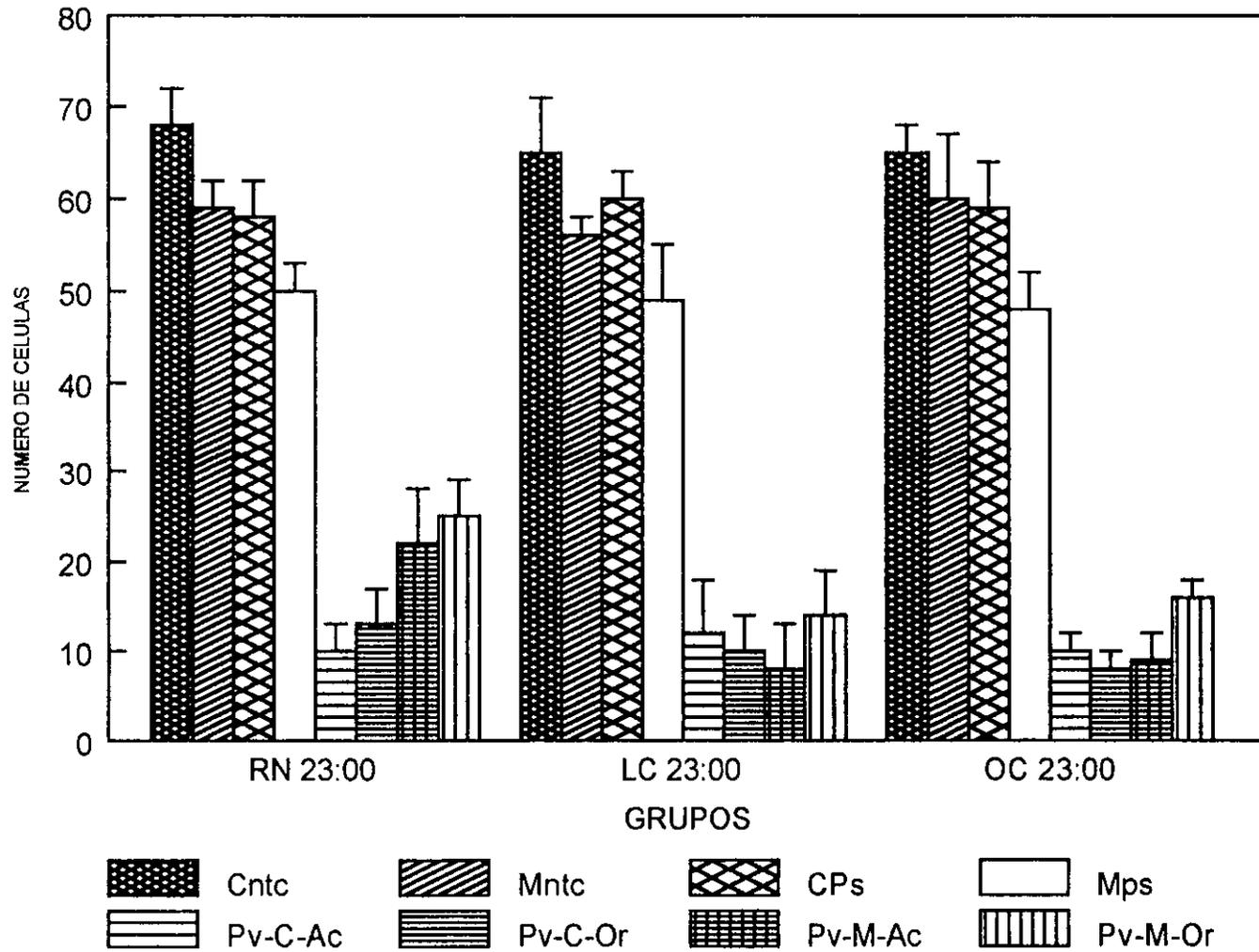


Fig 10 a y b.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extracto orgánico de glándula de Harder obtenidas bajo un ritmo normal de luz. Experimentos realizados a las 11:00 horas. a) pinealocitos (asteriscos), núcleo celular (N). b) vesículas con centro denso (flechas), cisternas de retículo endoplásmico rugoso con gran cantidad de ribosomas libres (puntas de flecha).

Fig 10 c y d.

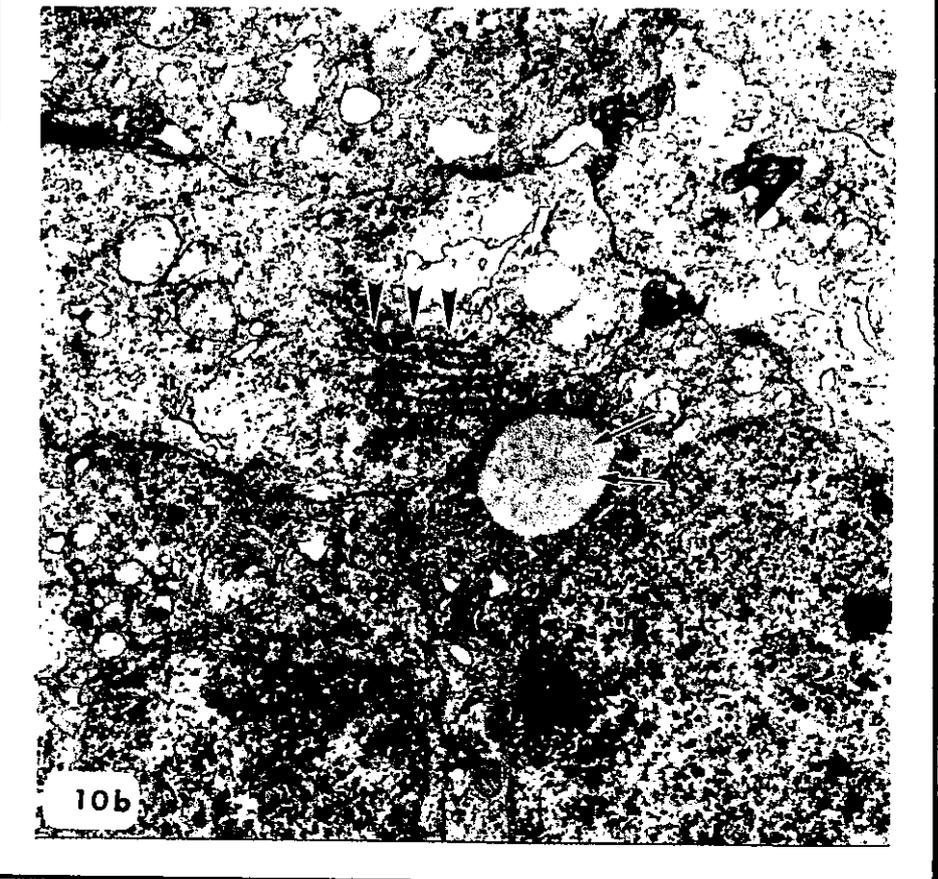
Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos de glándulas de Harder, obtenidas bajo un ritmo normal de luz. Experimentos realizados a las 23:00 horas. c) pinealocitos (asteriscos), núcleo celular (N), nucléolos (flechas). d) vesículas (asteriscos), retículo endoplásmico rugoso y ribosomas (flechas).

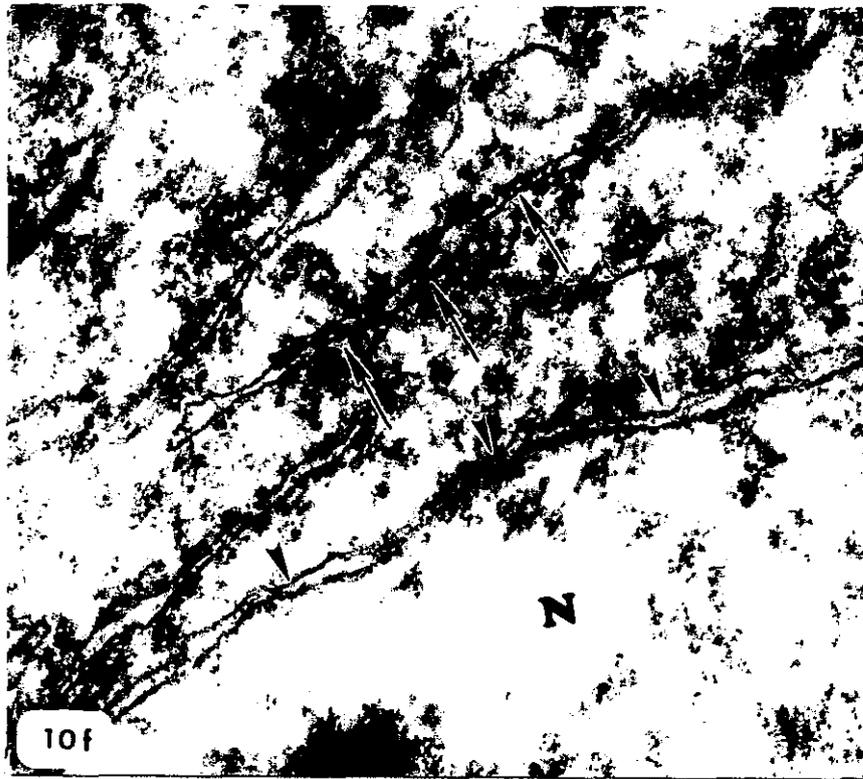
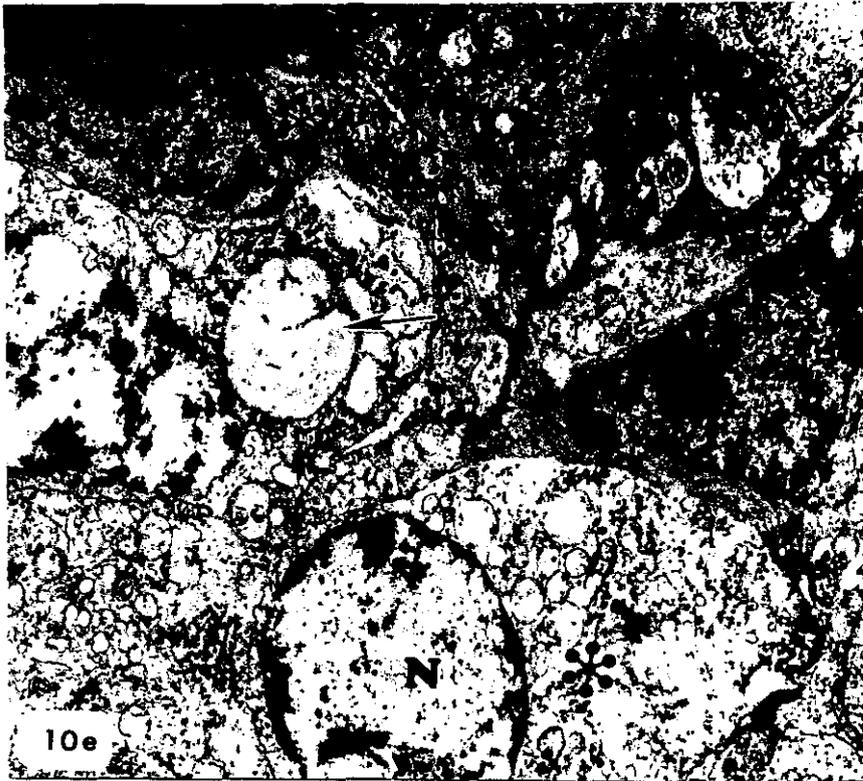
Fig 10 e y f.

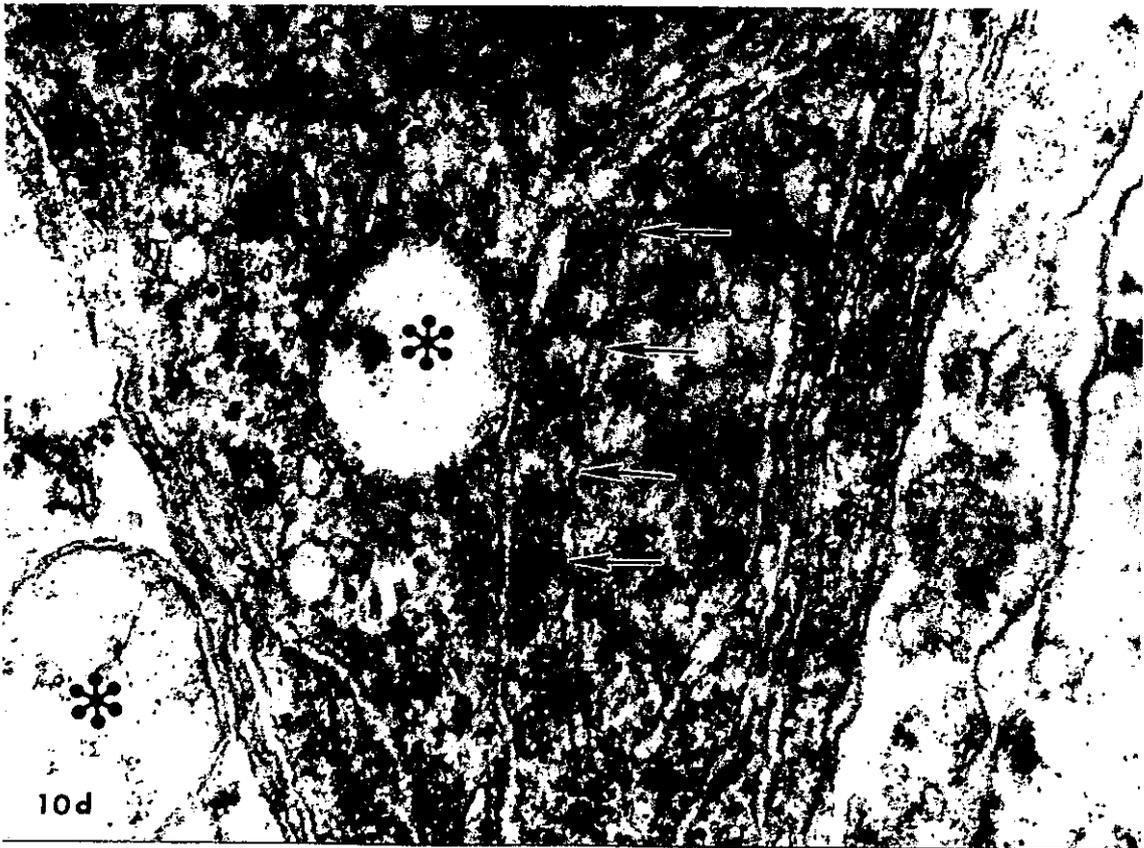
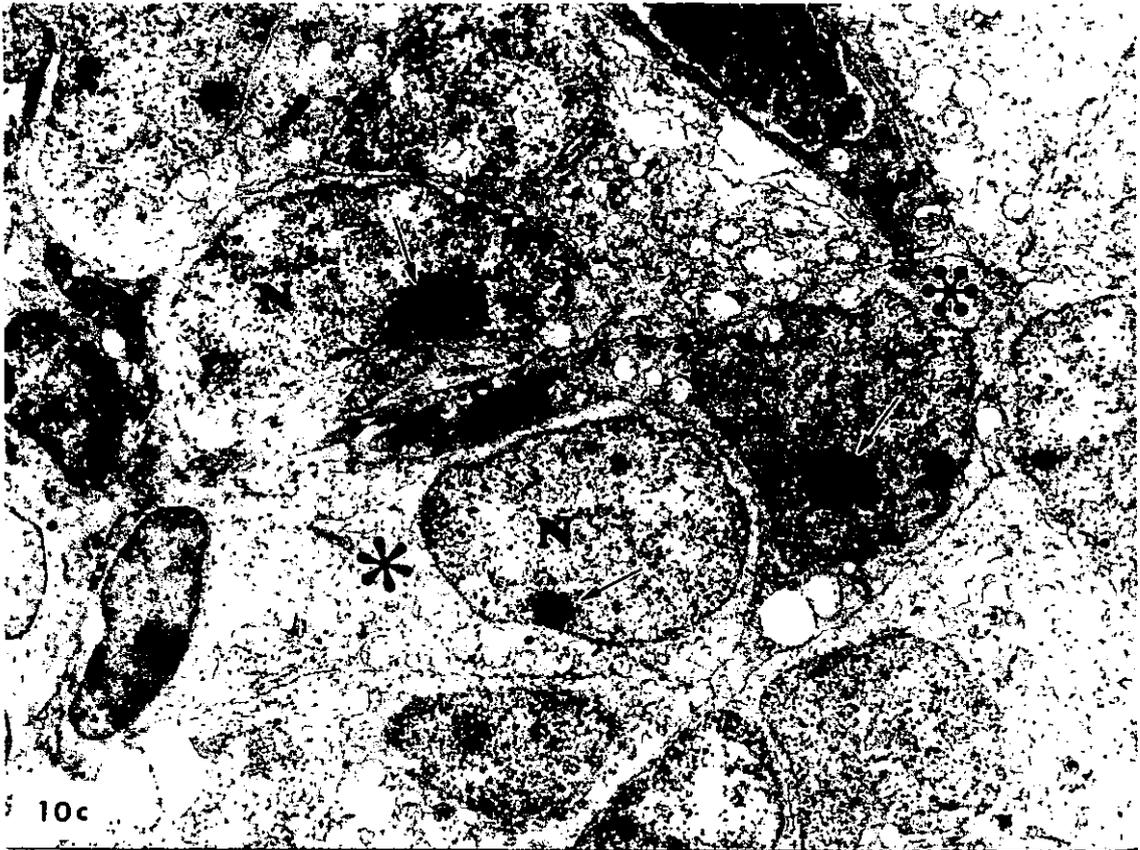
Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo normal de luz. Experimentos realizados a las 11:00 horas. e) pinealocitos (asteriscos), núcleo celular (N), vesícula (flecha). f) núcleo celular (N), envoltura nuclear (puntas de flecha), cisternas de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas (flechas)

Fig 10 g y h.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo normal de luz. Experimentos realizados a las 23:00 horas. g) pinealocitos (asteriscos), donde se observa el núcleo celular (N). h) vesículas (asterisco) y ribosomas libres (flechas).







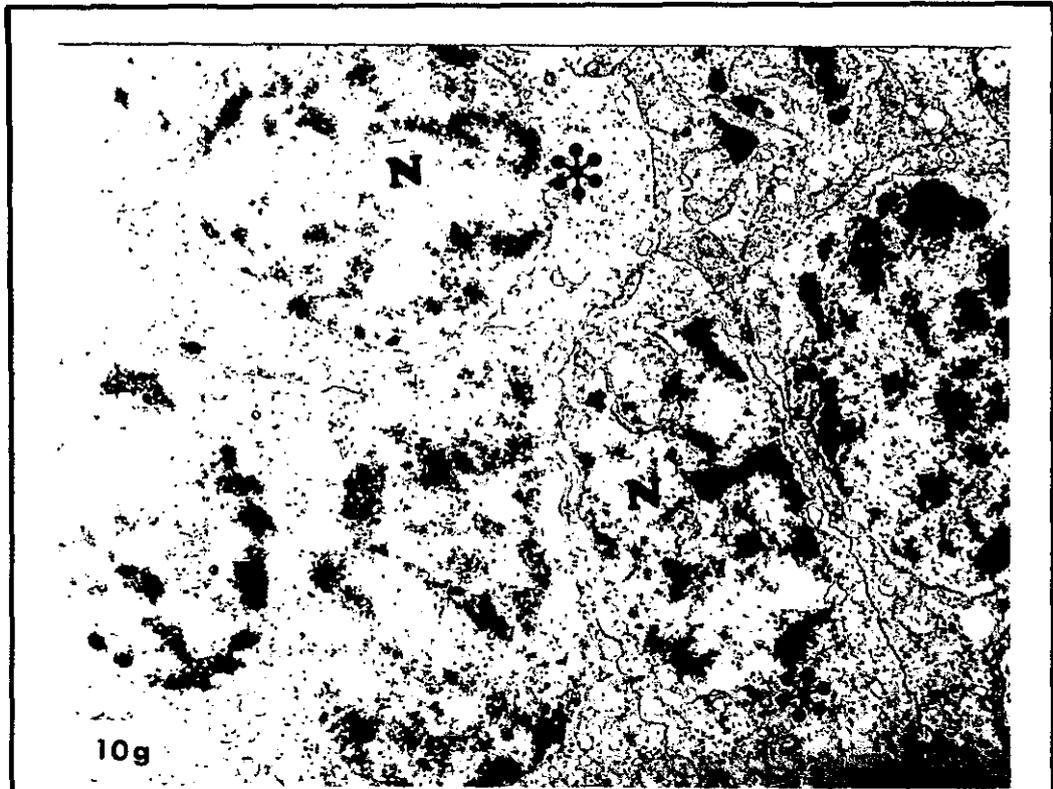
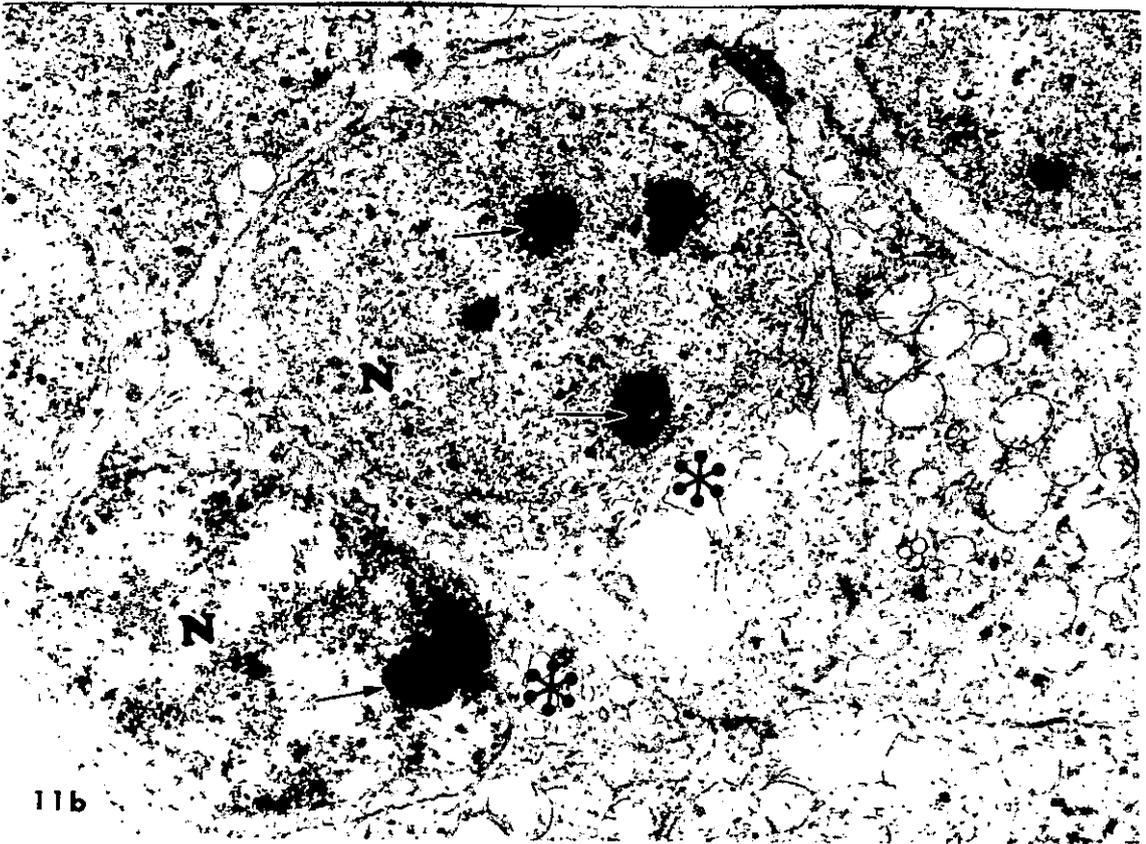


Fig 11 a y b.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de luz constante. Experimentos realizados a las 11:00 horas. a) pinealocito (asterisco), núcleo celular (N), nucléolo (punta de flecha), cúmulos de cisternas de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas (flechas). b) pinealocitos (asteriscos), núcleo celular (N), nucléolos (flechas).

Fig 11c y d.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de luz constante. Experimentos realizados a las 23:00 horas. c) pinealocitos (asterisco), núcleo celular (N). d) núcleo celular (N), envoltura nuclear (flechas pequeñas), cromatina nuclear (asterisco) y cisternas de retículo endoplásmico rugoso (flechas grandes).



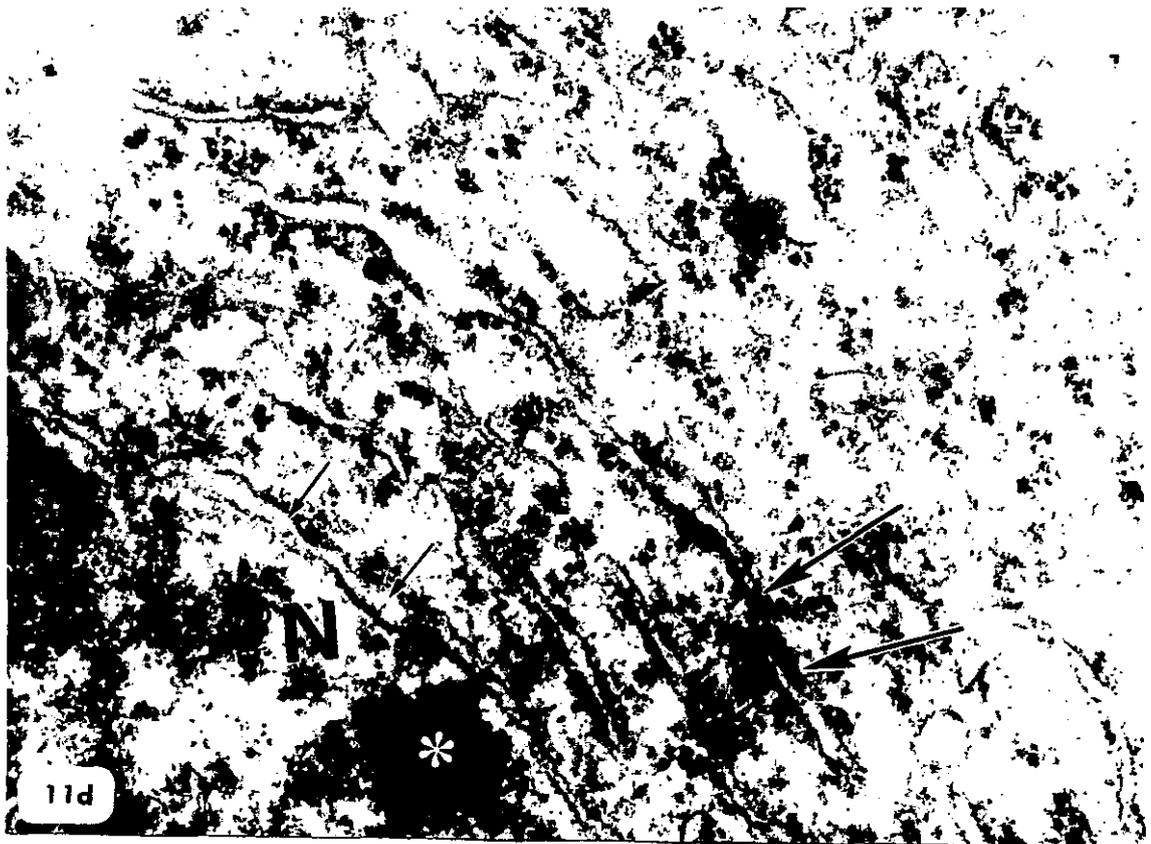
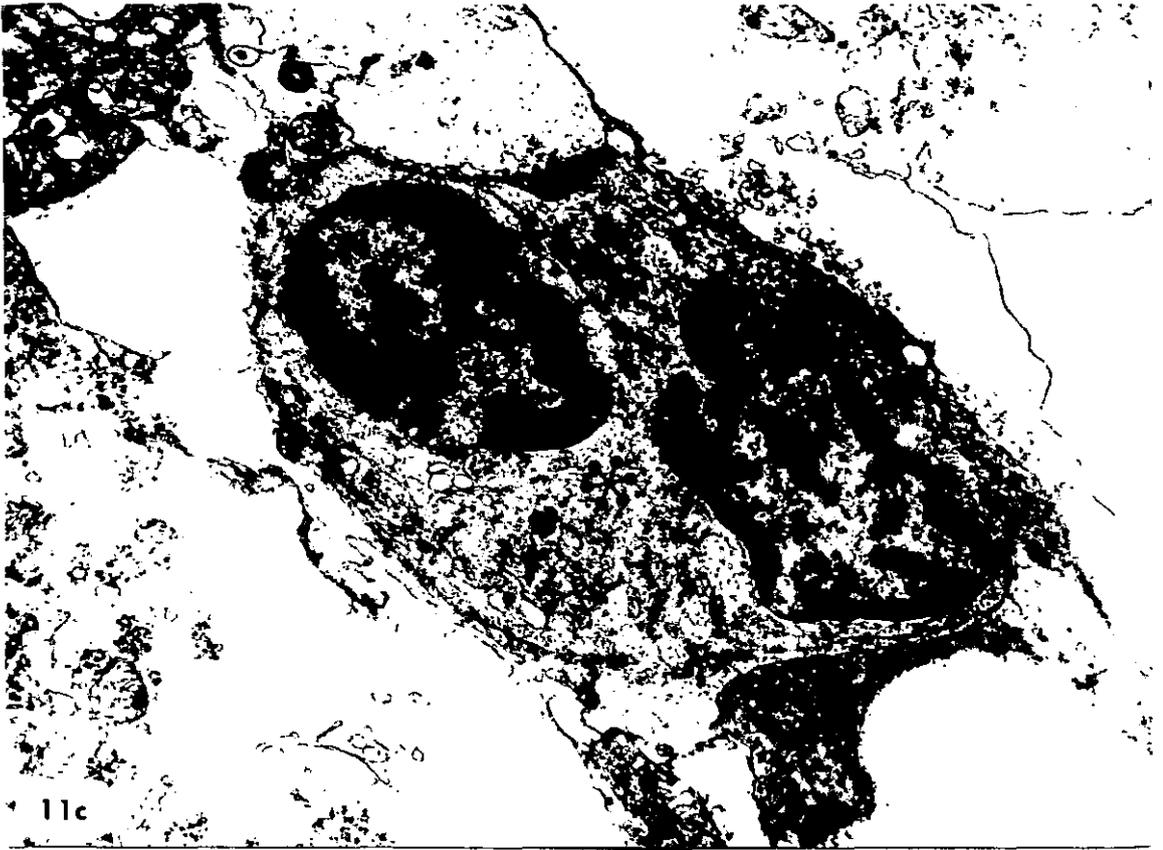


Fig 12 a y b.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extracto orgánico de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de oscuridad constante. Experimentos realizados a las 11:00 horas. a) pinealocito, núcleo celular (N), envoltura nuclear (puntas de flecha), vesículas con centro denso (flechas grandes), cisternas del retículo, así como ribosomas libres (flechas pequeñas). b) Pinealocitos (asteriscos), donde se detecta el núcleo celular (N).

Fig 12 c y d.

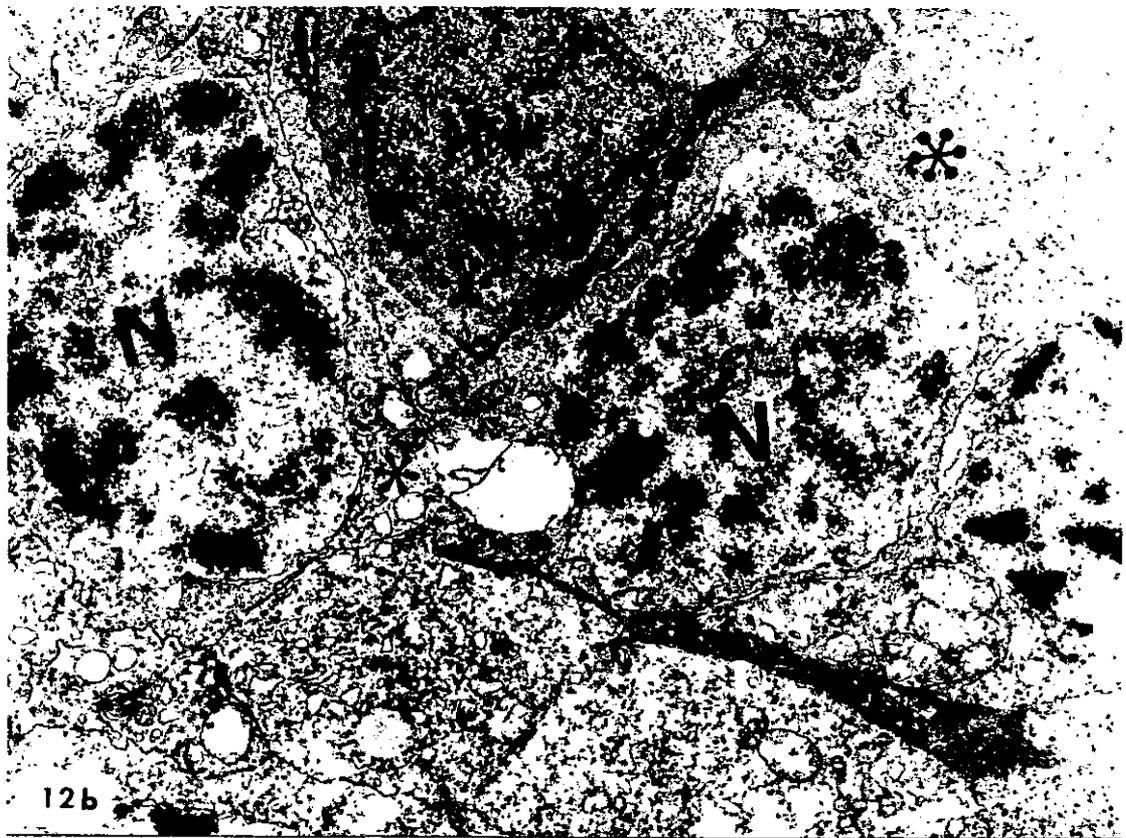
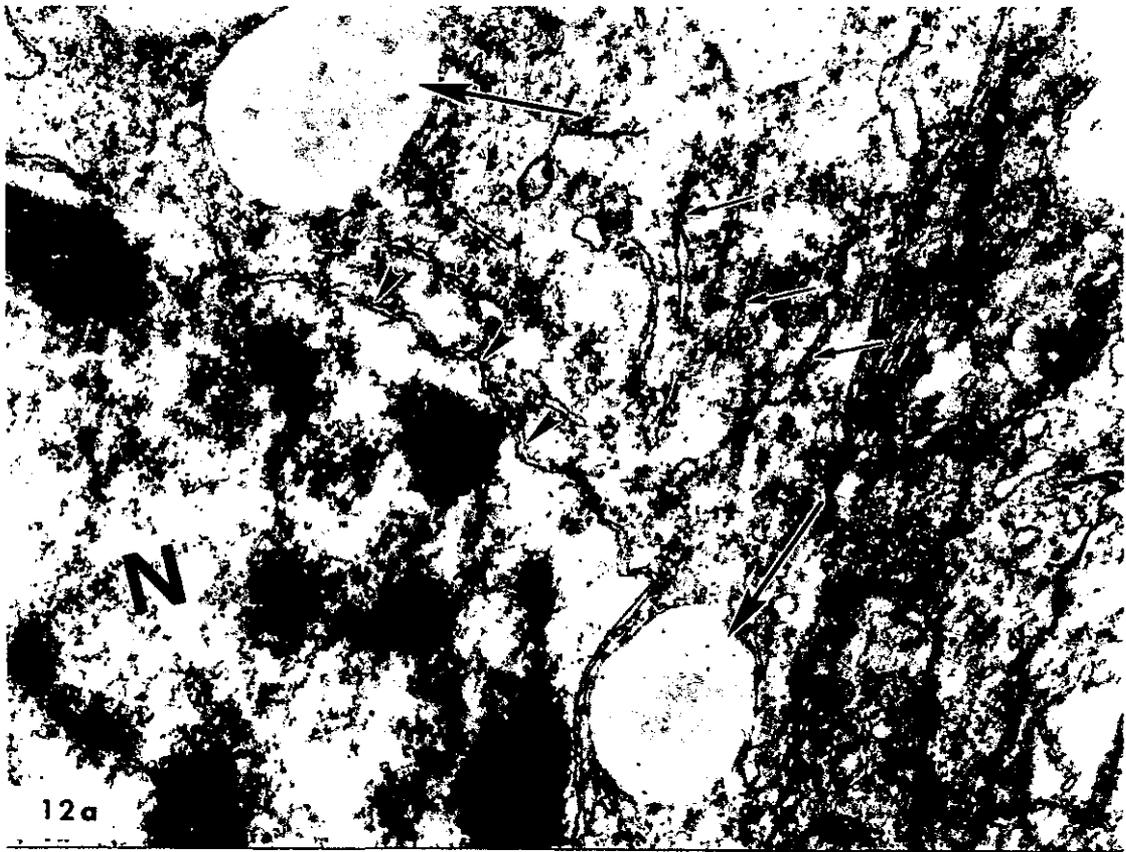
Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de oscuridad constante. Experimentos realizados a las 23:00 horas. c) pinealocitos (asteriscos), núcleo celular (N). d) Cisternas de retículo endoplásmico rugoso (flechas grandes) y ribosomas (flechas pequeñas).

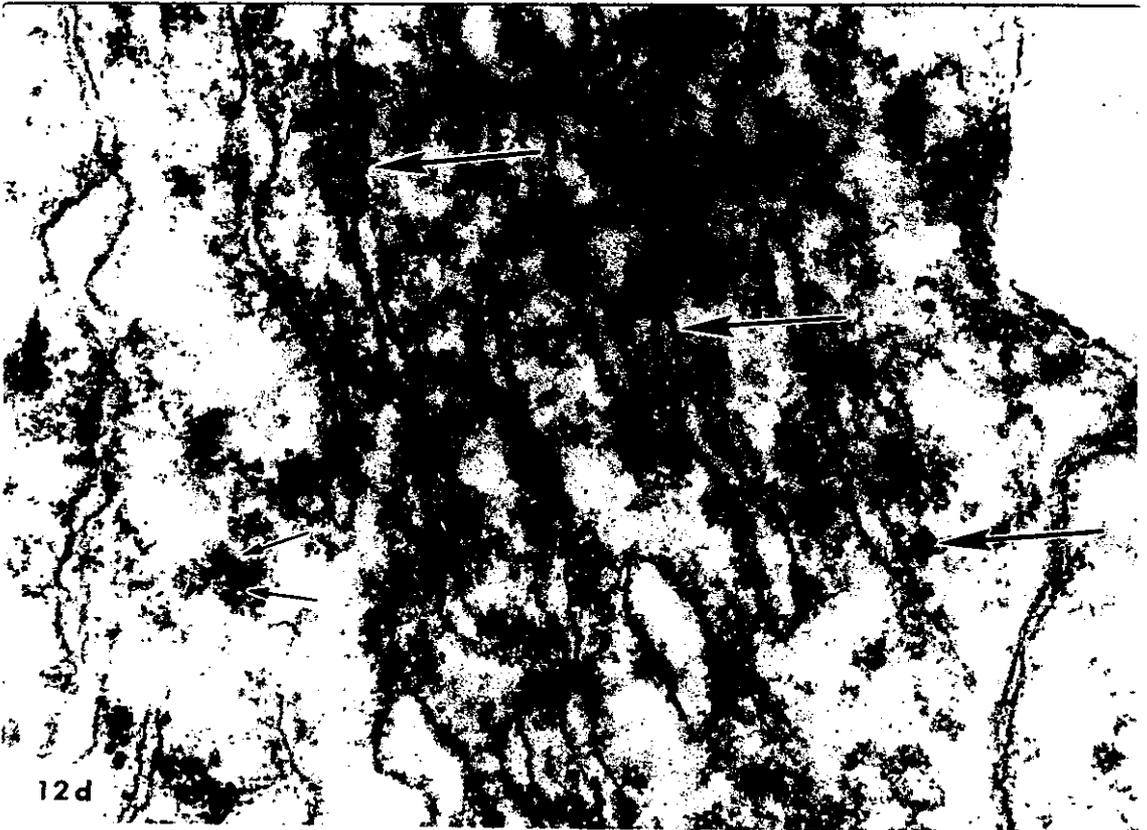
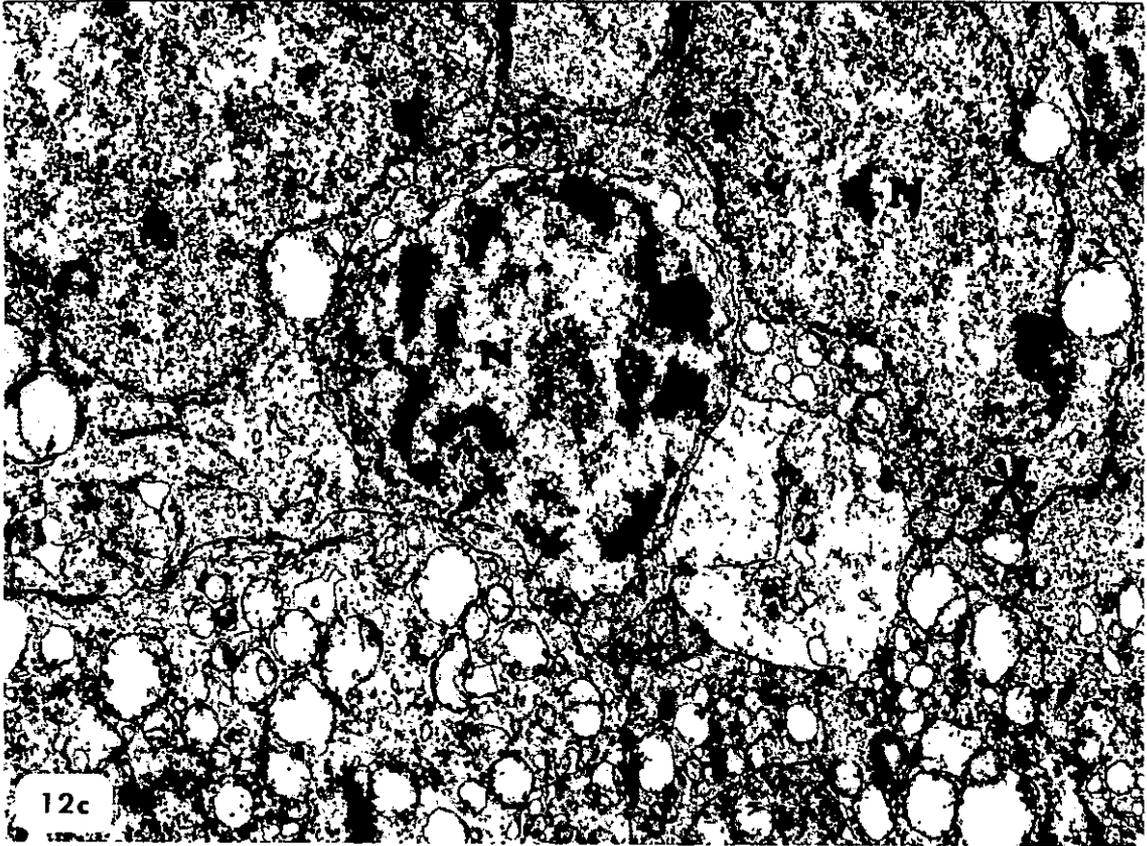
Fig 12 e y f.

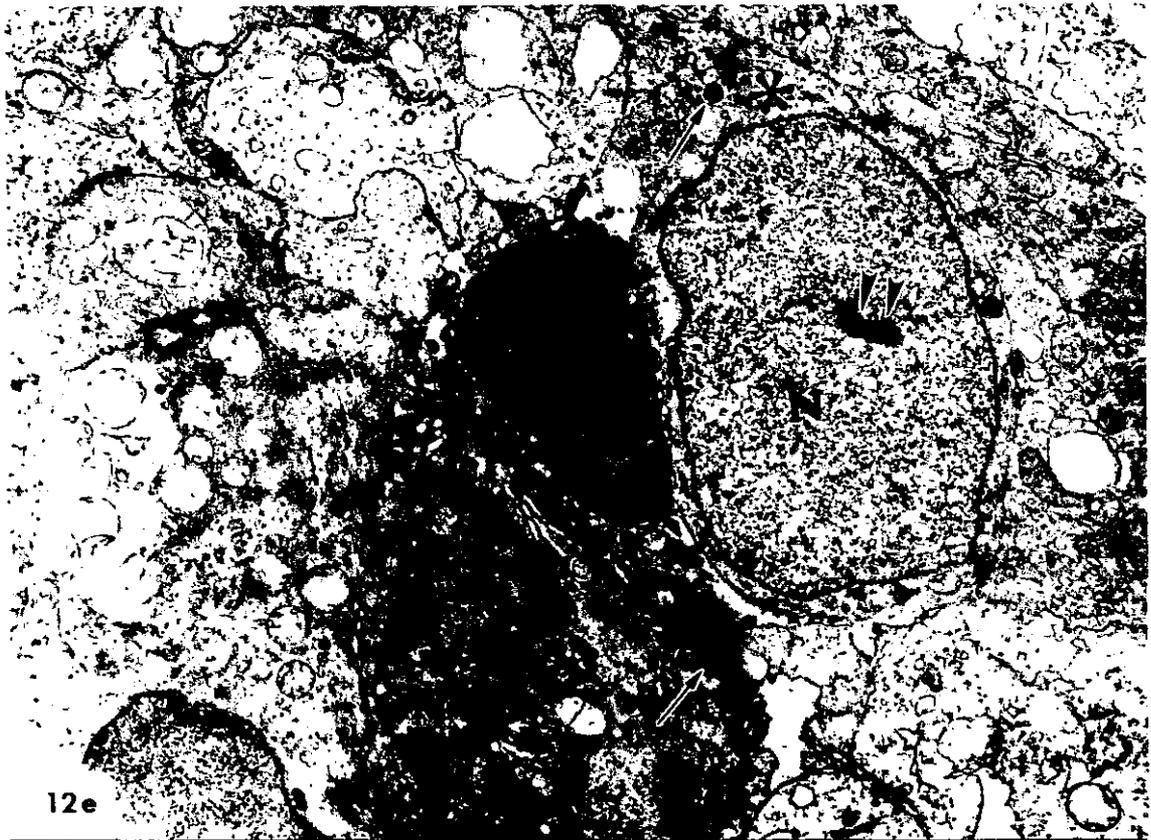
Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de oscuridad constante. Experimentos realizados a las 11:00 horas. e) pinealocitos (asteriscos), núcleo celular (N), nucléolo (puntas de flecha) y gránulos densos (flechas). f) pinealocito (asterisco), núcleo celular (N) y envoltura nuclear (puntas de flecha).

Fig 12 g y h.

Fotomicrografías de glándulas pineales incubadas con extractos acuosos de glándulas de Harder obtenidas bajo un ritmo de oscuridad constante. Experimentos realizados a las 23:00 horas. g) pinealocitos (asteriscos), núcleo celular (N), cisternas de retículo endoplásmico rugoso (flechas). h) núcleo celular (N), envoltura nuclear (puntas de flecha), cisternas de retículo endoplásmico rugoso (flecha grande) y agregados de ribosomas (flechas pequeñas).







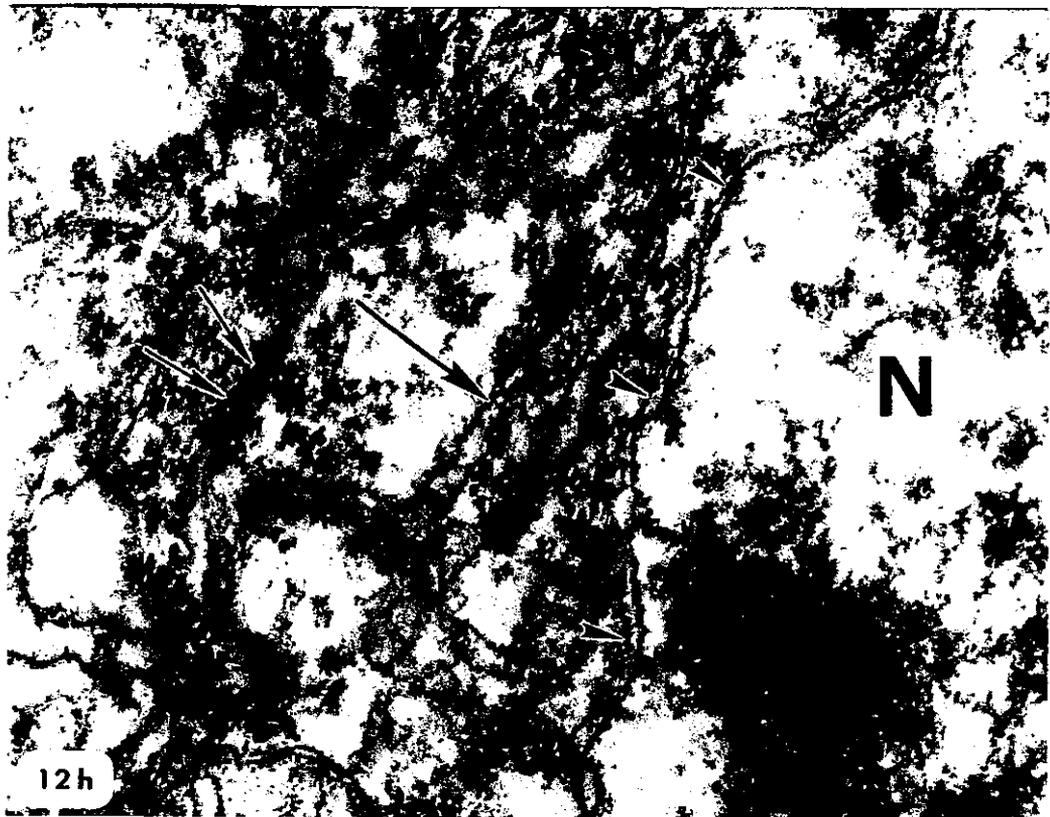
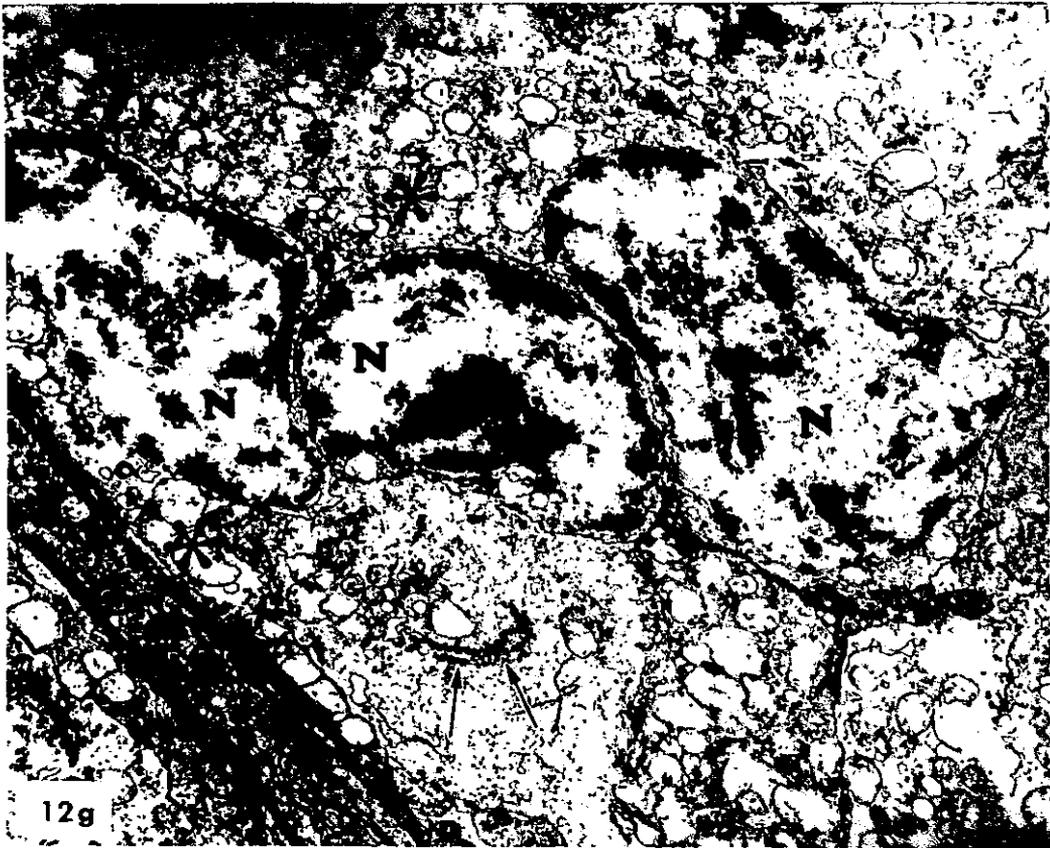


Fig 13 a-c.

Fotomicrografía de glándula pineal observada bajo microscopía electrónica de barrido. a) glándula pineal de rata de 15 días de desarrollo posnatal, en la que se observó: cuerpo pineal (PB); las flechas marcan la cisura que divide el cuerpo pineal en dos lóbulos; el tallo pineal (s) se apreció en la parte inferior de la foto, así como los plexos coroides (CP) por encima del tallo. b) corteza (C) de la glándula pineal (cuerpo pineal), se apreciaron perfectamente los límites (flechas). c) Médula de la glándula pineal (cuerpo pineal) en la que se apreció una organización a base de cordones (Cs), bien delimitados (flechas).

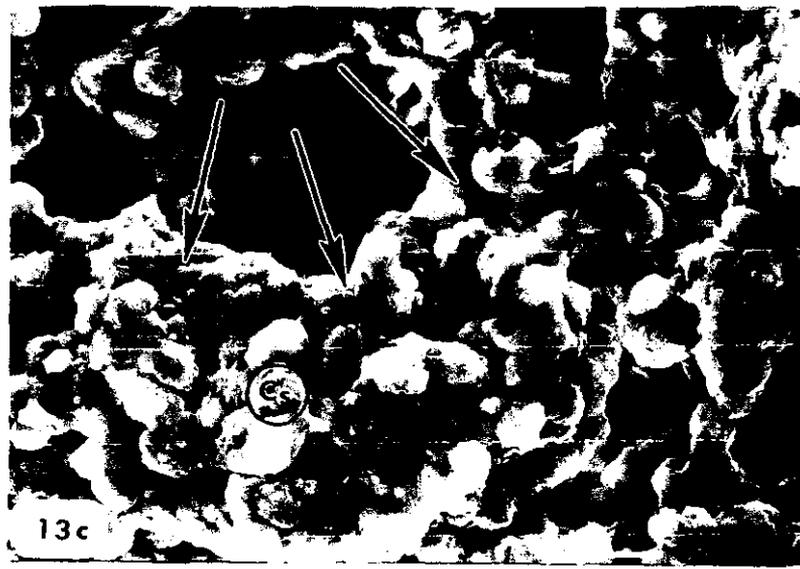
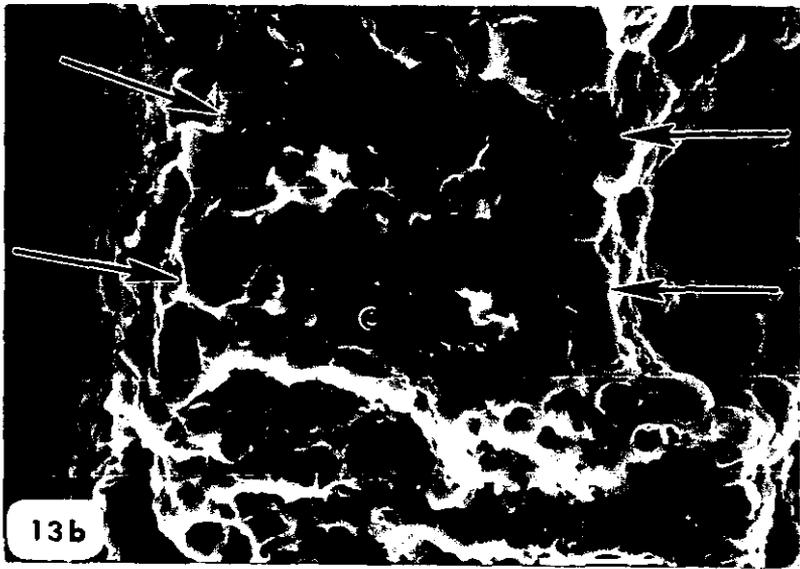
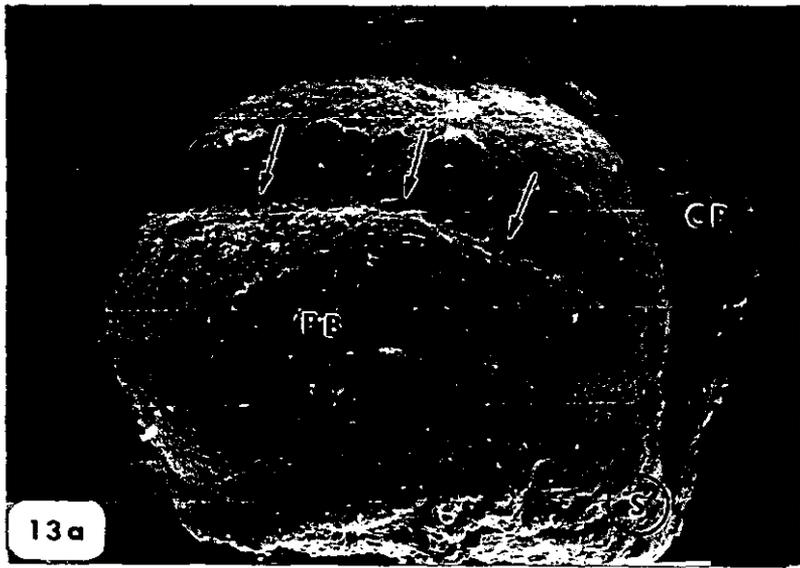
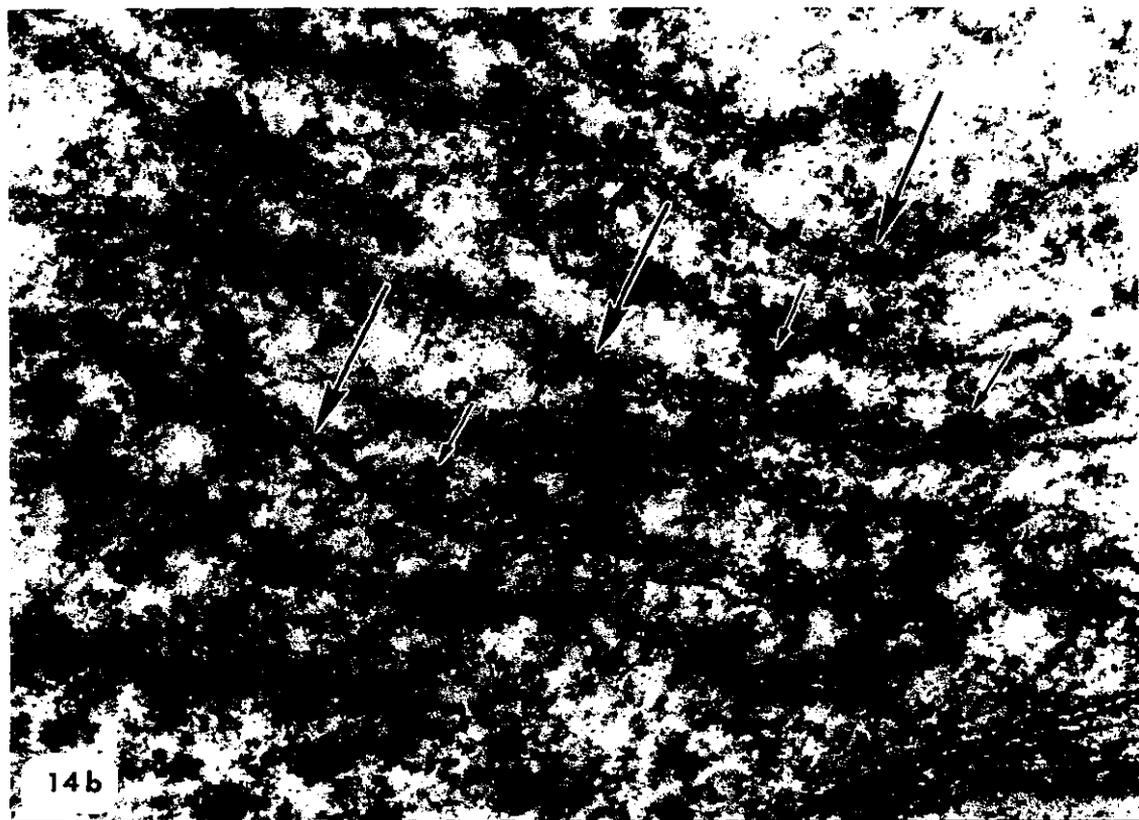
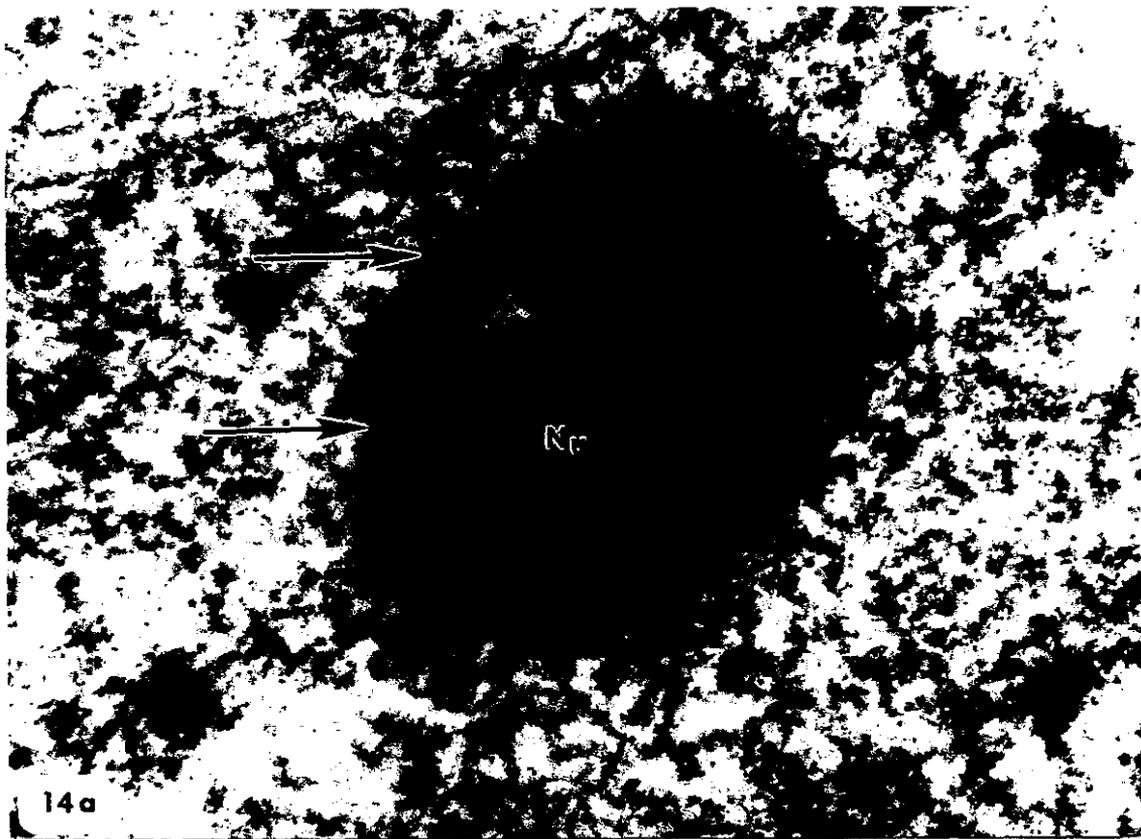


Fig 14 a-b.

Fotomicrografías de organelos de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos. a) nucléolo prominente (Nu) (flechas); b) sistemas de retículo endoplásmico rugoso (flechas grandes) y ribosomas libres (flechas pequeñas).

Fig 14 c-d.

Fotomicrografías de organelos de glándulas pineales incubadas con extractos orgánicos. c) vesículas con núcleo denso (V), así como ribosomas (flechas). d) núcleo celular (N), envoltura nuclear (puntas de flecha), vesículas con núcleo denso (V) y cisternas de retículo endoplásmico rugoso (flechas).



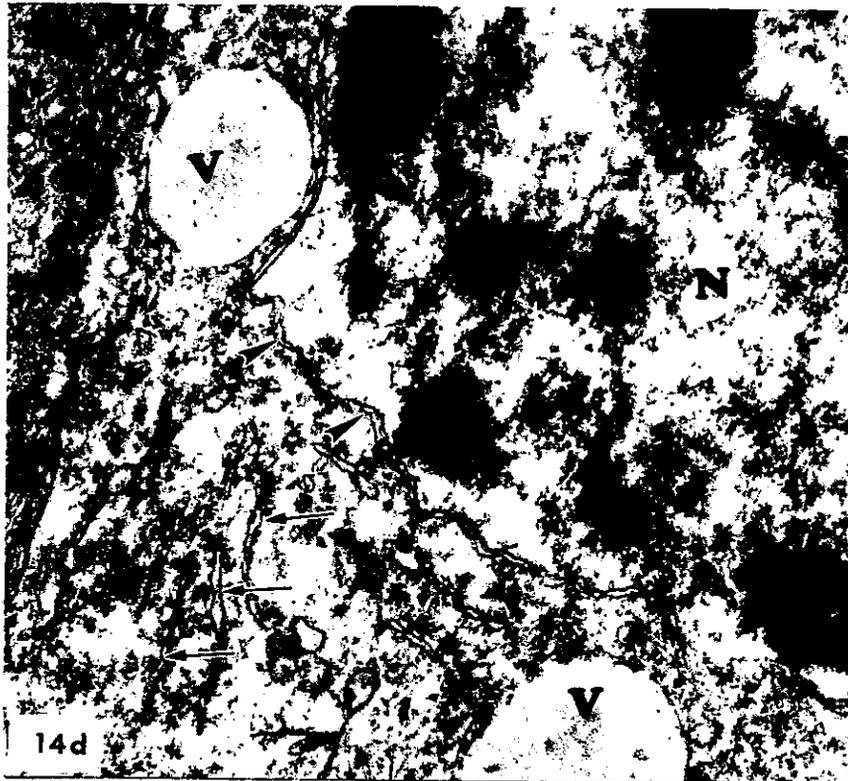
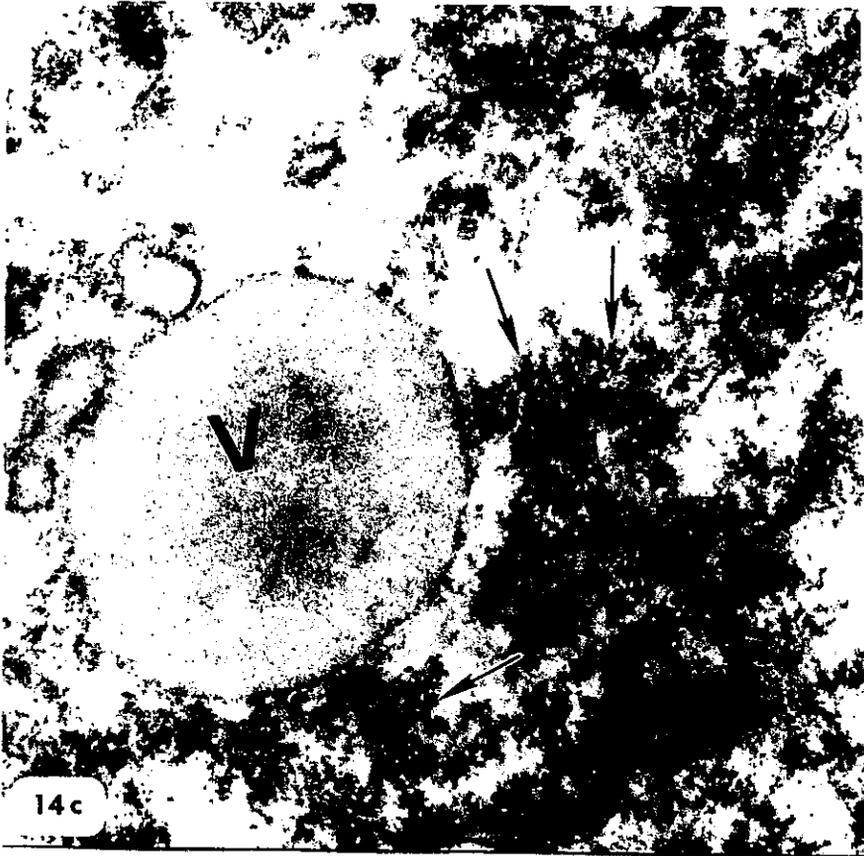


Tabla 1.

**Relación de organelos y componentes celulares presentes
En pinealocitos incubados con extractos acuosos de
glándula de Harder.**

	Grupo I Ritmo Normal		Grupo II Luz Constante		Grupo III Oscuridad Constante	
	11 h	23 h	11 h	23 h	11 h	23 h
1. Núcleo	X	X	X	X	X	X
2. Nucleolo	X	X	X	X	X	X
3. Retículo endoplásmico rugoso	X	X	X	X	X	X
4. Retículo endoplásmico liso	X	X	X	X	X	X
5. Aparato de Golgi	X	X	X	X	X	X
6. Mitochondria	X	X	X	X	X	X
7. Lisosomas	X	X	X	X	X	X
8. Cintas sinápticas	X	X	X	X	X	X
9. Vesículas de centro denso	X	X	X	X	X	X
10. Vesículas claras	X	X	X	X	X	X
11. Gotas de lípidos	X	X	X	X	X	X
12. Glucógeno	X	X	X	X	X	X

NOTA:

Se observaron 10 rejillas de cada grupo (5 por tiempo), de estas se analizaron 20 pinealocitos (10 por tiempo). Se toma por incremento el doble de los organelos observados.

Presencia: X

Incremento: XX

Tabla 2.

Relación de organelos y componentes celulares presentes
En pinealocitos incubados con extractos orgánicos de
glándula de Harder.

	Grupo I Ritmo Normal		Grupo II Luz Constante		Grupo III Oscuridad Constante	
	11 h	23 h	11 h	23 h	11 h	23 h
1. Núcleo	X	X	X	X	X	X
2. Nucleolo	X	XX	X	X	X	XX
3. Retículo endoplásmico rugoso	X	XX	X	X	X	XX
4. Retículo endoplásmico liso	X	X	X	X	X	X
5. Aparato de Golgi	X	X	X	X	X	X
6. Mitocondria	X	X	X	X	X	X
7. Lisosomas	X	X	X	X	X	X
8. Cintas sinápticas	X	XX	X	X	X	XX
9. Vesículas de centro denso	X	XX	X	X	X	XX
10. Vesículas claras	X	XX	X	X	X	X
11. Gotas de lípidos	X	X	X	X	X	X
12. Glucógeno	X	X	X	X	X	X

NOTA:

Se observaron 10 rejillas de cada grupo (5 por tiempo), de estas se analizaron 20 pinealocitos (10 por tiempo). Se toma por incremento el doble de los organelos observados.

Presencia: X

Incremento: XX

Lista de artículos publicados durante el tiempo del desarrollo de mi tesis en el que incluyo solo lo relacionado con glándula pineal y glándula de Harder, en revistas internacionales (Inglés).

1. Effects of Harderian gland extracts under different light conditions, on the pineal melatonin concentration *in vitro studies*.

G.G. Ortiz, A. Feria-Velasco, M.I. Pablos, T. Agapito-Serrano, D. Acuña-Castroviejo, J.J. García and R. J. Reiter. *J. Pineal Research*: Aceptado Agosto 1998.

2. Effects of Melatonin on the Harderian gland of lipopolysaccharide treated rats: morphological observations.

GG Ortiz, A Coto-Montes, OK Bitzer-Quintero, MA Falcón-Franco, L Ruiz-Rizo, A Bravo-Cuellar, RJ Reiter, A Feria-Velasco. *Biomedicine & Pharmacotherapy*: Aceptado Noviembre 1998.

3. Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice.

D. Melchiorri, G.G. Ortiz, R.J. Reiter, E. Sewerynek, W.M.U. Daniels, M.I. Pablos, G. Nistico. *Toxicology letters* 95: 103-108 (1998).

4. Rhythms of glutathion peroxidase and glutathion reductase in brain of chick and their inhibition by light.

Marta I. Pablos, Russel J. Reiter, Genaro G. Ortiz, Juan M. Guerrero, María T. Agapito-Serrano, Jin-ing Chuang and Ewa Sewerynek. *Neurochemistry International*. 32: 69-75 (1998)

5. Melatonin reduces the increase in 8-hydroxy-deoxyguanosine levels in the brain and liver of kainic acid-treated rats.

Lei Tang, Russel J. Reiter, Zhong-Ren li, Genaro G. Ortiz, Byung Pal Yu and Joaquín J. García. *Molecular and cellular biochemistry* 178: 299-303 (1998)

6. Melatonin Enhances Tamoxifen's Ability to Prevent the Reduction in Microsomal Membrane Fluidity Induced by Lipid Peroxidation.

J.J. García¹, R.J. Reiter¹, G.G. Ortiz¹, C.S. Oh¹, L. Tang¹, B.P. Yu^{1,2}, G. Escames¹,

¹Department of Cellular and Structural Biology and ²Department of Physiology, University of Texas Health Science Center, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, Texas 78284, USA.

J. Membrane Biol. 162,59-65 (1998)

7. Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil.

Guerrero JM, Reiter RJ, Ortiz GG, Pablos MI, Sewernynek E, Chuang J-I. *J. Pineal Res.* 1997; 23:24-31.

8. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates.

Escames G; Guerrero JM; Reiter-RJ; García-JJ; Muñoz-Hoyos-A; Ortiz-GG. *Neurosci-Lett.* 1997 Jul 25; 200(3): 147-50.

9. Acutely Administered Melatonin reduces Oxidative Damage in Lung and brain induced by hyperbaric oxygen.

Marta I. Pablos, Russel J. Reiter*, Jin-Ing Chuang, Genaro G. Ortiz, Juan M. Guerrero, Ewa Seweryneck, María T. Agapito, Daniela Melchiorri, Richard Lawrence and Susan M. Deneke.

J-Appl-Physiol. 1997 Aug; 83(2): 354-8.

10. Oth Melatonin and a putative nuclear melatonin receptor agonist CGP 52608 stimulate glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in mouse brain *in vivo*.

Marta I. Pablos, Juan M. Guerrero, Genaro G. Ortiz, Maria T. Agapito and Russel J. Reiter.

Neuroendocrinology Letters Vol. 18 (1997) No. 2/3.

11. Melatonin Protective against MPTP-Induced striatal and Hippocampal lesions.

Dario Acuña-Castroviejo, Ana Coto-Montes, M. Gaia Monti, Genaro G. Ortiz and Russel J. Reiter.

Life Sciences, Vol. 60, No. 2, pp. PL23-29, 1997.

12. Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats *in vivo*.

Daniel Melchiorri, Ewa Sewerynek, Russel J. Reiter. Genaro G. Ortiz, Burkhard Proeggeler & Giuseppe Nistico.

British Journal of Pharmacology (1997), 121,264-270.

13. Expression of the Mel_{1a}-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen.

David Pozo, Mario Delgado, José M. Fernández-Santos, Juan R. Calvo, Rosa P. Gomariz, Inés Martín-Lacave, Genaro G. Ortiz and Juan M. Guerrero.

FASEB Journal 11, 466-473 (1997).

14. Lipopolysaccharide-induce DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin.

Ewa Sewerynek, Genaro G. Ortiz, Russel J. Reiter, Marta I. Pablos, Daniela Melchiorri, William M. U. Daniels.

Molecular and Cellular Endocrinology 117 (1996) 183-188.

15. Nocturnal decreases in nitric oxide and cyclic GMP contents in the chick brain and their prevention by light.

Juan M. Guerrero, Marta I. Pablos, Genaro G. Ortíz, Maria T. Agapito and Russel J. Reiter.

Neurochem. Int. Vol. 29, No. 4, pp. 417-421, 1996.

16. Oxidative Damage in the Liver Induced by Ischemia Reperfusion: Protection by Melatonin.

Ewa Sewerynek, Russel J. Reiter, Daniela Melchiorri, Genaro G. Ortiz and Andrzej Lewinski.

Hepato-Gastroenterology 43 (1996), (pages 898-905).

17. Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin.

Ewa Sewerynek, Daniela Melchiorri, Russel J. Reiter, Genaro G. Ortíz, Andrzej Lewinski.

European Journal of Pharmacology

Environmental Toxicology and Pharmacology Section 293 (1995) 327-334.

18. Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6 phosphatase activity.

Daniels WMU, Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Pablos MI, Ortíz GG.

J. Pineal Res. 1995: 19:1-6.

19. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant.

Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortíz GG, Acuña-Castroviejo D.

J. Pineal Res 1995:18:1-11.

20. Time Course of the Melatonin-Induced Increase in Glutathione Peroxidase Activity in Chick Tissues.

Marta I. Pablos, Jih-ing Chuang, Russel J. Reiter, Genaro G. Ortíz, William M:U. Daniels, Ewa Sewerynek, Daniela Melchiorri, Burkhard Poeggeler.

21. Oxidative Changes in the Liver, Brain and Lens of Lipopolysaccharide-Treated Rats¹.

Ewa Sewerynek, Mitsushi Abe, Lidun Chen, Genaro G. Ortíz and Russel J. Reiter.

Archives of Medical Research Volume 26, Suppl.pp.S109-S115, 1995.

22. Melatonin reduces H₂O₂-induced lipid peroxidation in homogenates of different rat brain regions.

Sewerynek E, Melchiorri D, Ortíz GG, Poeggeler B, Reiter RJ.

J. Pineal Res. 1995:19:51-56.

Lista de artículos publicados durante el desarrollo de mi tesis en el que incluyo solo lo relacionado con gándula pineal y glandula de Harder (Español).

1. La glándula de Harder: un transductor neuroinmunoendocrino.

Genaro G. Ortiz, Oscar K. Bitzer-Quintero, Marco A. Falcón-Franco, Russel J. Reiter, Alfredo Fera-Velasco.

Arch. Neurocién. (Méx.) Vol. 2, No. 4: 274-281, 1997.

2. Breve introducción a la neuroinmunología.

Oscar K. Bitzer Q, Genaro Gabriel Ortiz.

Arch. Neurocién (Méx) Vol. 2. No. 3:177-181, 1997.

3. Glándula pineal y patología infantil: interés clínico y perspectivas futuras.

Antonio Muñoz Hoyos, A. Molina Carballo, G. Escames, J:J:García, G. Ortiz, J.A. Molina Font.

Arch. Neurocienc(Méx), Vol. 2, No. 2:258-268, 1997.

4. Producción de óxido nítrico y su modulación en el sistema inmune y el sistema nervioso.

David Pozo, Oscar K. Bitzer-Quintero, Carmen Osuna, Antonio García-Pergañeda, Juan Ramón Calvo, Genaro Gabriel Ortiz, Juan Miguel Guerrero.

Arch Neurociencias (Mex) 3(2): 84-94 (1998).

JOURNAL OF PINEAL RESEARCH

A multidisciplinary journal devoted to
the publication of experimental and clinical
findings related to the pineal gland

EDITOR-IN-CHIEF

Russel J. Reiter, PhD
Department of Cellular and
Structural Biology
The University of Texas
Health Science Center at San Antonio
7703 Floyd Curl Drive
San Antonio, TX 78284-7762 USA
FAX (210) 567-6948
PHONE (210) 567-3859

August 6, 1998

To Whom It May Concern:

This is to notify you that the manuscript entitled "Effects of Harderian gland extracts under different light conditions, on the pineal melatonin concentration *in vitro* studies" under the authorship of G.G. Ortiz, A. Feria-Velasco, M.I. Pablos, T. Agapito-Serrano, D. Acuna-Castroviejo, J.J. Garcia and Russel J. Reiter. has been received and reviewed for the Journal. After revision, the paper was re-evaluated and accepted for publication. It will be published forthwith.

Sincerely,



Russel J. Reiter, Ph.D.
Editor-in-Chief,
Journal of Pineal Research

Effects of Harderian gland extracts obtained under different light conditions, on the pineal gland melatonin concentrations: *in vitro* studies.

Genaro G. Ortiz^{1,2}, Alfredo Feria-Velasco³, Marta I. Pablos¹, Teresa Agapito-Serrano¹, Juan M. Guerrero¹, Darío Acuña-Castroviejo¹, Joaquín J. García¹. And Russel J. Reiter¹.

¹ Department of Cellular and Structural Biology, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio Tx.

² División de Neurociencias/Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBO-IMSS).

³ División de Patología Medioambiental y Biotecnología. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Guadalajara, Jalisco. México.

Abstract.

The Harderian gland are large tubulo-alveolar organs located at the orbital cavity of many vertebrates. It appears to be a multipotent organ with many proposed functions. It is well documented that the Harderian gland influence the pineal gland activity. In the early states of development serotonin and melatonin synthesis is regulated by an extrapineal system in which the Harderian gland play an important role. The aim of the present work was to study the effects of different Harderian gland extracts obtained in different light conditions under melatonin concentration *in vitro*. We used two different extracts (aqueous and organic) obtained from Harderian glands of 15 days old male rats under: I) normal rhythm; II) constant darkness; III) constant light. Pineal glands from 15 days old male rats, were incubated 2 or 4 h in polystyrene dishes at 11:00 and 23:00 h with the aqueous or organic Harderian glands extracts (I, II and III). A significant difference was observed in the melatonin concentration in the pineal glands incubated with organic extracts obtained under normal rhythm, in comparison with those obtained under constant dark or light, and independent of adrenergic stimulation.

Key words: Harderian gland, pineal gland, extracts, melatonin, Isoproterenol, noradrenalin.

Address reprint request to Dr. Russel J. Reiter.
University of Texas Health Science Center at San Antonio.
Department of Cellular and Structural Biology.
7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, Tx 78284-7762.

Introduction.

The pineal gland and its principal hormone, melatonin, has been demonstrated to influence a wide variety of mammalian endocrine and no endocrine organs (Lerner et al., 1958; Cardinali, 1981 and Reiter, 1997). In the pineal gland, tryptophan is converted to melatonin in a multi-step biosynthetic pathway (Wurtman et al., 1983; Cardinali et al., 1987; Reiter, 1991). The pineal gland functions as a neurohormone transducer, accepting photic information from retinae and converting this neural message into chemical mediators, in which the best understood is the melatonin (Reiter, 1983; Reiter, 1984; Gern and Karn, 1985; Reiter, 1991).

The existence of pineal-Harderian interactions was proposed by Wetterberg (1970a,b). These authors showed, that Harderian glands removal during early development, prevented light-induced effects on pineal indole-amine metabolism. However, Harderectomy of adults rats was without effects (Panke, 1979; Reiter, 1983). In Syrian Hamsters, the removal of Harderian gland have been decrease the pineal melatonin concentration at night (Panke et al, 1979). Pinealectomy in rats increased melatonin levels in the Harderian glands without affecting the lights rhythms (Reiter et al, 1983). Effects on the pineal synthetic metabolism was demonstrated (Panke et al, 1979), when the Harderian glands was removed showing a decrease of melatonin levels at night.

The relationship between Harder-pineal glands is well supported, but not complete understood their functions and regulations, specially during the early states of the development (Feria-Velasco et al., 1978; Vollrath, 1986; Veck, 1986).

The aim of the present work was to study the effect of the Harderian gland extracts (acuous and organic) on the pineal gland concentrations, in 15 days old rats, *in vitro*.

Materials and methods.

Chemicals.

All chemical (melatonin, DMEM, isoproterenol and sodium phosphate) and Kits (Amicyl-testTM, Katakombi for adrenaline and noradrenaline) were of the highest quality available and were obtained from Sigma (St. Louis, MO) & Polysciences (Warrington, PA), and Gesellschaft (Hamburg, Germany).

Animals.

Female pregnant rats (18 days) Sprague-Dawley were obtained from Harlam (Houston, Tx) and CIBO-IMSS (Guadalajara, México) housed one animal per cage in plexiglass cages. The animal room were window less with automatic temperature control (22 ± 2 °C) and light (light on 7:00 and off 21:00; 14 h light and 10 h dark). The rats received standard laboratory chow and water *ad libitum*.

Groups.

New born rats were divided in four groups; I.- Extracts from Harderian glands in rats under normal rhythm during 15 days; II.- extracts from Harderian glands in rats under 15 days constant light during 15 days; III.- extracts from Harderian glands in rats under constant darkness during 15 days; IV.- pineal gland group, rats under normal rhythm during 15 days. All the animals were maintained in optimal conditions with his mother across the experiment (each group was maintained during 15 days in special animal room light conditions) and sacrificed at 11:00 h and 12:00 h each. From the groups I, II and III the Harderian glands (n=30:180) were used in order to obtain the extracts (aqueous and organic). The group IV was used in order to obtain the pineal gland (n=50:200).

Harderian glands extracts:

Organic: Harderian gland were homogenized with wheaton overhead stirrer in ice-cool in chloroform methanol:ether. (2:1:1). The homogenate was centrifugated at 580 g

for 30 minutes at 4 °C. The supernatant was collected, evaporated, and resuspended in DMEM medium.

Acuous: Harderian gland were homogenized with wheaton overhead stirrer in ice-cool in phosposaline buffer. The homogenate was centrifugated at 580 g for 30 minutes at 4 °C. The supernatant was collected and resuspended in DMEM medium.

Noradrenaline assay:

All the extracts were tested for presence of noradrenaline using the Kit: Amicyl-test™, Katacombi by radioimmunoassay.

Procedure.

Pineal glands from 15 days old male rats under light rhythm (group IV), were obtained at 11:00 and 21:00 h in falcon polystyrene dishes (individually) and incubated in DMEM (Dulbecco's modification of eagle's medium) 270 µl with albumin 30 µl. We used one group with isoproterenol (1µm) and other with medium alone. The others groups (I, II and III) were incubated with Harderian-extracts (acuous and organic) during 2 and 4 h at 37 °C in flowing humidified air with 5 % CO₂-air.

Melatonin assay.

Melatonin content in the pineal gland incubated with Harderian gland extracts (acuous and organic) obtained under different liht conditions, isoproterenol group and the incubation media alone group were determined by radioimmunoassay using a Guilford antibody as decribed previously (Fraser et al., 1983).

Statistical analysis.

All the data were analysed by the one way analysis of variance (ANOVA). If the values were significant, the Student-Newman-Keuls test was used to compare the groups. The level of significance was accepted at $p < 0.05$.

Results.

Noradrenalin was detected only in the aqueous-Harderian gland extracts (fig. 1), the other groups did not show the presence of melatonin.

Melatonin contents are shown in the fig. 2 and fig. 3. Isoproterenol markedly increased the melatonin content in all experiments; the culture media exhibit the opposite effect. The pineal gland incubated with organic Harderian gland extracts obtained under normal rhythm and constant darkness exhibited high concentration of melatonin at 11:00 and 23:00 h both with 2 and 4 h of incubation. The pineal gland incubated with aqueous extracts also exhibited high melatonin contents in comparison with the culture media alone, both in 11:00 and 23:00 h experiments; we observed a significant increase of melatonin contents with 4 h of incubation in the 11:00 h experiments. The melatonin contents in the pineal glands incubated with the Harderian gland extracts obtained under constant light, exhibited the lowest values in comparison with the other groups; the pineal glands incubated with organic extracts exhibited low contents of melatonin (specially at 11:00 with 2 h of incubation). The melatonin contents in the pineal glands incubated with aqueous extracts obtained under constant dark was similar to normal rhythm, but the difference was low in comparison with organic extracts, the pineal glands incubated with aqueous extracts exhibited significant differences, these experiments also showed differences at 11:00 and 23:00 h and with 2 or 4 h of incubation.

Discussion.

The existence of pineal-Harderian gland interactions was proposed many years ago by Wetterberg (1970a,b), he showed that removal of the Harderian glands in neonatal rats prevented light-induced effects on pineal indole-amine metabolism.

The pineal gland has been shown to effect Harderian gland metabolism, this effect seems to be exerted by the photoperiodic influence on the pituitary-gonadal axis, pinealectomy in rats increased melatonin levels in the Harderian gland without affecting the day:night rhythm (Reiter et al., 1983). Pinealectomy in Syrian hamsters shifted the rhythm of one of the limiting enzymes in the melatonin synthesis N-acetyltransferase (NAT) without changing melatonin levels (Menendez-Pelaez et al., 1988); on the other hand, the Harderectomy in adult rats was ineffectual, the removal of Harderian gland have been shown to decrease the pineal melatonin concentration at night; it involves the possibility of a direct effect on pineal synthesis (Panke, 1979).

The interaction of the pineal-Harderian gland *in vivo*, is less understood specially during the development in rat. We studied the effects of Harderian gland extracts (aqueous and organic) during the early pineal development (*in vitro*). In the first experiment we incubated pineal glands of 3 and 7 days old rats, with different extracts obtained under different light conditions (I, II and III) and we do not observed statistical differences between age against groups studied (by biochemical methods). These effects were possible, because the differentiation of the pineal gland and the enzymes activity involved in the melatonin synthesis (specially NAT) will be expressed 7 postnatal day after. When we incubated the Harderian gland extracts with 15 days old pineal glands, we concluded the effects of the that Harderian gland extracts were able to stimulate the synthesis of the melatonin in pineal glands *in vitro*. In one part, these effect was independent of the noradrenergic stimuli (organic extracts). The incubation with isoproterenol exhibited high contents of melatonin, the isoproterenol is a β -adrenergic agonist, it stimulates a noradrenalin receptor and induces the synthesis of melatonin (Pangerl et al., 1990; Quang et al., 1992). The aqueous extract exhibits contents of noradrenalin, it explains in part the effect observed in those glands extracts incubated with aqueous extract of Harderian gland.

The effects observed with Harderian glands extracts obtained under normal rhythm, shown the most important levels of melatonin (specially the organic extracts). We believe that, in these effects it is involved the porphyrins; the porphyrins are the most important secretion of the Harderian gland (Rodríguez, 1991). Many studies were performed in which the paradigm was the analysis of the effects of the melatonin on the porphyrin synthesis (Shirama et al., 1987). These studies showed the effects of the Harderian gland on the melatonin contents of the pineal gland; we try to answer the question: if the Harderian gland has some compounds with effects on the pineal gland melatonin contents?, and the answer was: Yes; we believed that, and with *in vitro* studies we demonstrated these effects. We used two different extracts (acuous and organic) obtained under tree different rhythms: I= normal rhythm; II= constant light; and III= constant darkness, obtained also at 11:00 and 23:00 h and finally with 2 or 4 h of incubation. The use of differents rhythms, was in order to prove the light-transducer functions of the Harderian gland: i.e. the normal presence of the compounds (specially harderoporphyrins) in the Harderian gland was observed in normal rhythm. In other hand, the use of constant light and darkness, explain the low levels of lipids and enzymes involved in the synthesis of porphyrins and melatonin. These is the beginning of the experiments, in the early future we will try to explain the nature of the extracts and the effects, on the pineal gland in *in vivo* studies.

References.

- 1) Cardinali DP. Melatonin: A mammalian Pineal Hormone; *Endocrinology Review*. 2:327-346 (1981).
- 2) Cardinali DP, Vacas MI, Rosenstein RE, Etchegoyen GS, Keller-Sarmiento MI, Gonzalez-Solera C, and Pereira EN. Multifactorial control of Pineal Melatonin synthesis; an analysis through binding studies. *Advances in Pineal Research*. Reiter RJ and Fraschini F (eds). Johy Libbey & C. Ltd. pp 51-66 (1987).
- 3) Feria-Velasco A, Tapia-Arizmendi G, Malpica I. Effects of the environmental light conditions on the ultrastructure of the Harderian gland in the newborn rat. Biochemical correlation with the Pineal gland. *Arch Invest Med (Mex)*. 9(1):67-84 (1978).
- 4) Fraser S, Cowen P, Franklin M, Franey C, and Ardent J. Direct Radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clin. Chem*. 29:396-397 (1983).
- 5) Gern WA, and Karn CM. Evolution of Melatonin's functions and effects. In: *Pineal Research Reviews*, Reiter RJ (ed). Alan R. Liss, Inc. New York. Vol. I, pp 44-90 (1985)
- 6) Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, and Mori W. Isolation of Melatonin, the Pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80:2857-2858 (1958).
- 7) Menéndez-Peláez A, Reiter RJ, Guerrero JM, Santana C, Howes KA, and Gonzalez-Brito A. N-acetyltransferase activity and melatonin concentration in the Harderian gland of female Syrian hamster: alterations following either pinealectomy or bilateral superior cervical ganglioectomy. *Biochem. Arch*. 4:231-238 (1988).

- 8) Pangerl B, Pangerl A, and Reiter RJ. Circadian variation of adrenergic receptor in the mammalian pineal gland: a review. *J. Neural. Transm.* 81:17-30 (1990).
- 9) Panke ES, Reiter RJ, and Rollang MD. Effect of removal of the Harderian gland on pineal metabolism concentrations in the Syrian hamster. *Experientia.* 35:1405 (1979).
- 10) Quang WB, Movhir F, Reiter RJ, Rodriguez C, and Yang K. β -adrenergic and peptide N-terminal Histidine and C-terminal Isoleucine stimulation of N-Acetyl Transferase activity and Melatonin production in the cultured rat Pineal gland. *Endocrinology.* 130:2076-2081 (1992).
- 11) Reiter RJ, Richardson BA, Matthews SA, Lane SJ, and Ferguson BN. Rhythm in immunoreactive melatonin in the retina and Harderian glands of rats: persistence after pinealectomy. *Life. Sci.* 32:1229-1236 (1983).
- 12) Reiter RJ. Pineal indoles: Production, secretion and actions in Neuroendocrine perspectives , Vol. 3. RM MacLeod and EE Muller (eds). Elsevier, Amsterdam, pp 345-377 (1984).
- 13) Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of it's synthesis and of it's physiological interaction. *Endocrine Rev.* 12:151-175 (1991).
- 14) Reiter RJ. The Pineal Gland. In: Principles of Medical Biology. Vol. 10A. Molecular and Cellular Endocrinology. pp 145-164 (1997 a).
- 15) Reiter RJ. Melatonin. In: Encyclopedia of Human Biology. Second edition. Academic Press Inc. Pp 583-588 (1997 b).
- 16) Rodríguez-Colunga MJ, Fernandez C, Antolin I, Tolivia C, and Menéndez-Peláez A. Chronic administration of melatonin induces changes in porphyrins and in the histology of

male and female hamster Harderian gland: interrelation with the gonadal status. *J Pineal Res.* 11(1):42-48(1991).

17) Shirama K, Kohda M, Kohda M, and Hokano M. Effects of lighting conditions and of hormone replacement on the level of porphyrins in the rat Harderian gland. *J Endocrinol Invest.* 10(1):79-82 (1987).

18) Veck M, The Morphogenesis of the Mammalian Pineal Organ. In: The Pineal gland during the development: from fetus to adult. Gupta D and Reiter RJ (eds). Croona Helm Ltd. Australia. (1986).

19) Vollrath L. The posnatal differentiation of the mammalian Pineal complex. In: The Pineal gland during development: from fetus to adult. Gupta D and Reiter RJ (eds). Croona Helm Ltd. Australia. Pp 56-64 (1986).

20) Wetterberg L, Geller E, and Yuwiler A. Harderian gland: and extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats ?. *Science* 167:884-885 (1970a).

21) Wetterberg L, Yuwiler, Ulrich R, Geller E, and Wallace R. Harderian gland : influence on pineal hydroxiindole-o-methyltransferase activity on neonatal rats. *Science* 170:1194-1196 (1970 b).

22) Wurtman RJ, Axelrod J, and Phillips LS. Melatonin synthesis in the pineal gland: control by light. *Science* 142:1671-1693 (1983).

Legends.

Fig. 1.

Noradrenalin concentration in Harderian gland extracts.

This graph exhibited the presence of noradrenalin only in the Harderian gland acuous extracts, obtained under normal rhythm. No one of the other extracts exhibited the presence of noradrenalin.

Data was twice tested per group.

Group A= Harderian gland acuous extract: normal rhythm

B= Harderian gland organic extract: normal rhyhtm

C= Harderian gland acuous extract: constant light

D= Harderian gland organic extract: constant light

E= Harderian gland acuous extract: constant darkness

F= Harderian gland organic extract: constant darkness

Fig 2a.

Melatonin concentration (11h) 2h incubation.

This graphic exhibited 15 day old pineal glands incubated with: A= isoproterenol: positive control; B= media alone: negative control; C= acuous extract: normal rhythm; D= organic extact: normal rhythm; E= acuous extract: constant light; F= organic extract: constant light; G= acuous extract: constant darkness; H= organic extract: constant darkness.

Data are expressed as a means \pm S.E.M.

Fig 2b.

Melatonin concentration (11h) 4h incubation.

This graphic exhibited 15 day old pineal glands incubated with: A= isoproterenol: positive control; B= media alone: negative control; C= acuous extract: normal rhythm; D= organic extract: normal rhythm; E= acuous extract: constant light; F= organic extract: constant light; G= acuous extract: constant darkness; H= organic extract: constant darkness.

Data are expressed as a means \pm S.E.M.

Fig 3a.

Melatonin concentration (23h) 2h incubation.

This graphic exhibited 15 day old pineal gland incubated with A= isoproterenol: positive control; B= media alone: negative control; C= acuous extract: normal rhythm; D= organic extract: normal rhythm; E= acuous extract: constant light; F= organic extract: constant light; G= acuous extract: constant darkness; H= organic extract: constant darkness.

Data are expressed as a means \pm S.E.M.

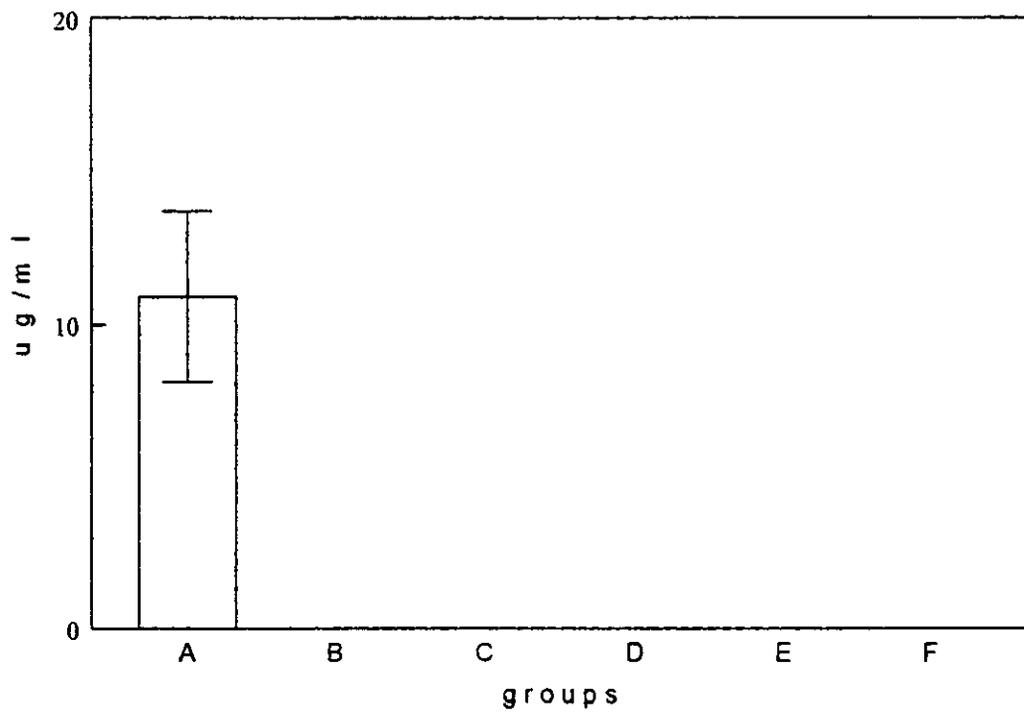
Fig 3b.

Melatonin concentration (23h) 4h incubation.

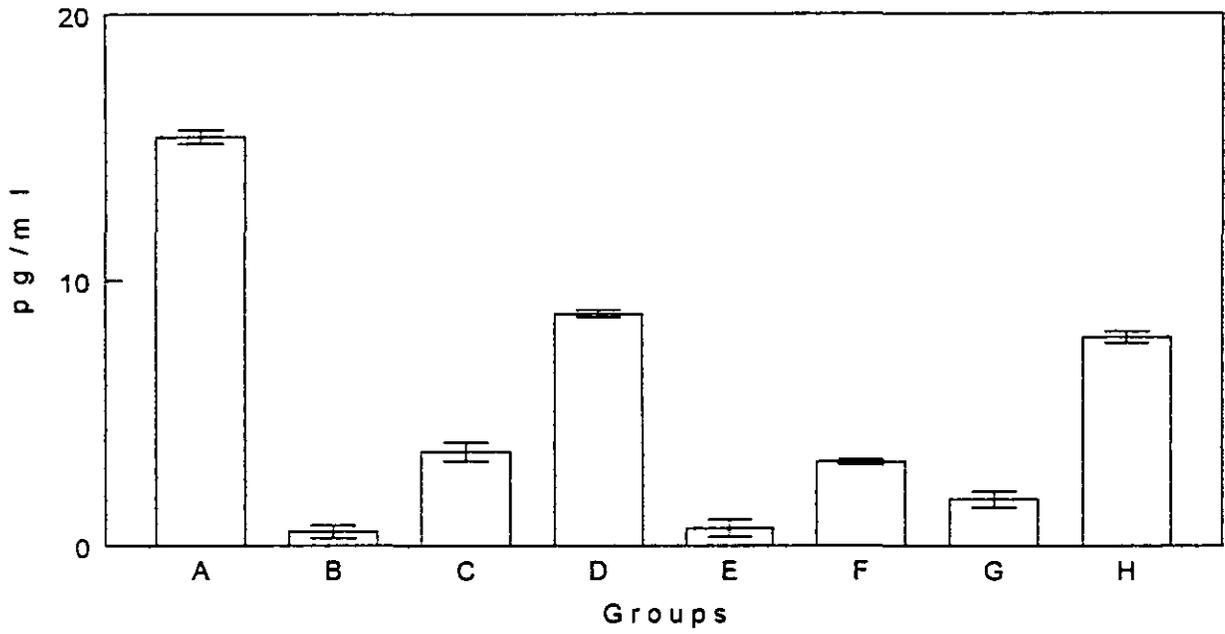
This graphic exhibited 15 day old pineal gland incubated with: A= isoproterenol: positive control; B= media alone: negative control; C= acuous extract: normal rhythm; D= organic extract: normal rhythm; E= acuous extract: constant light; F= organic extract: constant light; G= acuous extract: constant darkness; H= organic extract: constant darkness.

Data are expressed as a means \pm S.E.M.

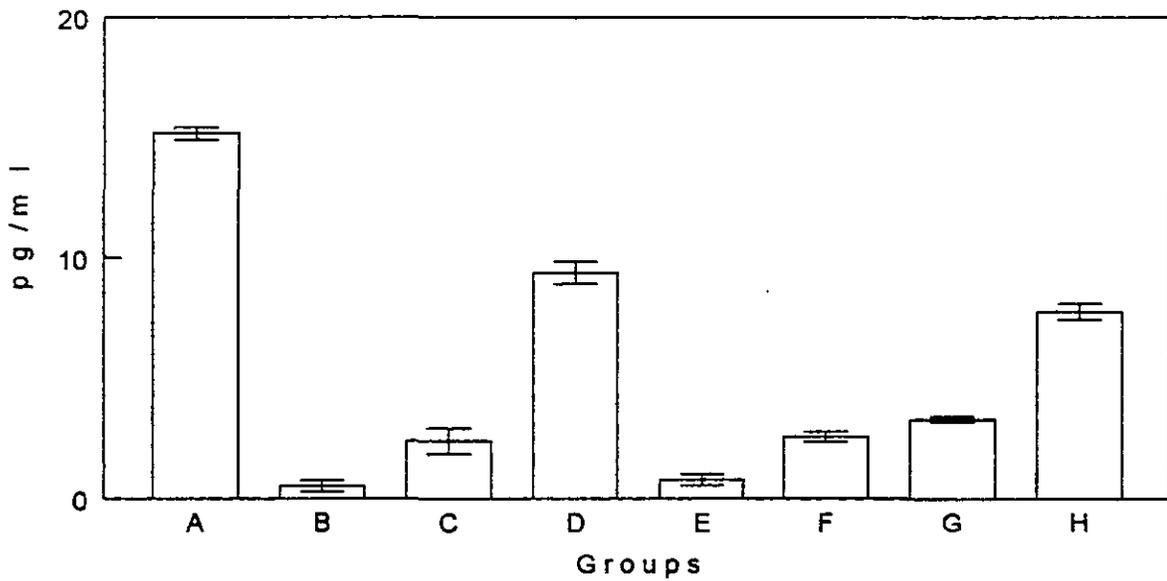
NORADRENALIN CONCENTRATION IN
HARDERIAN GLAND EXTRACTS



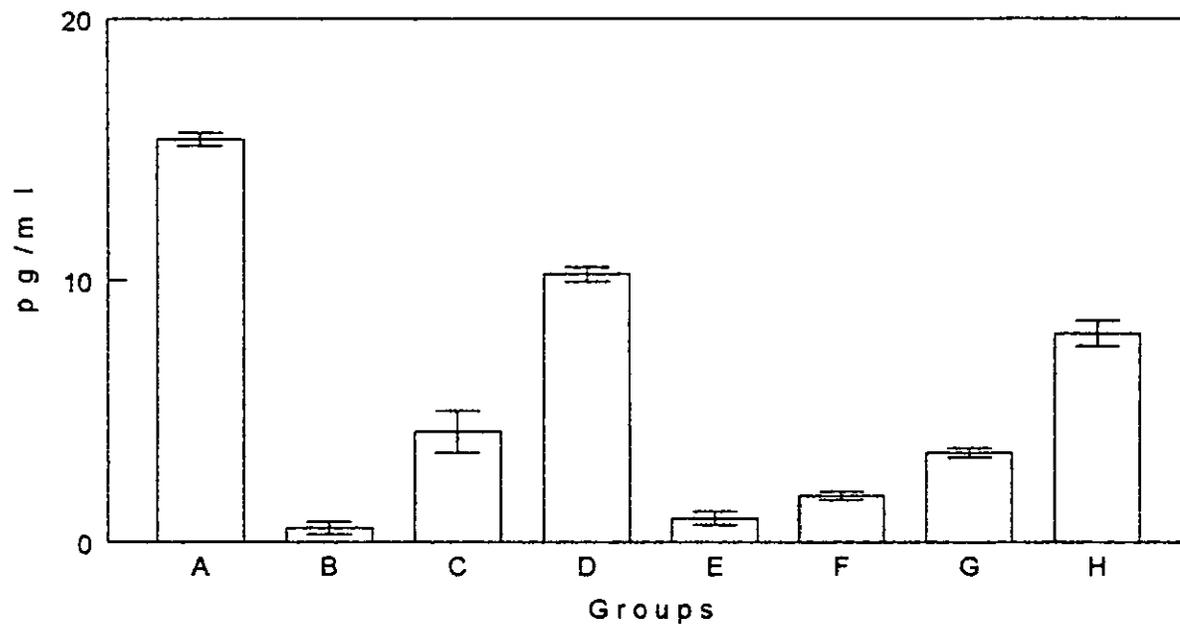
MELATONIN CONCENTRATION (11h)
2h, INCUBATION



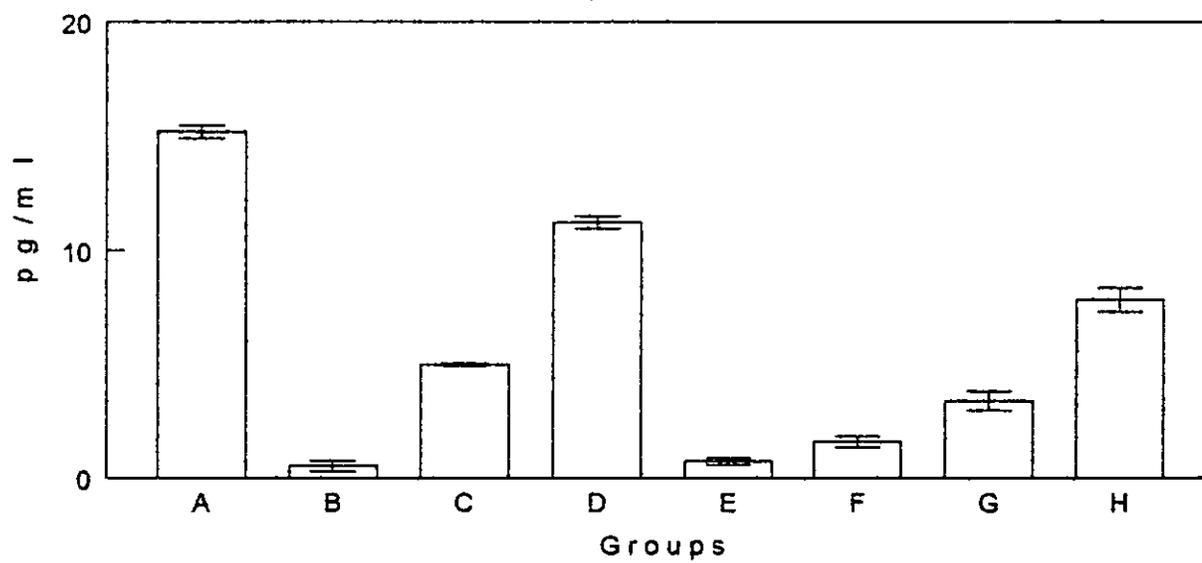
MELATONIN CONCENTRATION (11h)
4h, INCUBATION



MELATONIN CONCENTRATION (23h)
2H INCUBATION



MELATONIN CONCENTRATION (23h)
4h, INCUBATION





BIOMEDICINE PHARMACOTHERAPY

Editor-in-chief: Georges Mathé (Hôpital Suisse, Issy-les-Moulineaux, France)

Editors: David Machover (Hôpital Paul-Brousse, Villejuif, France)

and Haim Tapiero (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France)

Dr GG Ortiz
Division de Neurociencias, CIBO
Instituto Mexicano del Seguro Social
Sierra Mojada N° 800
Col Independencia C.P. 44340
Guadalajara, Jal
Mexico

10-nov-98

Ref: MS 98069 "Effects of melatonin on the Harderian gland of lipopolysaccharide-treated rats : morphological observations"

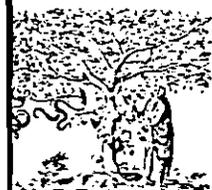
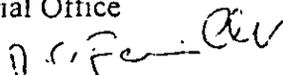
Dear Doctor Ortiz,

Thank you for your recent submission of the above manuscript. I am pleased to inform you that it has been accepted for publication in BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY. I anticipate the appearance of this paper in n° issue

You should hear directly from the publisher in a not too distant future. Of course, should you have other manuscripts or have colleagues who wish to submit manuscripts, I would like to emphasize that the journal is in need of continued submission of quality manuscripts

Sincerely Yours,

The Editorial Office



**Effects of melatonin on the Harderian gland of Lipopolysaccharide-treated rats:
Morphological observations.**

GG Ortiz,^{1,2} A Coto-Montes,³ OK. Bitzer-Quintero,^{1,2} MA. Falcón-Franco,¹ L Ruiz-
Rizo,^{1,2} A Bravo-Cuellar,² RJ. Reiter,³ A Feria-Velasco,⁴

¹División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Guadalajara, Jalisco. México. ²Programa del posgrado en Inmunología, Centro Universitario en Ciencias de la Salud (CUCS). Universidad de Guadalajara. ³Department of cellular and Structural Biology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio Texas USA. ⁴ Division of Environmental Pathology and Biotechnology, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Guadalajara, Jalisco. México.

Running head: Melatonin protects against LPS-induced Harderian gland damage.

Corresponding author:

Genaro G. Ortiz.

Div. de Neurociencias/CIBO-IMSS.

Sierra Mojada 800 cp 44340.

Guadalajara, Jalisco. México.

Phone: (3) 617-0060 ext 31-949

e-mail: orve@foreigner.class.udg.mx

Summary

Melatonin is a free radical scavenger and antioxidant. This indol is reported to efficiently scavege both hydroxyl and peroxy and it also reduces both *in vitro* and *in vivo* tissue damage due to oxidants that generate toxic radicals.

Lipopolysaccharide (LPS) administration induces oxidative damage in various tissues mainly due to its ability to increase reactive oxygen species. In the present work, we studied the morphological changes in the Harderian gland after LPS administration and the effects of melatonin in preventing the induced changes.

Hyperchromasia, vesicular degeneration, necrosis and infiltration with macrophages, monocytes and neutrophils were observed in the LPS-treated group. Also, a typical structure of the glandular acini of the gland exhibited diffuse damage. In the LPS rats treated with melatonin a diminished number of infiltrative cells was seen, cloudy swelling was reduced, as was nuclear hyperchromasia. Neither necrosis nor vesicular degeneration were noted in the melatonin treated rats and, in general glandular structure was preserved. These data demonstrated that melatonin protects the Harderian gland against LPS toxicity in terms of morphological damage.

Key words: LPS, melatonin, morphology, Harderian gland.

Introduction

The Harderian gland (HG) is a tubulo-alveolar gland located within the orbit; until recently was considered to be an accessory lacrimal gland (1-3). The gland contains high concentrations of porphyrins which appear after birth and are under hormonal control (4-8). In addition, the Harderian gland of many rodent species contains large quantities of lipids and several indolamines (8,9). Various functions including pheromone synthesis (10-12), photoprotection and thermoregulation have been proposed for these organs (13). The gland is also influenced by both photoperiod and melatonin with the latter exerting an important role on its metabolism (14,15). Several authors have suggested that serotonin and melatonin synthesis by the pineal gland is regulated by an extraretinal system in which the Harderian gland plays an important role (16-19). Moreover, pineal-derived melatonin may influence the metabolism of the Harderian gland (20,21).

The role of melatonin as antioxidant has been demonstrated in a large number of studies (22,23). Melatonin is a potent neutralizer of the hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$), the most toxic of the reactive species generated from hydrogen peroxide (24). Melatonin is considered also a more potent scavenger of the peroxy radical ($\text{ROO}\bullet$) than is vitamin E; furthermore, in both *in vivo* and *in vitro* studies melatonin has been found to protect against free radical damage induced by a variety of oxidants (25).

Lipopolysaccharide (LPS) is a toxin which induces oxidative damage in part by generation of free radicals (26). LPS causes widespread oxidative damage in a number of organs, changes which are counteracted by melatonin treatment (27). Thus melatonin's

protection against free radicals is obviously not confined to a single organ, and indeed it probably extends to every organ and cell in the organism. Because of the reported effects of melatonin on the catabolic activity of the Harderian gland and since these glands generate large amounts of free radicals because of their elevated porphyrin content, the purpose of the present study was to determine whether melatonin would protect these organs against oxidative damage induced by LPS.

Materials and Methods

Lipopolysaccharide (LPS from *Escherichia Coli*, serotype 0111:B4) and melatonin were purchased from Sigma (St. Louis, Mo).

Twenty adult Sprague-Dawley male rats (250 ± 20 g) were used in this study. They were housed in plexiglas cages with 3 animals per cage. The animal rooms were windowless with automatic temperature (22 ± 2 °C) and lighting controls (14:10h, light:dark cycle). The rats received standard laboratory chow and water *ad libitum*. Melatonin was dissolved in absolute ethanol and thereafter diluted in saline (the final concentration of ethanol was 1 %). LPS was dissolved in saline.

After 10 days of acclimation to the animal rooms, rats were divided into 4 groups (control-saline, melatonin, LPS, and melatonin + LPS). LPS, melatonin and diluent were injected intraperitoneally (ip). The control group received diluent only. The 3 groups were injected with LPS (10 mg/kg, a single injection at 10:00h), melatonin (30 min before LPS) or LPS plus melatonin. After 6 hours all animals were anesthetized and then perfused with a phosphate buffered saline solution, pH 7.4, to which heparin (1000 UI/L) and procaine (1 g/L) were added. The animals were perfused for 2 min followed by 10 min perfusion with 2 % phosphate buffered paraformaldehyde solution. The Harderian glands were removed and fixed for 24 h in the same fixative solution. Sections were embedded in Paraplast-plus and 5 μ m-thick sections were stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope.

Results

Both control and melatonin-treated groups exhibited a structure typical of the Harderian gland: tubulo-alveolar, with a columnar epithelium surrounded by myoepithelial cells. The glands of the melatonin treated rats had some nuclei and accretions of porphyrins in the acinar lumina (Figs 1A and 1B).

LPS-treated animals had extensive damage to their Harderian glands. In some cases there was obvious disruption of the acinar structure, with nuclear hyperchromasia, perinuclear halos, and chromatolysis. Also apparent was vesicular cytoplasm and the presence of cellular fragments, filaments and/or granular material in the lumina (Fig. 1C). No pathological changes were seen in the myoepithelial cells. The nuclei which were basally located in the acinar cells of the control animals were often located near the acinar lumen in the glands of LPS-treated rats (Fig. 1C). An infiltration of inflammatory cells, i.e. macrophages, monocytes and neutrophils was also apparent (Table 2).

In the LPS animals that were also given melatonin, the Harderian glands exhibited much less disruption and cellular disintegration (Table 1). The acinar cells did exhibit some cloudy swelling and nuclear hyperchromasia (Fig. 1D). On the other hand, the infiltration by inflammatory elements, especially neutrophils, was greatly reduced (Table 2).

Discussion and Conclusion

Bacterial Lipopolysaccharide (LPS) is a potent toxin that induces extensive cellular damage in many organs through the generation of free radicals (26). Free radicals attack macromolecules such as DNA, proteins and lipids leading to extensive cellular damage. It was recently found that melatonin protects cells against the oxidative damage inflicted by LPS (27) and paraquat (28), both of which are toxic free-radical-generating compounds.

LPS is both an endotoxin and exotoxin. The biological consequences of LPS depend on several processes. Some of the effects of LPS treatment are due to the release of biochemical mediators by reticuloendothelial cells. Other effects are a consequence of the production of anaphylotoxin; this endotoxin directly inhibits both glucose and lipid metabolism (29). LPS also stimulates the release of free radicals from inflammatory cells (macrophages, polymorphonuclear cell, and monocytes) either directly or through LPS-induced interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) (30). TNF is partially responsible for the toxicity of LPS although the precise mechanism of that toxicity remains to be established.

The effects of LPS in the Harderian gland appear very quickly, as illustrated by the extensive morphological changes such e.g., hyperchromatic nuclei, cloudy swelling, vesicular degeneration, and necrosis, found in these glands at 6h after LPS administration. There was a close correlation between the presence of cellular infiltrate and the amount of damage observed in the Harderian glands. This damage may be related in part to the release of TNF and IL-1 by the inflammatory cells. In similar unpublished studies in which

liver was examined, the infiltration of neutrophils was high and damage was also extensive (vesicular and fatty diffused degeneration and necrosis of cells). Also extensive oxidative changes were seen in the liver 6h after LPS administration. In the current study of the Harderian gland cellular infiltration was minimal (in comparison to liver), however the amount of tissue damage was great. The implication is that none of the damage observed was directly related to the presence of the inflammatory cell infiltrates. Furthermore, in LPS damaged liver, increased levels of lipid peroxidation products, i.g., malonaldehyde (MDA) and 4-hydroxyalkanal (4-HDA) were seen. In the liver, the Kupffer cells are major targets for LPS; these hepatic macrophages engulf LPS by phagocytosis. In these cells the toxin generates free radicals and induces oxidative damage which can be measured by an increase in MDA and 4-HDA (27,29). The damage observed in the Harderian gland as a consequence of LPS may not be a consequence of lipoperoxidation, but could be due to other mechanisms i.e., nitric oxide production, lymphocyte transformation, macrophage activation (LPS stimulates the release of free radicals directly or through IL-1 and TNF), and initiation of complement.

In the LPS rats treated with melatonin the integrity of the Harderian gland was protected. This protection was possibly afforded by the direct effects of melatonin and probably to a lesser degree by a reduction of the inflammatory response. Melatonin is known to act as an electron donor to detoxify endogenous electrophile compounds.

Aknowledgements

AMC's research was supported by spanish fellowship from MEC project number. PB92-0831.

References

1. Davis FA (1929) The anatomy and the histology of the eye and orbit of the rabbit. *Am Ophtal Soc* 27, 401
2. Chiquione AD (1958) The identification and electron microscopy of the myoepithelial cells in the Harderian gland. *Anat Rec* 132, 569
3. Sakay T (1992) Comparative anatomy of the mammalian Harderian gland. p. 7-23. *In*: S.M. Webb, RA, Hoffman, M.L. Puig-Domingo and R.J. Reiter (ed). *Harderian glans: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects*. Springer-Verlag, Berlin.
4. Kennedy GY (1970) Harderoporphyrin-a new porphyrin from the Harderian gland of the rats. *Comp Biochem Physiol* 36, 21
5. Jackson AHD, Kenner GW, Smith KM (1976) Pyrroles and related compounds. XXXVII. Harderoporphyrin *Tetrahedron* 32, 2757
6. Spike RC, Payne AP, Moore MR (1992) Porphyrin and their possible significance in Harderian glands. p. 165-193. *In*: S.M. Weeb, R.A. Hoffman, M.L. Puig and R.J. Reiter (ed.), *Harderian glands: Porphyrins Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects*. Spinger-Verlag. Berlin.
7. Payne AP, Spike RC, Moore MR (1992) Gonadal hormones, structure, and porphyrin synthesis in the rodent Harderian gland p. 141-154 *In*: S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo, R.J. Reiter (ed), *Harderian glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects*. Springer-Verlag, Berlin.

8. Payne AP (1994) The Harderian gland: a tercentennial review. *J Anat* 185,1
9. Menéndez-Peláez A. Buzzell GR (1992) Harderian gland indoles, p. 219-234. *In: S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo, R.J. Reiter (ed), Harderian gland: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects. Springer-Verlag, Berlin.*
10. Thiessen DD. Yhar P (1977) *The Gerbil in Behavioral Investigations. Mechanisms of Territoriality and Olfactory Communication. Austin: University of Texas Press.*
11. Payne AP (1979) The attractiveness of Harderian gland smers to sexually and experienced male golden hamsters. *Animal Behav* 27,879
12. Thiessen DD. Harriman AE (1986) Harderian gland exudates in the male *Meriones unguiculatus* regulate female proceptive behavioral, aggression and investigation. *J Comp Physiol* 100, 85
13. Thiessen DD, Kittrel EMW (1980) The Harderian gland and thermoregulation in gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Physiol Behav* 24, 417
14. Menéndez-Peláez, A, Santana C, Hawes KA (1988) Effects of photoperiod or exogenous melatonin administration on the activity on N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase and the melatonin content of the Harderian gland of two strains of females Syrian hamsters. *J Pineal Res* 5, 293
15. Coto-Montes AM, Rodríguez-Colunga MJ Menéndez-Peláez A (1993) Chronic N-methyl-D-aspartate administration prevents melatonin associated changes in cell differentiation in the Harderian gland of male hamsters. *Endocr Res* 19,101

16. Wetterber L, Geller LE, Yuwiler A (1970a) Harderian gland: An extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats. *Science* 167, 884
17. Wetterberg L, Geller E Yuwiler A (1970b) Development and influence of early hormonal treatment on porphyrin content. *Science* 168, 996
18. Feria-Velasco A, Meléndez MC, Jaramillo J (1983) Sex differences in secretion pattern of neonatal rat Harderian gland under various environmental lighting conditions. *Comp Biochem Physiol* 74,709
19. Panke ES, Reiter RJ, Rollag MG (1979) Effect of removal of the Harderian gland on pineal melatonin concentrations in the Syrian hamster. *Experientia* 35,1405
20. Hoffman RA, Johnson LB, Reiter RJ (1985) Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *J Pineal Res* 2, 161
21. Diiorio DP, Nadakavukaren MJ. (1984) Prevention by pinealectomy of short photoperiod-induced ultrastructural changes in the hamster Harderian gland. *Anat Rec* 210, 449
- 22 Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M (1995) Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res* 19,57
23. Reiter RJ (1995) Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 16, 383
24. Meneghini R, Mertins EL (1993) Hydrogen peroxide and DNA damage. p. 83-94. *In: DNA and Free Radicals*, B. Halliwell, I.I. Aruoma (ed) Ellis Harwood, Chichester.

25. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerinek E (1995) A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 18, 1
26. Yoshikawa Y, Takano H, Takahashi S (1994) Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in endotoxin-induced multiple organ failure. *Circ Shock* 42,53
27. Sewerinek E, Abe M, Reiter RJ (1995) Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. *J Cel. Biochem* 58, 436
28. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia M (1994) Potent protective effect of melatonin or in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci* 56, 83
29. Sakaguchi S, Iyata H, Yokota K (1989) Effect of calcium ion in lipid peroxide formation in endotoxemic mice. *Microbiol Immunol* 33, 99
30. Peristeris P, Clarck BD, Gatti S (1992) N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 140,390

Figure 1

A) Control group showing a typical structure: acinar compound with pyramidal cells (large arrowhead and small arrows), myoepithelial cells (small arrowhead), acinar lumen (asterisk). **B)** Melatonin-treated group showing similar structure: pyramidal cells (large arrowhead, and small arrows), myoepithelial cells (small arrowhead), and acinar lumen with dense material, nuclei and accretions (asterisk). **C)** LPS-treated groups. The cytoarchitecture was seriously altered in a diffuse way; the pyramidal cells showed hyperchromatic or disrupted ubiquitous nuclei and vesiculated cytoplasm. No histopathological lesions were observed in myoepithelial cells (small arrowhead). The acinar lumen exhibited: nuclei, filaments, and cellular fragments (asterisk). **D)** LPS + melatonin-treated group. Acinar cytoarchitecture was preserved, the epithelial cells (large arrowhead, and small arrows) showed hyperchromatic nuclei and cloudy swelling. No pathological changes were seen in myoepithelial cells (small arrowhead); the acinar lumen contained pigmented secretory material (asterisk) H&E x240.

Table 1.

Histopathological effects on the Harderian gland after 6h of LPS treatment, and the protective effect of melatonin.

Percentage of rats with change *

Group	Cloudy Swelling	Hyperchromatic nuclei	Chromatolysis	Vesicular degeneration	Necrosis
A	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0
C	100	100	60	80	60
D	80	80	20	20	0

* The denominator used to calculate these percentages was 5.

^A Controls; ^B Melatonin; ^C LPS; ^D LPS+melatonin

Table 2.

Cellular infiltration in 20 HPF of Harderian gland after 6h LPS treatment, and the protective effect of melatonin.

Group	Cellular infiltration
A	2 ± 0.5
B	2 ± 0.5
C	6 ± 2
D	2 ± 1

^A Controls; ^B Melatonin; ^C LPS; ^D LPS + melatonin

Data are the Median \pm S.D.

HPF= \times 1200.

DECEMBER 18 2004