

03068

12
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

EFFECTO DE LA MELATONINA Y LA TESTOSTERONA
SOBRE LA HISTOLOGIA DE TESTICULO DE
HAMSTERS ENVEJECIDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A:
BIOL. ADRIANA ^{Margarita} MORALES OTAL

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO I. FERIA VELASCO



MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ALGUNAS PERSONAS TRIUNFAN
POR QUE ESE ES SU DESTINO,
PERO LA MAYORÍA DE QUIENES TRIUNFAN
DECIDIERON LOGRARLO**

**A MIS PADRES, POR QUE SIEMPRE HAN CREIDO EN MI,
POR SU APOYO E INMENSO CARIÑO
DOY GRACIAS A DIOS POR TENERLOS**

**A MINERVA, BERENICE Y CESAR AUGUSTO POR SU
COMPRESION Y CARIÑO**

A MIS TIOS

A MI TIA ARQ. MARGARITA RODRIGUEZ OTAL

**A TODOS AQUELLOS QUE COMPARTIERON MOMENTOS DE
ALEGRIA Y TRISTEZA, DE TRIUNFOS Y FRACASOS, POR SU
AMISTAD SIN INTERES**

**POR TU MARAVILLOSO AMOR, TU COMPRESION
Y APOYO
GRACIAS**

BOMBO

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Alfredo I. Feria Velasco, por su amistad, por su sólida formación académica que me obsequio y por sus comentarios derivados de su amplia experiencia.

A mi tutora Dra. Bertha G. Ortega Corona por ser guía y amiga, por sus consejos, sabiduría y aportaciones en mi formación académica.

A mis amigos de la Unidad de Investigación Médica en Patología Experimental, CMN, S. XXI, IMSS, en especial a Sandra, Paty, Rafa y Eduardo por todo el tiempo compartido.

Al proyecto de Maestría y Doctorado de la U.A.C.P y P del CCH, UNAM, al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; en especial a Marcela, Dolores, Carmen, Arturo y Reyes.

A mi cotutor Dr. Fernando Antón Tay por sus acertados comentarios y sugerencias en la realización de esta Tesis.

Al Dr. Sebastián Castillo Medina por sus consejos, regaños y su apoyo siempre incondicional.

Al Dr. Emilio Castellanos Juárez por sus sugerencias, revisión y comentarios a esta Tesis.

Al M. en C. Joaquín Herrera por la revisión y comentarios a esta Tesis.

Al CONACYT, por la asignación de la Beca con número de Registro 82129.

INDICE

CONTENIDO	No. de PAGINA
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION.....	4
BREVE HISTORIA DE LA GLANDULA PINEAL.....	5
LA GLANDULA PINEAL DE MAMIFEROS	
Estructura y Función.....	8
Desarrollo Prenatal y Posnatal.....	9
Citología.....	10
EFFECTOS FOTOPERIODICOS	
Control Estacional en la Reproducción.....	11
EFEECTO DE LA ADMINISTRACION EXOGENA DE LA MELATONINA.....	14
EFEECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL SISTEMA REPRODUCTOR DEL HAMSTER DORADO.....	16
TESTICULOS, HORMONAS Y SU RELACION CON LA VEJEZ.....	18
VIAS METABOLICAS DE LA TESTOSTERONA EN TESTICULO.....	18
TESTICULO.....	19
La Glándula intersticial del testículo.....	20
Interacciones Sertoli-Leydig.....	21
LA VEJEZ Y LA GLANDULA PINEAL.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
HIPOTESIS.....	30
OBJETIVO.....	31
MATERIAL Y METODOS.....	32
RESULTADOS.....	34

DISCUSION.....	51
CONCLUSIONES.....	56
ABREVIATURAS.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	58

RESUMEN

La glándula pineal (g.p) es una característica universal de los vertebrados, participa en el control de los ciclos de adaptación diaria y temporal, regulando algunos de los procesos fisiológicos; se dice que este órgano funciona como un transductor neuroendócrino, ejerciendo sus efectos sobre los centros cerebrales, cuyas funciones se relacionan con la cantidad de luz ambiental. El papel de la glándula pineal y el fotoperíodo en la regulación de la actividad gonadal ha sido estudiada en hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*). Otros procesos tales como la termorregulación, la hibernación, migración, ciclo sueño-vigilia, peso corporal, color del pelaje son también regulados por la pineal, a través de la liberación cíclica de sus productos de secreción, siendo la Melatonina (MEL) la más importante. La síntesis de MEL es inhibida por la luz ambiental y estimulada por la oscuridad. La información sobre el fotoperíodo lo recibe la glándula pineal por una vía especial que incluye los ojos, el nervio óptico accesorio inferior, núcleo supraquiasmático (NSQ), núcleo de la formación reticular mesencefálica (FRM), ganglio cervical superior (GCS) y la innervación simpática de las células parénquimales de la pineal. Se ha señalado que MEL es la mediadora del efecto de la glándula pineal sobre la reproducción. En algunos roedores la administración de MEL tiene efecto sobre la maduración sexual de animales jóvenes y adultos. Específicamente en el hámster, inhibe el crecimiento testicular, induce reducción en el peso de los testículos y órganos accesorios, todos ellos son cambios asociados con disminución de las concentraciones de Testosterona (TES).

Se ha demostrado que la vejez se caracteriza por la disminución de las concentraciones séricas de TES y se asocia frecuentemente a una reducción de la actividad sexual. Se sabe que la MEL se encuentra presente en concentraciones elevadas en animales jóvenes, sin embargo, su producción se reduce con la edad.

Con estos antecedentes se emprendió este estudio, el cual consistió en la administración de hormonas como MEL y TES a hámsters dorados de 18 meses (seniles) y la observación del efecto de éstas sobre la histología del testículo, con el objetivo de estudiar si existen cambios en la actividad espermatogénica. Encontramos que la administración de MEL, como se ha reportado en la literatura, produce atrofia testicular, mientras que la administración de TES produce un aumento en el número de células de Leydig, también se observa un incremento de la actividad espermatogénica. La administración de MEL+TES produjo una regeneración morfológica y

funcional del testículo de estos animales. Estos cambios regenerativos se caracterizaron por túbulos seminíferos bien conformados, una producción aumentada de espermatozoides, así como incremento en el número de células de Leydig. Esto indica que existe una acción potenciadora entre estas dos hormonas en su efecto regenerativo sobre el tejido testicular de hámsters dorados. Esto se podría interpretar como un efecto rejuvenecedor de MEL+TES, con reversión de los cambios degenerativos propios de la vejez.

ABSTRACT

The pineal gland is a universal organ found in vertebrates. It participates in the control of periodic adaptative changes, regulating the corresponding physiological processes. This organ acts as a neuroendocrine transducer coordinating the activity of cerebral areas related to environmental lighting characteristics. Some processes like thermoregulation, hibernation, migration, awakening-sleep cycles and seasonal bodily changes are also regulated by the pineal gland through the cyclic liberation of hormones, being melatonin (MEL) the most important secretion. MEL synthesis is inhibited by light and stimulated by darkness. Information from the environmental reaches the pineal gland through a special neural path, it includes the eyes, the optic nerves, the supraquiasmatic nuclei, the mesencephalic reticular formation, the superior cervical ganglia and the autonomous innervation of the pineal gland. It is well known that MEL is responsible of the actions of the pineal gland on the reproductive cycle. In rodents, MEL administration has multiple effects on the sexual maturation, in Syrian hamsters it inhibites the testicular growth, inducing atrophy of testis and accesory organs, as well as a lowered testosterone (TES) serum levels. It has been demonstrated that in human males, the old age is characterized by low serum TES concentrations, frequently associated to diminished sexual activity. In young animals MEL serum levels are high, but these levels decrease with age.

We studied the role of the pineal gland and the photoperiod on the gonadal activity of syriam hamsters (*Mesocricetus auratus*). We administered MEL, TES or MEL+TES to 18 months old animals (corresponding to 80 years in human individuals), looking for hystological changes in testicular samples, paying special attention to spermatogenesis. We found that MEL injection induced testicular atrophy as reported elsewhere. TES injection resulted in a greater number of Leydig cells, it also induced an increase on spermatogenesis. MEL+TES resulted in remarckable regeneration of the testis from the morphological and functional standpoints. These regenerative changes consisted on increased spermatogenesis, a greater number of Leydig cells and a preserved structure of the seminiferous tubules. Our results indicate that MEL+TES have a potentiated rejuvenating effect, reverting the degenerative changes associated with old age.

INTRODUCCION

La interacción que los seres vivos establecen con su entorno es óptima cuando sus condiciones fisiológicas se adaptan a los cambios del medio ambiente. Varias estructuras cerebrales intervienen en este proceso adaptativo y una de las más importantes es la **glándula pineal**.

La historia de las investigaciones en relación a la glándula pineal es muy antigua y encierra un notable interés, ya que durante más de veinte siglos ha reflejado las principales ideas de la ciencia médica, así mismo, ha sido una fuente de atracción de religiosos y filósofos, quienes le han atribuido una gran variedad de funciones. Así, dentro de la filosofía oriental, la pineal ha sido considerada como un "tercer ojo"; para los hindúes es el órgano de la clarividencia, mientras que dentro de la filosofía mecanicista, la pineal constituye el asiento del alma (8).

La glándula pineal esta involucrada en el control de los ciclos vitales que varían con la hora del día (ritmo circadiano), así como de los ciclos estacionales de la reproducción. La administración de melatonina (MEL), la principal hormona de la pineal, induce una gran variedad de efectos neurológicos en mamíferos, incluyendo al hombre, induce sueño, produce sedación y ejerce efectos anticonvulsivos en varios modelos animales y en pacientes epilépticos (3,4). También, dosis bajas 1.25 µg/kg (3) de esta hormona, ejercen efectos ansiolíticos e incrementan la resistencia inmunológica. Dosis altas (2.5 mg/kg) de MEL (193) tiene acciones antimitóticas, por lo que actualmente se estudia su actividad antitumoral (193). La secreción de Melatonina es abundante en animales jóvenes entre ellos el hombre, su producción disminuye con la edad (154); por lo que algunos investigadores se han atrevido a llamar a esta hormona la clave de la "*eterna juventud*".

El envejecimiento no es un proceso de causa única, sino el resultado de una compleja asociación de interacciones estructurales y funcionales entre lo biológico, lo mental y lo socioambiental. Toda esta serie de factores conducen una disminución de la capacidad de adaptación, manifestándose como una menor respuesta inmunológica contra las infecciones y consecuentemente menor capacidad defensiva contra los agentes nocivos externos e internos aunada a una disminución progresiva del poder de recuperación. En el proceso de envejecimiento, la síntesis de la MEL disminuye lo que se ha asociado a una menor longevidad, incremento en la probabilidad de cáncer y supresión de algunas funciones inmunológicas (154).

BREVE HISTORIA DE LA GLANDULA PINEAL

La glándula pineal esta rodeada por mitos y leyendas, las investigaciones que se han llevado a cabo en torno a esta estructura es muy antigua, y ha sido motivo de interés de médicos, filósofos y religiosos, los cuales le han atribuido funciones innumerables tales como el, "asiento del alma", órgano de la clarividencia y la meditación. Las observaciones sobre la glándula pineal datan desde los primeros siglos hasta nuestros días y ha sido de suma importancia investigar la actividad de éste pequeño órgano, que ha sido inadecuadamente considerado vestigial.

CULTURAS ORIENTALES

El Ojo Místico, (así lo llamaban los egipcios) concede al iniciado la clarividencia, es decir, la visión directa de lo invisible, del vasto dominio donde quedan impresos los sucesos del pasado y donde se elabora el porvenir universal. Esta aptitud sobrenatural, permite descubrir la esencia de las cosas y los acontecimientos que aún están en potencia de realización (48).

Los Chacras (6to), entre los tibetanos los llaman Hdab-ston (68), centro de convergencia de la energía inconsciente y punto de proyección hacia la conciencia cósmica.

El cuerpo astral o periespíritu continúa unido al organismo por una especie de filamento o cordón sumamente tenue. Los egipcios lo representaban saliendo de la cabeza como tentáculo, en cuyo extremo radicaba el ojo místico, capaz de explorar las relaciones del hombre, símbolo de los microcosmos, con el universo circundante o macrocosmos.

La Glándula pineal como Centro de Visión, según Roso de Luna (168), el filamento, el lazo de unión con el organismo para desplazarse a los archivos terrestres conservados por la luz astral, donde se guarda celosamente el pasado, el presente y el futuro, radica en la glándula pineal mágicamente despierta. Sobre los Chacras superiores, Powell (130,131) escribiría "la función del sexto chacra en el centro astral es la vista; en el etérico brinda clarividencia y magnificación. El séptimo chacra en el astral completa y perfecciona las facultades y en el etérico da continuidad de conciencia". Esto explicaría, según Powell (130,131), el hincapié que se haría en el desarrollo del mismo. El despertar del centro etérico correspondiente permite a la persona salir por el mismo cuerpo físico de la pineal a plena conciencia y también volver a entrar sin perderla o recordarla vagamente.

CULTURAS OCCIDENTALES

El primer autor que mencionó el cuerpo pineal dentro de la cultura occidental fue Herófilo de Alejandría (325-280 a. de c.) (8). Antes de este autor se suponía que la epíffisis funcionaba a manera de esfínter que controlaba la «corriente de los pensamientos». Galeno de Pergamon (130-200 d.c) explicaba el complejo de actividades sensoriales y motoras, admitiendo la antigua teoría de que los nervios eran túbulos, Galeno sostenía que una parte del *spiritus animalis* ventricular fluía a través de los órganos sensoriales, que reaccionan allí de algún modo a los estímulos emitidos por los objetos percibidos. Galeno, sin embargo, negaba la función que Herófilo atribuía a este órgano y sostenía que se trataba simplemente de una glándula linfática (8).

Por otro lado Aristóteles, señaló que el alma o mente humana tenía tres facultades: *phantasia*, *anamnesis* y *mneme*. Estas tres facultades mentales residían dentro del sistema ventricular, las ideas o impresiones se formaban en estos ventrículos laterales, por medio de los nervios sensoriales, los cuales terminaban en la pared de dichos ventrículos y transmitían las imágenes sensoriales. En la parte media del sistema ventricular (lo que hoy conocemos como tercer ventrículo) se creía que estaba localizado el *discursos mentis* o *cogitatio* (la *anamnesis* de la doctrina aristotélica). En esta parte nacían los pensamientos y se seleccionaban las impresiones e imágenes reunidas dentro de la parte anterior del sistema ventricular (8).

Teoría Cartesiana y Centro del Alma. Aunque es bien sabido que Descartes (1596-1650), en su libro *De Homine*, consideraba a la epíffisis como el lugar donde residía el alma, a menudo se olvida que esta teoría se encontraba profundamente enraizada en las concepciones de los filósofos griegos. Descartes (8), suponía que la sangre tenía partículas diminutas, y que éstas eran separadas de la sangre precisamente en la epíffisis, transformándose así en *spiritus animalis* (que él llamó *espiritus animaux*). Dicho órgano distribuía luego este *spiritus* por los ventrículos. Tratándose como se trataba de un órgano impar localizado en el centro geométrico del encéfalo, la epíffisis sería un instrumento destinado a coordinar las imágenes obtenidas por los órganos sensoriales pares y capaz de regular la distribución del *spiritus animalis* que, según Descartes, constituía el principio psíquico y somático activador, definió a la epíffisis como el lugar donde radica la capacidad imaginativa y la «sensibilidad general» o conciencia. Más tarde, fue el primero en intuir la posible función de la pineal como «receptor» y quizá integrador de los

estímulos externos, al formular la teoría de que los ojos percibían los eventos del mundo circundante y los transmitían a la pineal a través de los «hilos cerebrales». La pineal, utilizando como vehículo los *spiritus animalis*, informaría a los músculos, los cuales producirían la respuesta adecuada. Con esta interpretación, se adelantaba al concepto, hoy aceptado de **transductor neuroendócrino (8)**.

LA GLANDULA PINEAL DE MAMIFEROS ESTRUCTURA Y FUNCION

La glándula pineal (g.p) es una característica de los vertebrados, participa en el control de los ciclos circadianos, así como en la regulación de las actividades fisiológicas.

El tubo neural permite el desarrollo de estructuras fotosensibles que conforme los organismos han evolucionado se han ido concentrando hacia la región cefálica cerca de la boca, estas estructuras desarrollaron ojos los cuales les permitieron diferenciar formas características y estimulantes de la agresión o de la huida (8).

Para hacer el estudio anatómico comparativo de los ojos mediales (epifisis y ojo parietal), así como de su filogenia, es necesario recurrir al registro fósil. La reconstrucción sistemática de los órganos epitalámicos en los distintos grupos ha podido registrarse hacia el pasado debido a la existencia de un orificio dorsal y medio, situado en la línea que describe el plano sagital en el techo del dermatocráneo en los vertebrados, que en los más antiguos podía ser par. En el curso de la evolución este orificio se cierra y no vuelve a abrirse entre los animales que lo han perdido por obturación. Cuando por oclusión del dermatocráneo se pierde este orificio, los órganos epifisis y ojo parietal, por falta de utilización sufren un proceso de rudimentación respecto a su primitiva función sensorial, adquiriendo una nueva funcionalidad de carácter endócrino. El orificio tectal dermatocraneal de los vertebrados fósiles alojaba un ojo, en el que se observa una estructura radial periocular, llamada en los ojos laterales "*anillo esclerótico*", la cual no sólo se observa en Peces, Reptiles y Aves tanto fósiles como actuales, sino también en los *Crossopterigios* fósiles, antecesores de la vida terrestre, a nivel del orificio interparietal (169). En los tetrápodos se desplaza el orificio pineal en sentido cráneo-caudal en la línea de la sutura con respecto al hueso parietal par. La regresión de estos ojos podría deberse, en los grupos con cerramiento dermatocraneal, a la mayor utilización de los laterales frente a los parietales en el ambiente acuático; no así en los *Crossopterigios*, predecesores de los tetrápodos, donde fueron de vital importancia en el paso del medio acuático al terrestre, el cual alcanzó una importancia funcional y un desarrollo importante que, una vez conquistado el medio terrestre, dejaría de ser necesario (por ejemplo en los reptiles mamiferoides), presentándose solamente en animales de tipo pancrónico, tales como ciertos *Anfibios*, *Lacéridos*, *Rincocéfalos* (*Sphenodon*), etc. (48).

El tubo neural, mediante un proceso de cefalización, ha restringido las zonas productoras de estructuras fotosensibles; en el arquécéfalo se manifiestan las primeras concentraciones fotosensibles, y la primera división de la funcionalidad de las estructuras en el prosencéfalo. Con la completa división del encéfalo, será el diencéfalo y únicamente éste el encargado de producir fotorreceptores. El cráneo impedirá al diencéfalo la posibilidad de producirlos; por ello este órgano emite evaginaciones con prolongaciones de su tercer ventrículo en busca de la superficie, al contacto de la placa ectodérmica que conduce el estímulo luminoso. Varias son las posibilidades que tiene el diencéfalo para generar órganos fotorreceptores: a nivel parasagital en la formación de los ojos laterales, a nivel del epitálamo con el sistema epifisiario. Así el saco vasculoso de los telósteos en el tercer ventrículo, presenta células fotorreceptoras que no llegan a constituir un ojo verdadero.

El "ojo parietal" también llamado órgano parapineal y vesícula inferior, lo presentan algunos vertebrados inferiores (Vertebrados Pisciformes, Anfibios y Reptiles) y está situado en la línea media frontal y dirigido hacia arriba. Este ojo puede estar situado dentro del tegumento, debajo de un área no pigmentada de la piel, o en una depresión en el techo del cráneo. Embriológicamente, el ojo parietal se desarrolla desde la terminación distal de la pineal o de la evaginación parapineal a partir del techo tercer ventrículo; se separa de esta evaginación primaria y continúa su desarrollo en forma similar a la de los ojos laterales pares, es decir forma una retina, lente y córnea en miniatura. El órgano parapineal de Ciclostomos y Telósteos, el órgano frontal de Anuros y el ojo parietal de Lacértidos son órganos homólogos, su característica estructural más importante es que se originan de la terminación distal del esbozo pineal (149).

La pineal es un órgano ubicuo en los cuadrúpedos extintos y ausente en ciertos edentados, dugóngidos y cocodrilidos (149). Aunque no hay estructuras pineales circunscritas en estas últimas especies, pueden existir células esparcidas (en el epitálamo o en otra parte) que son funcionalmente equivalentes a elementos parénquimales, llamados **pinealocitos**.

DESARROLLO PRENATAL Y POSNATAL

En los Vertebrados inferiores la pineal participa en la regulación del comportamiento de todas y cada una de las partes del cuerpo (74).

En los mamíferos existe un alargamiento del divertículo pineal el cual se ubica en el área media dorsal a nivel del neuroeje que dará lugar al

diencéfalo. El desarrollo embriológico de la pineal, se lleva a cabo a partir de las células neuroepiteliales dando origen a los pinealoblastos, los que se diferencian paulatinamente en elementos parénquimales definitivos, los pinealocitos. Las células gliales presentes en la pineal de algunos mamíferos adultos derivan del tejido ectodérmico neural, mientras que el estroma, que incluye los vasos sanguíneos de la g. p. derivan del mesénquima (133).

El desarrollo de la glándula pineal del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) es de un interés especial debido a que hay una subdivisión de la glándula en la cavidad y en la superficie y mucho de lo conocido, respecto de los efectos endócrinos de la glándula, se han derivado de experimentos en que se emplea esta especie animal. La subdivisión de la glándula en sus partes superficial y profunda inicia al 6to. día después del nacimiento, en este momento la glándula se alarga rápidamente y se presenta una constricción de la misma en el centro (76), continúa alargándose durante los siguientes 7 días; veintidos días después del nacimiento este tallo se encuentra constituido de unas pocas células parénquimales, vasos sanguíneos, nervios no mielinizados, formando una evaginación posterior al techo del tercer ventrículo, condición que persiste en el adulto (177) (fig. 1).

CITOLOGIA

La unidad fundamental de la g.p. son los pinealocitos (209). Pinealocito, "pineocito", ó células parénquimales", es un término usado indistintamente. Particularmente, los pinealocitos presentan una o varias prolongaciones por las cuales pueden variar su longitud, que se inician en la célula o pericarión, terminan en los espacios perivasculares alrededor de los capilares y pueden terminar entre otros pinealocitos (134,213). La apariencia general de las células parénquimales pueden cambiar con la hora del día, la edad del animal, el estado reproductivo, etc. (136). Se ha propuesto que la MEL, la principal hormona de la g.p se encuentra libre en el citoplasma y sale de las células por un mecanismo desconocido, que no se ha podido observar a través de microscopía electrónica.

Por otra parte, estudios ultraestructurales de los capilares pineales son escasos, e indican que las células endoteliales muestran pocos cambios. El espesor de las células endoteliales varía considerablemente entre las especies. Las células se encuentran muy adelgazadas en los capilares pineales de la rata, ratón, ardilla, tuza y un poco más disminuida en la chinchilla (103,104,178). Las fenestraciones o poros de los capilares pueden o no estar presentes; están ausentes en la pineal del hámster dorado (176), oveja, vaca

(2), gato y gerbo (213); en la rata son escasos (103). En contraste, en el ratón se encuentran densamente fenestrados (85, 133).

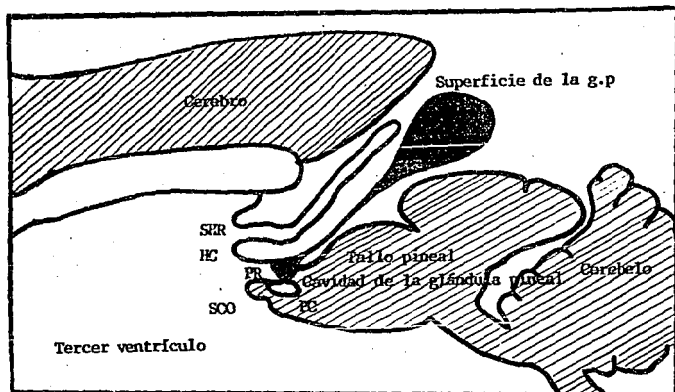


Fig. 1. Diagrama del complejo pineal en el hámster dorado; se puede observar la cavidad y la superficie de la glándula pineal y la relación anatómica de la glándula con el tercer ventrículo del cerebro. HC, comisura habenuar; PC, comisura posterior; PR, receso pineal; SC, colículo superior, SCO, órgano subcomisural; SHR, receso suprahabenuar (149).

La g.p. es un transductor neuroendócrino cuyas funciones se relacionan con la cantidad de la luz ambiental (218). Así procesos tales como la termorregulación, la hibernación, la migración, el ciclo sueño-vigilia y el apareamiento son regulados por la pineal, a través de la liberación cíclica asociada al fotoperíodo, de sus productos de secreción (56).

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (MEL) es considerada como la hormona principal de la g.p. de mamíferos (132). La síntesis de MEL es inhibida por la luz ambiental y estimulada por la oscuridad (216). La información sobre el fotoperíodo lo recibe la glándula pineal por una vía especial, que involucra los ojos, el nervio óptico accesorio inferior, núcleo supraquiasmático (NSQ), núcleo de la formación reticular mesencefálica (FRM), ganglio cervical superior (GCS) y la inervación simpática de las células parénquimales de la pineal (218) (fig. 2). La producción de MEL es cíclica con niveles circulantes más altos en la noche (135). El patrón de secreción de la MEL se refleja por concentraciones de los indoles en la sangre por lo que esta relacionada con su excreción por el riñón (97).

Inicialmente se pensó que la MEL era exclusivamente sintetizada por la g.p. (47). Sin embargo, estudios subsecuentes demostraron que también se sintetiza en los siguientes tejidos: retina (60), glándula de Harder (25), glándulas lagrimales extraorbitales (107), porciones del tracto gastrointestinal (204), y ciertos tipos de células sanguíneas (55). La regulación y síntesis de MEL probablemente sea diferente en cada uno de estos sitios. Por otra parte, mucho de lo conocido acerca de la producción de MEL ha sido derivado de estudios en dos especies: la rata y el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (153).

EFFECTOS FOTOPERIODICOS

Control Estacional en la Reproducción

Los efectos circadianos y fotoperiódicos implican una diversidad de sistemas neurales en respuesta a MEL. Las adaptaciones temporales determinan una variación de conducta y un proceso neuroendócrino, usando sistemas de señal fotoperiódica diferentes. Esta señal se encarga de sincronizar procesos

longitud de los días naturales (84). Gracias a esta propiedad funcional de la pineal, la glándula es capaz de coordinar cambios estacionales, en el peso corporal (11), color del pelaje (78), el letargo invernal en los roedores (87) y la regulación estacional del sistema reproductor (22,154).

Una de las funciones que se le han atribuido a la glándula y a MEL, es regular los ciclos de reproducción estacionales, particularmente en el hámster dorado (*M. auratus*) (66). Los mamíferos estacionales se clasifican en "crias de día largo" por ejemplo: el hurón, hámster dorado y otros roedores, o "crias de día corto" oveja y venado, esto depende de si sus gónadas son activadas en días largos o cortos. Esta estrategia particular es determinada por el periodo de gestación de cada especie, de su fisiología y del medio ambiente (80,208).

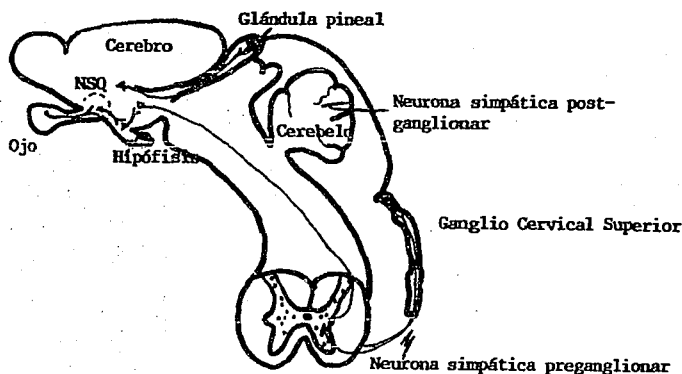


Fig. 2. Diagrama que representa la conexión neural entre ojos y glándula pineal. La interrupción de la innervación simpática de la glándula pineal, interrumpe la producción rítmica de melatonina y otros derivados indoles pineales.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION EXOGENA DE MELATONINA

La glándula pineal es considerada la principal estructura involucrada en el control del fotoperíodo y de los ciclos estacionales reproductivos de diferentes mamíferos (79,142,146). El ritmo diurno de la concentración de MEL, en la pineal, suero, líquido cefalorraquídeo y en orina se han observado en numerosas especies de mamíferos (65,98,146). Se ha señalado que la MEL es mediadora del efecto de la g.p sobre la reproducción. La rata no presenta un ciclo anual reproductivo y se ha demostrado que la MEL exógena administrada por la tarde tiene una acción inhibitoria dosis-dependiente sobre la maduración sexual en animales de 20 a 40 días de edad (95); mientras que, en animales prepúberes (5-20 días de edad) ó en adultos (70-90 días de edad) (95) su efecto es casi nulo (65,146). Diversos autores han demostrado que la hora de administración de MEL es decisiva para su acción (102, 189). En los estudios realizados por Tamarkin y cols. (190,191), se ha encontrado que la hora a la que es administrada la MEL es crucial para demostrar el efecto antigonadal en el hámster dorado adulto mantenido en un ambiente fotoestimuladorio.

Reiter y cols. (147) señalaron que la MEL administrada por la mañana o por la tarde inhibe el desarrollo sexual de ratas hembra jóvenes. Lang y cols. (95) demostraron que la MEL produce un retardo en la maduración sexual del macho, con disminución del peso de los testículos y órganos accesorios, con la concomitante disminución de hormona foliculo estimulante (FSH) y TES, y del número de receptores a GnRH (95), después de la administración de MEL en animales adultos.

Bajo condiciones de fotoperíodos naturales, la actividad reproductiva en el hámster dorado está restringida en primavera y verano. La regresión testicular inducida por fotoperíodos cortos es acompañada por una rápida caída en el número de receptores testiculares a LH/hCG y a prolactina (PRL) (20,91). Después de 8 semanas de tratamiento diario con MEL se observó una disminución en los niveles de PRL y de sus receptores. Richardson (161) demostró que la MEL produce una caída de las concentraciones de TES en suero y reducción del peso de testículos y órganos accesorios. Sisk y Turek (182) observaron que en los hámsters dorados expuestos a fotoperíodos cortos desde el nacimiento, la regresión testicular sólo ocurría cuando los animales alcanzaban maduración sexual y un tamaño testicular semejante a los animales expuestos a fotoperíodos largos, pero no en animales inmaduros

sugiere que la supresión de la liberación de PRL endógena conduce a una pérdida de los receptores testiculares LH/hCG y PRL y representa uno de los mecanismos por los que MEL, puede suprimir la actividad testicular en hámsters dorados. La reducción en los niveles de receptores LH/hCG en los testículos es significativa y proporciona una posible explicación de la habilidad de MEL para disminuir los niveles séricos de TES sin modificar los niveles de LH (182).

La restricción del alimento, el tratamiento con esteroides al nacimiento o la anosmia pueden hacer más sensible al eje hipófisis-hipotálamo-gónadas a la acción inhibitoria de algunas hormonas de la glándula pineal, (la mayoría indolaminas) (22,23,144). La pinealectomía provoca un prematuro desarrollo puberal en la rata (44,156), mientras que la MEL disminuye el peso del ovario y del útero de ratas hembras inmaduras (113,217), así como el desarrollo de los órganos accesorios. De tal forma, que se sugiere la existencia de un mecanismo mediador de la pineal en el control de la maduración sexual de mamíferos jóvenes, que desaparece en el adulto (95). Recientemente, se ha demostrado en el hombre, que la edad avanzada va acompañada de una reducción de la actividad sexual, sin disminución de los niveles séricos de TES en suero, hay sin embargo una disminución de FSH y de LH en respuesta a la estimulación de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) así como una disminución de la sensibilidad de las células de Leydig a la estimulación de la hCG (73). Contradictoriamente, experimentos con ratas macho, apoyan la hipótesis de que el envejecimiento produce una disminución en la función testicular caracterizada por una disminución significativa de TES en suero (19,33,34,61,69,73,108,162), así como una disminución en la actividad sexual (70). La alteración de la función testicular y la baja fecundidad de ratas macho viejas, esta relacionada en parte con la disminución significativa en la actividad de algunas enzimas esteroidogénicas en el tejido testicular (13,33), así como una menor respuesta a la administración de hCG *in vivo* (13,34,108). La función testicular reducida en ratas viejas puede deberse a un defecto en las células de Leydig (202), ó posiblemente a un mal funcionamiento del eje-hipotálamo-hipófisis, el cual controla la actividad de los testículos (13). La vejez está también asociada con una alteración en la función de un último componente del eje, los testículos, para sintetizar TES además de los cambios en los niveles circulantes de LH. Una de las posibles explicaciones para este fenómeno podría ser la alteración en la naturaleza y función de los receptores

de gonadotrofinas en los testículos de animales viejos, lo cual se reflejaría en una reducción de los receptores a hCG/mg de proteína testicular (13). Tsitouras y cols. (202) confirmaron que las células de Leydig (CL) tienen disminuida la capacidad para sintetizar TES y también un número disminuido de receptores hCG en los individuos viejos.

EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL SISTEMA REPRODUCTOR DEL HAMSTER DORADO

El hámster es un animal estacional, extremadamente sensible a la regulación fotoperiódica. Bajo condiciones similares, en las hembras se observan procesos anovulatorios y atrofia uterina. Esto puede deberse en parte a que fotoperíodos cortos u oscuridad constante incrementan la liberación de MEL de la g.p., y producen una atrofia testicular. La pinealectomía puede prevenir la regresión testicular inducida por exposición a fotoperíodos cortos de luz (140). La extirpación del GCS o transección del nervio coronario, también previenen los efectos de un fotoperíodo corto sobre la función reproductiva (140). La ausencia de tractos de fibras eferentes de la pineal de mamíferos sugiere que la g.p. es un transductor neuroendócrino que lleva la información del medio ambiente luminoso a través de una señal neuronal que modula la función reproductiva a través de una acción hormonal (218).

En algunos estudios, de ratas y hámsters se ha demostrado que la actividad de las enzimas necesarias para la síntesis de MEL se encuentran disminuida en el día y elevada durante la noche. Puesto que las mayores concentraciones de MEL son por la noche, resulta lógico suponer que la MEL media la respuesta de fotoperíodos largos en el hámster (143). Por otro lado, Turek y cols. (203) mostraron que implantes de silástico que contienen MEL podrían causar regresión testicular en hámsters expuestos a fotoperíodos largos. Los implantes mantienen las concentraciones tónicas de MEL a lo largo del día. La observación de que la administración exógena es capaz de suprimir la función gonadal en el hámster sugiere que la MEL pineal, puede estar involucrada en mediar la regresión gonadal que ocurre en estas especies expuestas a periodos cortos de luz ambiental (141).

Turek y cols. (203) observaron una atrofia testicular en hámsters macho mantenidos a fotoperíodos largos seguido del implante de cápsulas de silástico que contienen MEL. La cantidad de MEL liberada de estas cápsulas fue

estimada, liberándose de 14-26 μg diarios, suficientes para causar atrofia testicular. Lo más importante de estos estudios es que el sistema reproductor parece mostrar un ritmo diurno a la sensibilidad de la MEL (189).

Se han propuesto diversos mecanismos de acción de las acciones fisiológicas y farmacológicas de la MEL, sin embargo el mecanismo de acción sobre la parte subcelular no ha sido descrito. Por lo tanto, se ha sugerido que MEL tiene efecto sobre los procesos celulares que involucran microfilamentos y microtúbulos. Se sabe que MEL tiene un efecto similar al de la colchicina sobre el huso mitótico de puntas de raíces de cebolla, e induce una supresión mitótica dosis-dependiente (10). Benitez-King y cols. (14), demostraron modificaciones del citoesqueleto inducido por MEL, mediante la evaluación de los cambios en la forma de la célula, distribución de microfilamentos, así como varios procesos funcionales de la célula que dependen de la estructura del citoesqueleto.

Melatonina causa una gran variedad de cambios metabólicos celulares (27). Los estudios recientes en los cuales se utiliza $[^3\text{H}]$ MEL indican que es probable se una a la membrana, así como a las fracciones nucleares y citosólicas de diferentes mamíferos (5, 30, 92).

Estos estudios han sugerido la existencia de una proteína unidora de MEL o un receptor específico para MEL. Estudios autoradiográficos con $[^{125}\text{I}]$ -MEL apoyan la existencia de un receptor específico a MEL localizado en áreas particulares del cerebro (45). Recientemente, los rearrreglos sobre microtúbulos y microfilamentos inducido por MEL en cultivos de células MDCK y N1E-115 (14) llevan a considerar la interacción entre MEL y Calmodulina (CaM) como un posible mecanismo de acción para la hormona (15). Benitez King y cols. (15) demostraron que MEL modifica las concentraciones celulares de CaM y que la hormona pineal modifica la actividad *in vitro* de la fosfodiesterasa dependiente de CaM (PDE) posiblemente por la interacción directa con CaM. La CaM es conocida por su acción inhibitoria de la polimerización de microtúbulos. Los antagonistas de CaM inducen el alargamiento del microtúbulo en cultivos celulares (15). CaM es una proteína que se une a Ca^{++} y regula diversas funciones celulares tales como las concentraciones de nucleótidos cíclicos, la liberación de neurotransmisores, la contractilidad intestinal y la proliferación celular entre otras (189), son modificadas por MEL (4,5,27). Se sugiere que los efectos sobre el citoesqueleto, pueden ser explicados a través de la interacción de MEL con una proteína de bajo peso molecular la CaM.

Por último, Mendieta y cols. (106), demostraron que otro de los mecanismos por los que MEL ejerce sus acciones serían el bloqueo de la entrada de

colesterol a los compartimientos mitocondriales y la actividad del citocromo P-450, por lo tanto se suprime la síntesis de andrógenos.

TESTICULOS, HORMONAS Y SU RELACION CON LA VEJEZ.

Se ha sugerido que la g.p. modula la función gonadal en mamíferos (27,146). La testosterona incrementa su producción después de la pinealectomía en ratas macho, y la administración de MEL disminuye las concentraciones circulantes de TES. Este efecto inhibitor se ha postulado como indirecto a la secreción hipotalámica de GnRH (146), o directo como un cambio en la capacidad en la respuesta a la biosíntesis de andrógenos (50,86,117).

Varios autores han estudiado con detalle los efectos que tiene la edad sobre la función reproductora. En ratas macho, la TES en plasma disminuye con la edad (35,109,185), pero en ratones macho C57/B46J las concentraciones de TES en suero no disminuyen a menos que los animales se encuentren enfermos (116). En el ratón pies blanco *Peromyscus leucopus*, las concentraciones de TES y el peso testicular disminuyen progresivamente después de 20 meses de edad (186). Durante el envejecimiento en ratas, los lactotrópos de la hipófisis se hipertrofian y las concentraciones de PRL en plasma se elevan (88). Existen pocos estudios en relación con el envejecimiento de la función testicular del hámster dorado.

Con la edad avanzada, el ritmo de síntesis de MEL se deteriora, aunque hay evidencia de que el sistema neuroendócrino exhibe un incremento en la sensibilidad a la hormona (150). La disminución de MEL que acompaña a la edad avanzada parece estar relacionado con una caída generalizada en la capacidad funcional de muchos órganos. Por lo tanto, parece ser que los procesos degenerativos no son específicos de la vejez, en la cual disminuye la capacidad de la glándula pineal para sintetizar MEL. La reducción de la síntesis de MEL ha sido estudiada en el hámster dorado, la rata, el gerbo de Mongolia y en el hombre (154).

VIAS METABOLICAS DE LA TESTOSTERONA EN TESTICULO

La incubación del testículo en presencia de progesterona demuestran que las vías metabólicas varían con la edad del animal. Así, las concentraciones de la

enzima 5- α -reductasa se incrementan en ratas sexualmente inmaduras, a una edad en la cual la producción de TES fue mínima; lo inverso fue encontrado en las ratas adultas macho (53,82,115,188), pero aún se dispone de poca información en relación con el metabolismo testicular de hormonas esteroides en la vejez. Las concentraciones de TES en suero son mayores en la madurez, pero no en individuos seniles (61), ni ratas, ni en los cobayos (164).

Las concentraciones de TES reflejan el pulso de liberación del esteroide y las variaciones diurnas. En el hombre las concentraciones pico de TES ocurren durante la mañana, mientras que la declinación ocurre durante la media noche (52,158), aunque lo contrario ha sido comunicado para el mono rhesus (128), y el lemur (205). Kinson y Liu (90) observaron un ritmo circadiano en la rata en la cual la TES en suero fue maximizada durante 0300-0600 h y una declinación durante la noche. En las ratas inmaduras, sin embargo, el nivel pico ocurrió alrededor de las 0800 y la disminución entre las 1600-2000 h.

Chan y cols. (33) examinaron los cambios del metabolismo esteroideo testicular, con la edad, sobre las concentraciones de TES en suero y en la respuesta tardía a la estimulación de la hormona liberadora de gonadotrofinas. También se ha añadido un mal funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis involucrado en la vejez, y los centros neuronales en los cambios diurnos en el estímulo ambiental (34). La transformación de andrógenos 5- α -reducido fue significativamente mayor en ratas de 20 a 40 días de edad. Esto sugiere que posiblemente la 5- α -reductasa esta involucrada en la regulación del proceso de maduración sexual. En contraste, los estudios de Chan y cols. (33) han indicado que la producción de TES disminuye significativamente en ratas seniles más que en ratas jóvenes.

TESTICULO

El sistema reproductor masculino comprende las gónadas; dos testículos, y su sistema de conductos (los conductillos eferentes, el conducto del epididimo, el conducto deferente y el conducto eyaculador), junto con algunas glándulas accesorias: las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales glándulas de Cowper) (72).

El testículo es una glándula tubular compuesta, rodeada por una gruesa cápsula fibrosa, la *túnica albugínea*. En la cara posterior del órgano, un engrosamiento de tejido conjuntivo penetra en la glándula y forma el mediastino del testículo. Unos delgados tabiques fibrosos, llamados los septula testis, se extienden radialmente a partir del mediastino hasta la túnica

albugínea, y dividen al órgano en compartimentos piramidales, los *lobulillos testiculares* (72).

Cada lobulillo está constituido por uno o cuatro túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos constituyen la porción exocrina del testículo, que es en esencia una glándula citógena, cuyo producto de secreción holocrina está formado por células completas, los espermatozoides. Los túbulos de ordinario forman asas muy torcidas, pero también pueden ramificarse y terminan en extremos ciegos. En el vértice de cada lobulillo los túbulos seminíferos pasan repentinamente a transformarse en los túbulos rectos, que constituyen el primer segmento del sistema de conductos excretores. Estos, a su vez, se reúnen en la *rete testis*, un sistema plexiforme de espacios revestidos por epitelio, dentro del tejido conjuntivo del mediastino (72).

En la cara interna de la túnica albugínea, el tejido conjuntivo denso cede su lugar a una capa más laxa, provista de numerosos vasos sanguíneos, la túnica vascular del testículo (72).

La "Glándula Intersticial" del Testículo

En los lobulillos testiculares, el tejido intersticial se encuentra entre los túbulos seminíferos. Contiene algunas fibras colágenas, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y varios tipos de células, como fibroblastos, macrófagos, células cebadas y algunas células mesenquimatosas indiferenciadas. Los vasos sanguíneos y linfáticos y los nervios entran y salen por el mediastino y forman redes alrededor de los túbulos. Las células de Leydig (CL) son una característica notable de este tejido, se originan a partir de las células del mesénquima y se les encuentra en el tejido intersticial que rodea a los túbulos seminíferos. Son células poliédricas grandes cuyo núcleo contiene gránulos gruesos de cromatina y un nucléolo bien marcado. Se caracterizan por tener una gran cantidad de citoplasma, gran desarrollo del retículo endoplásmico liso (REL), mitocondrias grandes, redondas y con crestas tubulares, abundantes inclusiones de lípidos y un buen desarrollo del aparato de golgi (121). Al microscopio electrónico estas células se observan poligonales, su membrana plasmática generalmente presenta pliegues y microvellosidades, presentan un núcleo grande. El gran desarrollo del REL se ha relacionado con la capacidad de síntesis de colesterol y de andrógenos (37). Cuando se relaciona el número de moles de TES producida con el número de células de Leydig, se calcula que cada CL puede secretar hasta 10 800 moléculas de testosterona por segundo (166). Las mitocondrias están relacionadas con la transformación del colesterol a pregnenolona, mientras que las inclusiones de

lípidos corresponden a ésteres de colesterol que al ser hidrolizados por esterasas solubles, son fuentes de colesterol libre para la biosíntesis de los esteroides.

Células de Sertoli (CS). Son células cilíndricas se encuentran sobre la lámina basal, y extendida hacia arriba a lo largo de todo el espesor del epitelio hasta su superficie libre. De la porción axial cilíndrica de estas células proyectan un sistema complejo de delgadas prolongaciones laterales que rodean a las células espermatogénicas y que ocupan todos los intersticios que existen entre ellas. Las células germinales más primitivas, las espermatogonias, se apoyan también sobre la lámina basal, mientras que los estadios más avanzados de la línea de células germinales se encuentran a nivel progresivamente más altos del epitelio (166). La actividad proliferativa del epitelio se limita a las espermatogonias y a los espermatozoides cercanos a la base. El núcleo es por lo general ovoide, con uno o más plegamientos en su superficie, presenta un nucleoplasma relativamente homogéneo, pero posee un nucleólo grande y muy característico. El citoplasma contiene numerosas mitocondrias alargadas y finas paralelas al eje mayor de la célula, el retículo endoplásmico granular es escaso, pero el retículo agranular está bien desarrollado, en particular cerca de la base de la célula. La presencia de un retículo endoplásmico liso bien desarrollado en la porción basal se ha postulado que participa en la secreción de hormonas esteroides (72). En ciertas fases del ciclo espermatogénico, se encuentran acúmulos de retículo liso en el citoplasma inmediatamente vecino al capuchón acrosómico de cada espermátida vecina. La importancia de esta localización del retículo liso no se ha explicado, pero podría ser una explicación de la función de "*célula nodriza*" de las células de Sertoli (72). Proporcionan apoyo mecánico y protección a las células germinales en desarrollo y participan en su nutrición, participan en la liberación de los espermatozoides maduros.

Interacciones Sertoli-Leydig

La espermatogénesis normal requiere de la participación de la hormona foliculo estimulante (FSH), TES y de las CS. La FSH se une a la superficie de las CS estimulando la adenilciclase y de este modo activando a la proteína cinasa (72). La TES interactúa con los receptores a andrógenos en CS para activar los genes necesarios para los procesos de diferenciación. La disminución de las respuestas de las CL a la LH seguida de la administración de LH parece ser debida a un sistema de control intratesticular para

regulación de la producción de TES. La FSH estimula la síntesis de andrógenos unida a la proteína y al complejo enzima aromataasa en la CS (72). Las alteraciones producidas en el testículo por la lesión o desaparición de las células tubulares o intersticiales, sugiere la existencia de una dependencia funcional entre las diferentes poblaciones celulares (166,171). En la CL se ha demostrado la presencia de péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC), cuya síntesis es regulada por la LH (101). El papel de estos péptidos derivados de la POMC sobre el funcionamiento de las células de Sertoli es diverso (9). Tanto el testículo adulto como fetal producen β -endorfina y se han encontrado receptores para estos opioides en las células de Sertoli (51). Trabajos recientes indican que en el medio condicionado que se obtiene del cultivo de células de Sertoli, se encuentran sustancias que modulan el desarrollo y la función de las CL. Existen evidencias que sugieren que las células de Sertoli producen péptidos del tipo GnRH (174) que se unen a los receptores correspondientes que se encuentran en la membrana de la CL (175). Los péptidos tipo GnRH y sus agonistas producen efectos estimulatorios sobre la esteroidogénesis en la CL (110) e inhiben la respuesta a la LH. La presencia de estos péptidos no se halla limitada al testículo, sino que se les ha descrito también en el ovario, lo cual sugiere su participación en la regulación de la función gonadal. Además el líquido intersticial del testículo contiene factores que modulan el efecto de LH sobre la permeabilidad capilar (72).

LA VEJEZ Y LA GLANDULA PINEAL

El **envejecimiento** se refiere a aquellos cambios postmaduracionales que fundamentan el incremento de la vulnerabilidad a los desafíos, de tal modo que se disminuye la capacidad de sobrevida (170). El envejecimiento de cualquier sistema de nuestro organismo puede ser cuantificado por la disminución del funcionamiento, en el sistema nervioso central (SNC), el cual se refleja por una disminución de la capacidad de éste, observada en los humanos en su pérdida de creatividad. Un particular aspecto del SNC en la edad avanzada es la carencia de conexión entre la parte intelectual y los cambios neuropatológicos (1). El envejecimiento ejerce profunda influencia en el sistema endócrino, tanto de animales como humanos. Es conocido, que las ratas macho seniles exhiben una disminución de las concentraciones séricas de LH, de FSH y de TES, mientras que la PRL se incrementa (19,105,109,127,163). Se ha propuesto que estas alteraciones endócrinas relacionadas con el envejecimiento pueden estar ligadas a eventos que ocurren tanto en el cerebro, hipotálamo, hipófisis anterior, como en las gónadas (19,105,109,127,163,181), así como los mecanismos de retroalimentación que controlan la liberación de gonadotrofinas y prolactina (105).

La principal hormona de la glándula pineal, la Melatonina se encarga de controlar entre otras funciones la maduración sexual, su producción disminuye con la edad (81,148). Se postula que está involucrada en la inmunoregulación de los procesos de la vejez y la senectud (154).

El efecto de injerto de pineal de ratones jóvenes (3 meses de edad) a viejos (17 meses de edad) da como resultado que se prolongue la vida por 6 meses más, que en el caso de los animales control, de tal forma que se ha sugerido la posibilidad de que la pineal de los jóvenes pueden tener un efecto de rejuvenecimiento, que retarden las patologías propias de la vejez (125). El interés de los injertos de pineales se ha basado en estudios de Pierpaoli y cols. (125) en los que se administró MEL en el agua de beber durante el ciclo luz-oscuridad a hembras BALB/C y a ratones machos C56BL/6 en los cuales se observó una prolongación de la sobrevida de animales de 15 y 19 meses de edad. En contraste cuando la MEL se administra a 1 año de edad a ratones hembra C3H/He, estos sufren una muerte prematura debido al desarrollo de tumores de ovario en ratones tratados con MEL. Esto demostró que el ovario de la rata contienen receptores para MEL que pueden modular la función del ovario (173), de tal modo que la esteroidogénesis puede ser afectada por las concentraciones de MEL (211).

En el proceso de la evolución cada especie viva tiene un conjunto genético codificado en mensajes y programas a desarrollar. En esta forma el proceso, filogenético y ontogenético, a través de cada individuo, desarrolla nuevas funciones, el desarrollo sistemático de la materia orgánica se hace muy complicado, a ella se agrega la complejidad cibernética y cualitativa, más la interacción con los factores del ambiente externo y la autoorganización de orden genético, así como de factores ambientales, lo que conduce a: disminución de la capacidad de adaptación, de la capacidad inmunológica contra las infecciones, menor capacidad defensiva contra los riesgos extraños al organismo vivo y una disminución progresiva en la capacidad de recuperación. El denominador común de los fenómenos que se presentan en el proceso de senectud, es la disminución progresiva del número de células en los tejidos, una vez concluido el periodo de crecimiento y desarrollo del organismo. Es en realidad, un declive funcional general que afecta a todo el organismo en forma diferenciada y no homogénea. Las tasas de envejecimiento varían a lo largo de órganos, tejidos y sus constituyentes celulares, posiblemente la causa final del envejecimiento pudieran estar en el deterioro de algunos tipos celulares donde esa tasa es más rápida y los efectos mayores (170). Los cambios relacionados con la vejez en la biodisponibilidad de las proteínas pueden ser debidas a una ineficaz síntesis de proteínas y una alteración de las modificaciones postraslacionales, incluyendo posibles alteraciones conformacionales (170).

La vejez esta controlada por un reloj biológico, el mecanismo de acción puede estar asociado a la acción de MEL sobre el (NSQ) (138,157). Las observaciones realizadas tanto con injertos de pineal, como con la administración de MEL han permitido sugerir que la pineal como su principal hormona participan en el control de la ritmicidad circadiana, así como la puberal y en la ciclicidad sexual estacional, de tal modo que se sugiere que la g.p. está íntimamente relacionada con la programación y prevención o retardo de la vejez (183). Así, la MEL puede ser considerada como un cronómetro hormonal, mientras que la g.p funciona como un "transductor neuroendócrino", es decir cumple la función de transferir información intercelular cuya principal hormona está involucrada en la fototraducción, éste órgano transporta sus impulsos que interaccionan con el NSQ del hipotálamo (138,183,210) y el sistema reproductor (66,146).

Otras de las funciones de la pineal es controlar la adaptación estacional; particularmente, modula en animales estacionales los cambios en el peso y el color del pelaje. la hibernación, los cambios en la capacidad termogénica y la regresión gonadal. Se ha considerado que la tiroides puede ser la vía a través

de la cual MEL puede ejercer sus efectos directos de inmunopotenciación y antiestrés, así como de retardo de la vejez (123,124,139).

Rebuffat y cols. (137) demostraron que la administración de MEL durante fotoperíodos largos causa una hipertrofia de la zona glomerular adrenal, con un aumento de las concentraciones de aldosterona en suero de ratas. Troiani y cols. (201) encontraron que las inyecciones de solución salina inhiben la síntesis de MEL las cuales mejoran la vía de entrada de los corticoesteroides, en vista de que la hipofisectomía bloquea esta respuesta.

En la búsqueda de los mecanismos por los que MEL disminuye con la edad, Tang y cols. (198) demostraron que hay una disminución de la producción de serotonina, norepinefrina y dopamina en ratones de 18 meses de edad, a la media noche, lo que sugiere que la actividad simpática incrementa la conversión de serotonina a MEL en la pineal (198). Una disminución de la función pineal en la vejez podría reflejarse en una disminución del tono simpático, puesto que hay un retardo de la recuperación de la regulación β -adrenérgica inducido por Desmetilimipramina en ratas seniles de 20 a 26 meses de edad. Esto fue confirmado por Greenberg (71) quién demostró que en ratones viejos de 24 meses de edad, se disminuye la capacidad de desarrollar la hipersensibilidad β -adrenérgica, durante el ciclo de luz o después de la administración de reserpina, cuando la producción de NE se inhibe o disminuye.

Estudios *in vivo* mostraron que la sensibilidad noradrenérgica disminuye con la edad y hay una relación inversa entre corticoesteroides y MEL, en la depresión (12), lo que sugiere una relación con la síntesis de MEL. En apoyo a esto, el estrés causado por inmovilización ó por frío, provoca una marcada elevación de las concentraciones de MEL, y una inhibición de la monoaminoxidasa (MAO) atribuida a la "tribulina" (21). Inhibidores de la MAO (A y B) como son la Clorgilina y el Deprenil respectivamente, incrementan la síntesis de MEL (43,120); recientemente se ha sugerido que el Deprenil puede incrementar la longevidad y el desarrollo sexual en roedores machos.

Wright y cols. (215) demostraron que los niveles del factor nervioso de crecimiento (NGF) en la vejez disminuyen en el GCS y en la pineal, cambios que se han relacionado con el sexo. El NGF se encuentra elevado en machos o después del tratamiento con testosterona.

Otro de los mecanismos de regresión de la función testicular en la vejez, que han sugerido Dax y Sugden (39) en ratas Wistar es la disminución de la síntesis de MEL con la edad, debido a una reducción de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT).

Uno de los biomarcadores del envejecimiento es un cambio en la proporción entre las poliaminas. Las poliaminas son cationes intracelulares clave, que modulan la síntesis de RNA y DNA (57), entre otras funciones.

La MEL en el humano tiene un efecto inhibidor directo sobre la proliferación de las células cancerígenas en cultivo de tejidos de cáncer de mama. Esto se asocia con una acción letal directa sobre las células neoplásicas y con inducción a los estrógenos (77). MEL ejerce también una acción inhibitoria directa sobre el adenocarcinoma de próstata. Se ha reportado que la MEL tiene actividad oncostática, efectos de inmunostimulación y probablemente efectos de rejuvenecimiento en roedores viejos (126,200). Los injertos de pineal prolongan el tiempo de vida, previenen la degeneración y desincronización celular, inhiben también la carcinogénesis (126,200).

La teoría de los radicales libres y el envejecimiento supone que las enfermedades durante la vejez son causadas por radicales libres altamente reactivos y sus reacciones con biomoléculas (180). Se ha propuesto, que los procesos de la vejez están asociados con la desintegración interna, desdiferenciación y degeneración celular debido a modificaciones irreversibles oxidativas de las biomoléculas, así, son responsables de otras disfunciones de la vejez y otras enfermedades tales como el cáncer, arteriosclerosis, infarto cardíaco, diabetes y demencia (54,105,155,167,200). Los organismos viejos exhiben una reducida capacidad de adaptación y son incapaces de responder adecuadamente a una gran variedad de estímulos adversos (41,54,167). El ritmo diario de MEL en roedores puede preservarse durante la vejez por la restricción de alimento u otros tratamientos nutricionales y farmacéuticos, estos tratamientos prolongan y mejoran la calidad de la vida, así como retardan el comienzo de enfermedades neurodegenerativas (154,155,172). La administración exógena de MEL prolonga la vida de roedores de laboratorio (126,155).

Recientemente, se ha demostrado que la generación de radicales hidróxilo guarda una relación inversamente proporcional a la longevidad de las especies. Los organismos con una baja generación de radicales hidróxilo o mayor defensa antioxidante enzimática viven más tiempo (180). Se sabe que los radicales hidróxilo, mediadores de la peroxidación y el daño a biomoléculas se acumulan exponencialmente durante la vejez (29,75,155,180,184,206,219). Los tratamientos que reducen los radicales hidróxilo, tales como la restricción de la dieta y el tratamiento con MEL, pueden substancialmente prolongar la duración de la vida (38,155).

Es razonable que los factores de peroxidación son dependientes de cambios rápidos y retrasan el tiempo existente después de que los sistemas biológicos

se pueden adaptar a ellos (155). Si el factor peroxidante afecta en un tiempo corto, la capacidad del sistema biológico es abatida y el daño celular puede ocurrir.

La teoría de los radicales libres y las enfermedades propias del proceso de la vejez, son causadas por radicales libres altamente reactivos y sus reacciones con biomoléculas (180). El radical hidróxilo es altamente reactivo a la molécula de O_2 mediadora de la toxicidad del oxígeno. Los radicales hidróxilo pueden ser generados en sistemas bioquímicos, en los cuales la transición de metales o quelantes biológicamente activos, tales como las porfirinas y flavinas, así como los oxidantes, peróxido de hidrógeno y los reductantes o donadores de electrones están presentes simultáneamente. Los radicales hidróxilo no son únicamente perjudiciales de las especies reactivas a Oxígeno generadas *in vivo*, pero ciertamente es el más reactivo, tóxico e intermediario electrofílico endógeno. Secundariamente, las especies reactivas a oxígeno producidas por acciones devastadoras de radicales hidróxilo a biomoléculas, tales como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas que puedan iniciar y promover las reacciones de autocatálisis. Con estos datos se ha propuesto que probablemente todo el daño debido al estrés oxidativo es exclusivamente mediado por la generación de radicales hidróxilo (155). Los organismos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidantes contra acciones perjudiciales de los radicales hidróxilo. La MEL es el más potente y efectivo "secuestrador" endógeno de los radicales hidróxilo; debido a su naturaleza lipofílica esta indolamina puede penetrar en cada compartimiento celular, y provee un sitio protector a ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (180). A la vejez se han asociado enfermedades tales como la diabetes, enfermedad de Alzheimer's (29,184,199) que se caracterizan por una alta concentración de radicales hidróxilo (62), lo mismo que la carcinogénesis y el daño por perfusión después de isquemia (42,58). Otro desorden degenerativo, la enfermedad de Parkinson puede ser producida por exposición a toxinas que catalizan la generación de estos radicales dañinos (36). De este modo, la vejez puede ser considerada como un proceso causado por el aumento de los radicales hidróxilo y la deficiencia en MEL.

La disminución de las concentraciones de magnesio conduce a una reducción del metabolismo energético, que incrementa la generación de radicales libres y finalmente se produce un colapso de los gradientes de cationes a través de la membrana celular que origina una sobrecarga de calcio, que induce muerte celular por una generación excesiva de radicales hidróxilo. En contraste, la administración de Mg^{++} , aumenta la utilización de energía y glucosa, estabiliza enzimas y membranas así mismo protege biomoléculas contra el

daño oxidativo por radicales reactivos. La administración de sales de Mg^{++} prolonga la vida y retarda el deterioro morfológico, bioquímico, electrofisiológico y conductual (155).

Por otra parte, se ha sugerido que la administración crónica de sales de Mg^{++} pueden prevenir la vejez relacionada con la disminución de la síntesis de MEL (126). Existe evidencias de que la MEL puede modular las concentraciones de los cationes Zn y Mg; el Mg^{++} incrementa la síntesis de MEL (93).

Se ha sugerido a través de todos estos estudios que la MEL prolonga la vida, indicándonos que debemos explorar los mecanismos que puedan estar involucrados. Se sabe que todas las situaciones que se asocian con una producción reducida de MEL nocturna, pueden afectar la longevidad, calidad de vida y por lo consiguiente una buena salud (155).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En décadas anteriores se especulaba que la deficiencia de la función testicular era una consecuencia de la vejez. La testosterona (TES) es el principal andrógeno secretado por los testículos, esta hormona es esencial para la espermatogénesis. Durante la vejez hay atrofia testicular espontánea en los hámsters dorados, esto se manifiesta por disminución progresiva del peso del testículo.

Se sabe que la administración de TES durante la vejez produce cambios significativos en diferentes tejidos. Por otro lado, algunas hormonas entre las que se incluye a la melatonina (MEL) son capaces de potenciar los efectos de diferentes compuestos endógenos y exógenos. Con base en lo anterior, sería importante saber si MEL potencia los efectos, a nivel tisular, de la administración de TES y si esta potenciación induce cambios morfológicos y fisiológicos en el testículo de hámsters dorados seniles.

HIPOTESIS

La administración simultánea de MEL y TES a hámsters seniles induce cambios morfológicos, fisiológicos y estructurales en el testículo de estos animales por potenciación de los efectos de MEL y/ó TES.

OBJETIVO

Caracterizar los efectos de la administración de Melatonina, Testosterona y de la administración simultánea de ambas a hámsters dorados seniles.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron hámsters macho *Mesocricetus auratus*, de 18 meses de edad (seniles) (152), de un peso aproximado de 130 g, mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad 12-12h, alimentados ad libitum.

Los animales se dividieron en cuatro grupos de 8 animales por jaula.

GRUPO I. Control. Se administró aceite de cártamo (a.c.) durante 15 días y polietilenglicol (p.g) durante 3 días, a partir del día 13 del tratamiento.

GRUPO II. Se administró Melatonina (MEL) 1 mg/kg de peso, disuelta en p.g., administrada durante 3 días consecutivos.

GRUPO III. Se administró Testosterona (TES) 500 µg/kg de peso, disuelta en a.c., administrada durante 15 días consecutivos.

GRUPO IV. Se administraron MEL+TES, 500 µg/kg de peso de TES durante 15 días y MEL los días 13,14 y 15 del tratamiento.

La administración de la MEL se llevó a cabo por vía intraperitoneal y la de TES por vía subcutánea.

Las hormonas fueron disueltas en el vehículo correspondiente, a una dosis de 0.1 ml/100g de peso corporal. Los animales fueron inyectados a las 8 AM.

Los animales se decapitaron tres horas después de la última dosis del tratamiento. Se diseccionaron de inmediato los testículos y órganos accesorios (epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales y próstata) colocándolos sobre hielo, se limpiaron de tejido adiposo y posteriormente se obtuvieron el peso húmedo y los diámetros mayor y menor de los testículos.

Estudios morfométricos

Una vez pesados los testículos y órganos accesorios se colocaron en solución de formaldehído al 4%, diluido en amortiguador de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M).

Los testículos fueron seccionados en dos partes por medio de un corte sagital, los cortes fueron procesados en un histoquinete (Technicare); para ser incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes longitudinales de testículo de 6 µm de espesor en un microtómo manual (American Optical). Se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (99), para su análisis microscópico.

Los cortes histológicos fueron observados con un microscopio óptico Wild Heerbrugg Switzerland.

Para su estudio los túbulos fueron divididos en: túbulos seminíferos **centrales** (aquellos que se encontraban en el centro del corte longitudinal de testículo) y

periféricos (alrededor de la pared del testículo, a partir del límite del testículo $1879 \mu\text{m}^2$ dirigido hacia al centro).

En este estudio se evaluaron los siguientes parámetros:

a) **Número total de túbulos seminíferos**, se contaron todos los túbulos presentes en un corte sagital de testículo.

b) **Número total de túbulos con actividad espermatogénica**, se cuantificaron los túbulos en los que se observaron espermatozoides.

c) **Diámetro**. En todos los casos se tomó en cuenta para esta medición el diámetro menor. Las mediciones de diámetro y espesor de pared fueron realizadas con un micrómetro (laminilla graduada $10 \mu\text{m}/2\text{mm}$) adaptada a un ocular graduado 15x y un objetivo de 16x en el caso de diámetro y 40x para el espesor de la pared.

d) **Espesor de la pared de los túbulos seminíferos**. Se midió desde el límite de la luz hasta la membrana basal del túbulo.

e) **Número de células de Leydig**. Se evaluaron 10 campos por corte de testículo bajo una magnificación de 40x. Se cuantificó el número total de células del tejido intersticial, clasificándolas como: células de Leydig, fibroblastos y células endoteliales.

Concentración de Testosterona en plasma sanguíneo

Las concentraciones de TES fueron medidas por RIA en los cuatro grupos estudiados (31). El principio de esta técnica esta basada en la competencia de los sitios de unión de la TES marcada y la TES presente en (plasma), para ser evaluada por el número de sitios de unión al anticuerpo. Después de la incubación, la cantidad de TES marcada se une al anticuerpo, y es relacionado inversamente con la cantidad de TES no marcada presente en la muestra (31).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como valores promedio \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm \text{DE}$) de la media.

Los resultados se analizaron con la aplicación de un análisis de varianza ANOVA para obtener la significancia de las diferencias entre grupos.

Se aplicaron además la prueba de Kruskal-Wallis para comparación entre dos grupos, así como la "t" de student (179).

RESULTADOS

Hámsters de 18 meses, mostraron cambios después de los tratamientos con melatonina, testosterona y melatonina+testosterona.

En relación al peso corporal, sólo en el caso de los animales tratados con MEL se observó una baja de peso del 10%, en comparación con el grupo control. Con la administración de TES y MEL+TES no se observaron cambios significativos (gráf. 1).

Al comparar el peso de los testículos del grupo control con los grupos experimentales, se observaron diferencias significativas, con MEL se encontró una reducción del peso testicular ($p < 0.001$), mientras que en los animales tratados con TES y MEL+TES un aumento del 30%, que se correlacionó también con el peso testicular relativo (peso de los testículos/PC) (gráf. 2). En cuanto al tamaño del testículo, este disminuyó en un 45% ($p < 0.01$) en los animales tratados con MEL, mientras que tuvo un aumento del 10% ($p < 0.02$) con TES y MEL+TES (gráf. 3). En la gráf. 4 se muestra el efecto de las hormonas sobre el peso de los órganos accesorios (epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales y próstata). El peso de estos órganos disminuyó significativamente ($p < 0.01$) con la administración de MEL y se incrementó en un 25% con TES. Después del tratamiento con MEL+TES, los animales presentaron un incremento de un 80% en el peso de los órganos accesorios. Los resultados señalan que tanto los testículos como los órganos accesorios de los hámsters seniles fueron sensibles al efecto involutivo de MEL, en cambio presentaron un efecto trófico sobre estos órganos con la administración de TES y MEL+TES.

Estudios morfométricos

Grupo I: Se observaron túbulos seminíferos de diámetro promedio de $250 \mu\text{m} \pm 26$, irregulares y tortuosos, separados por espacios intertubulares amplios, ocupados por tejido intersticial laxo y con escasas células de Leydig (fig. 3A). Los túbulos seminíferos presentaron una pared delgada, con escasas células germinativas, con aspecto vacuolado y áreas compactas, la luz se encontró muy amplia. No se identificaron espermatozoides maduros (fig. 3A, 4A).

Grupo II: Se observaron numerosos túbulos seminíferos con diámetro mayor a $155 \mu\text{m} \pm 37$ separados entre sí por tejido intersticial denso con pocas células de Leydig (fig. 4B,6B). El espesor de la pared del tubo era irregular y

presentaba solución de continuidad, con presencia de vacuolas, la luz se observó ocupada por prolongaciones celulares, aunque no se determinó si éstas correspondían a espermatozoides. No fue posible identificar espermatogonias (fig. 3B, 4B).

Grupo III: Cada túbulo seminífero midió aproximadamente $240 \mu\text{m} \pm 40$, el túbulo se encontró revestido por un complejo epitelio germinal o seminífero irregular, formado principalmente por células espermatógenas y unas cuantas células de Sertoli esparcidas a lo largo del túbulo, la luz se observó amplia y con algunos espermatozoides (fig. 3C, 4C). Algunos túbulos presentaron paredes fenestradas. Se observaron algunas células de Leydig en el intersticio (fig. 6C).

Grupo IV: Los túbulos seminíferos midieron $270 \mu\text{m} \pm 20$, y se observaron agrupados densamente (fig. 3D). La pared era gruesa y contenía numerosas células del epitelio germinal en todas las etapas de maduración (fig. 5). En el epitelio seminífero fue posible observar los diferentes estadios de la espermatogénesis, espermatogonias, espermatocitos, células de Sertoli, espermátides jóvenes y maduras y espermatozoides a lo largo del túbulo. Las células espermatógenas se diferenciaron de manera progresiva de la región basal a la luminal, en donde se observaron espermatozoides maduros. Se encontraron variaciones regionales en la densidad del epitelio germinal, lo cual sugiere que el proceso de diferenciación que culmina con la formación de espermatozoides estaba más avanzado en algunos sitios que en otros (fig. 4D, 5). La etapa final de la espermatogénesis, indicada por la aparición de espermatozoides en el compartimiento luminal se advirtió en el 80% de los túbulos seminíferos. Se encontraron numerosas células de Leydig en el tejido intersticial (fig. 6D, 7).

Compartimiento Tubular

Al contar el número total de túbulos seminíferos con y sin actividad espermatogénica se encontró que fue de 1150 ± 146 en el grupo control. Con MEL el número de túbulos disminuyó en un 20% ($p < 0.01$), (gráf. 5).

En lo que respecta al número de túbulos con actividad espermatogénica, en comparación con el grupo control (366 ± 61), se observó una disminución del 52%, en los animales tratados con MEL. A los que se les administró TES presentaron un aumento del 40% y con MEL+TES, el incremento fue del 100% ($p < 0.001$) (gráf. 6).

En los hámsters del grupo control se observó actividad espermatogénica muy reducida. En este grupo, los túbulos seminíferos presentaban un diámetro de $250 \mu\text{m} \pm 26$, con paredes de $70 \mu\text{m} \pm 8$ de espesor, debido a la disgregación celular, presentaban además una luz amplia y nula presencia de espermatozoides (gráf. 7, 8, fig. 3A, 4A). Al ser comparados con este grupo, los animales tratados con MEL, presentaron túbulos seminíferos con diámetro menor (38%) (gráf. 7), pared adelgazada y reducción de la luz (gráf. 8, fig. 3B, 4B). El grupo tratado con TES, en cambio, presentaron un incremento del 10% en el diámetro de los túbulos, observándose un incremento del 5% en el espesor de la pared y la luz tubular (gráf. 7, 8, fig. 3C y 4C). Con MEL+TES se observó un aumento en el diámetro de los túbulos centrales 15% ($p < 0.01$), mientras que en los periféricos, sólo fue de un 9.3% (gráf. 7). El espesor de la pared de los túbulos centrales y periféricos se incrementó en un 26% debido a que las células presentaban una mejor organización ($p < 0.01$) (gráf. 8). La luz se encontró ocupada por espermatozoides (fig. 3D, 4D y 5).

Compartimiento intersticial

En el grupo control se encontraron de 8 ± 3 células de Leydig por campo (gráf. 10, fig. 6A). En los animales tratados con MEL, este número se incrementó a 15 ± 9 (gráf. 10, fig. 6B), mientras que con TES fué de 21 ± 9 (gráf. 10, fig. 6C) y con MEL+TES, 32 ± 12 ($p < 0.001$), (gráf. 10, fig. 6D,7). Por otro lado, se cuantificaron además de las células de Leydig, las otras células presentes en el tejido intersticial (fibroblastos y células endoteliales), observándose que el número de estas últimas es también modificado por los diferentes tratamientos (gráf 9). Se observó la siguiente relación en el número total de células: MEL < TES < MEL+TES ($p < 0.001$).

Fig. 3. **A) C**, en esta preparación los túbulos son de aspecto irregular, aparecen separados entre sí por espacios vacíos y poco tejido intersticial, las paredes se encuentran fenestradas y vacuoladas, luz amplia y vacía. **B) MEL**, túbulos contorneados de aspecto irregular, muy pequeños, rodeados por tejido intersticial acidófilo, sus paredes se encuentran adelgazadas, con epitelio germinal desprendido y con vacuolas, se advierten pocas células de Leydig, la luz se encuentra obstruida por prolongaciones celulares. **C) TES**, se advierten túbulos seminíferos en cortes transversales y oblicuos separados entre sí por pequeña cantidad de tejido intersticial. Adviértanse también los grupos de células de Leydig. **D) MEL+TES**, los túbulos seminíferos aparecen agrupados muy juntos, con luz por lo general amplia y tapizada por espermatozoides. El tejido limitante que rodea a cada túbulo es acidófilo y hay poco tejido intersticial entre los túbulos (Corte transversal H-E 43.31 x)

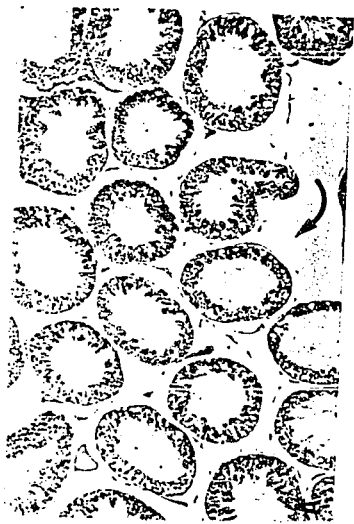
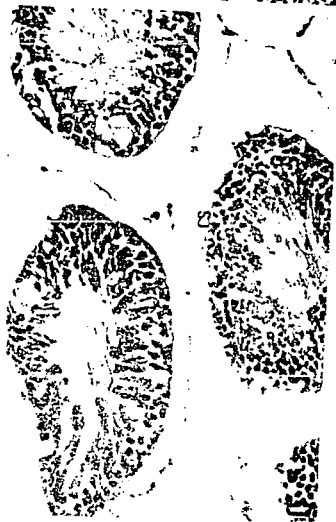


Fig. 4. A) C, túbulos seminíferos de hámsters viejos, en los cuales se puede observar la pared muy adelgazada con vacuolas, epitelio germinal desprendido (flechas), luz muy amplia y vacía, escasas células de Leydig. **B) MEL**, se observa atrofia testicular, se advierten células germinales desprendidas, marcada oligospermia, las paredes con muchas vacuolas, luz amplia y tapizada de prolongaciones celulares, se observan algunos grupos de células de Leydig (CL). **C) TES**, túbulos seminíferos rodeados por tejido conectivo intersticial, muestran una luz amplia que en algunos contienen espermatozoides. El epitelio seminífero, formado principalmente por células espermatógenas y células de Sertoli (CS) a lo largo del túbulo. **D) MEL+TES**, los túbulos seminíferos están rodeados por tejido limitante y separados por un estrecho espacio intersticial (flechas) que contienen vasos sanguíneos. El epitelio seminífero contienen células espermatógenas y células de Sertoli, los núcleos de las CS (puntas de flechas) son pálidos y ovoides, con un nucleólo bien marcado. Las células espermatógenas se diferencian de manera progresiva de la región basal a la luminal, cerca de la cual se aprecian las cabezas de los espermatozoides de coloración intensa (Corte transversal H-E, 110x).



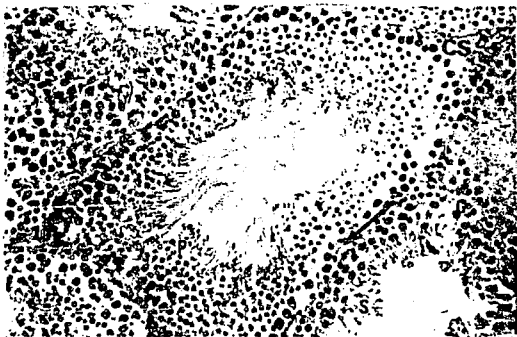


Fig. 5. REACTIVACION DE LA ESPERMATOGENESIS Y RESTAURACION DEL TUBULO SEMINIFERO DE TESTICULO DE HAMSTERS DE 18 MESES DE EDAD, ADMINISTRACION DE MEL+TES. Se ilustran porciones de dos túbulos seminíferos, separados por sus láminas basales y por el tejido limitante (flechas). Las células de Sertoli (CS), se encuentran cerca de la membrana basal de cada túbulo. Los espermatogonios (G) se localizan directamente arriba de la lámina basal. Los espermatocitos primarios (P) y secundarios (S) se encuentran en la siguiente capa, enseguida se observan espermátides. Se observan espermatozoides cuyas colas se proyectan hacia la luz (Corte transversal H-E, 110x).

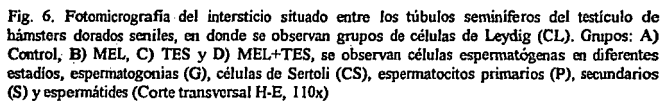
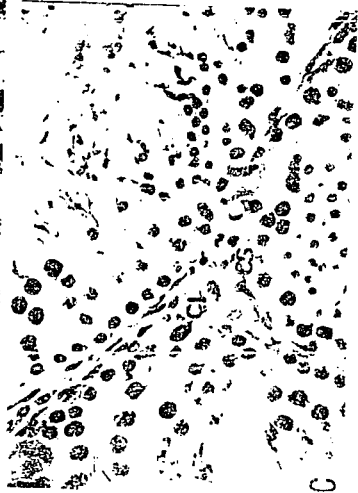


Fig. 6. Fotomicrografía del intersticio situado entre los túbulos seminíferos del testículo de hámsters dorados seniles, en donde se observan grupos de células de Leydig (CL). Grupos: A) Control, B) MEL, C) TES y D) MEL+TES, se observan células espermátogenas en diferentes estadios, espermatogonias (G), células de Sertoli (CS), espermátocitos primarios (P), secundarios (S) y espermátides (Corte transversal H-E, 110x)



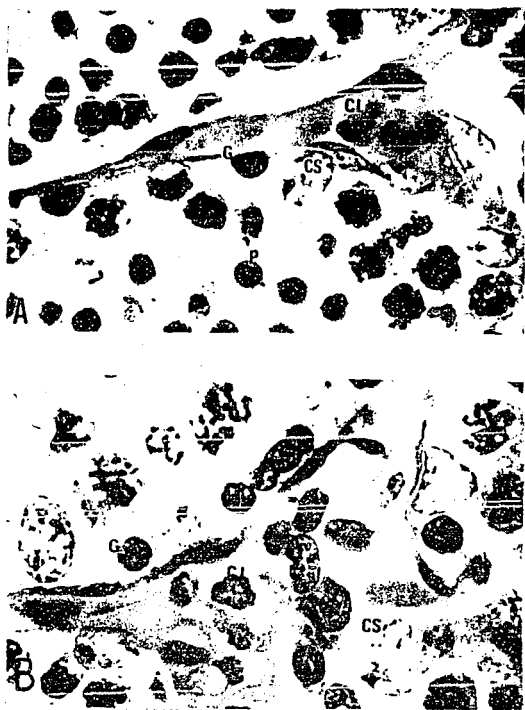
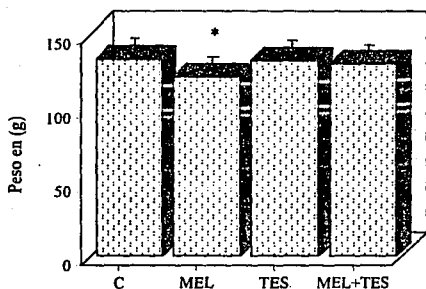
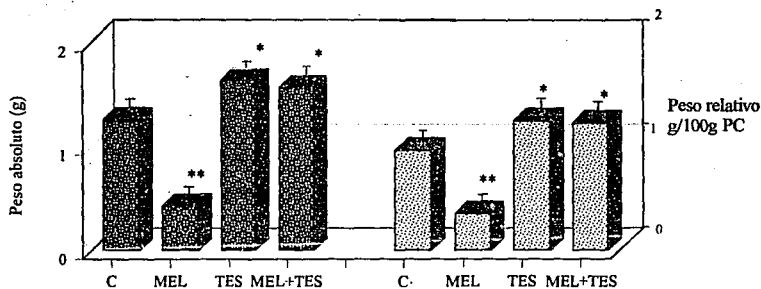


Fig. 7. Fotomicrografía de la lámina basal de túbulos seminíferos en donde se observan células de Sertoli (CS) (A y B) y células espermátogenas en diferentes estadios de maduración, espermatogonias (G), espermatocitos primarios en proceso de división (P) (A), en el intersticio de los túbulos se observan grupos de células de Leydig, (A y B) cambios producidos por la administración de MEL+TES (Corte transversal H-E, 275x)



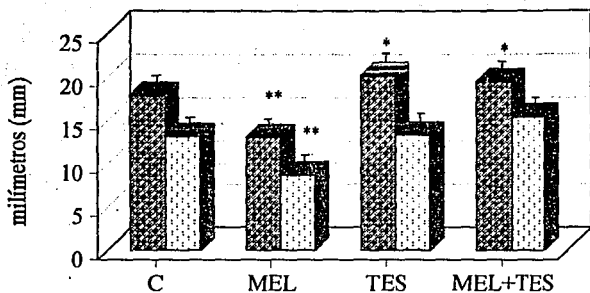
Gráf. 1. Efecto de los diferentes tratamientos con MEL (1mg/kg), TES (500µg/Kg) y MEL+TES, sobre el peso corporal de hámsters seniles. Los valores representan el promedio \pm DS de cada grupo (n=8), *p < 0.02 comparación con el grupo control. Se aplicó la prueba "t" de student y ANOVA.



Gráf. 2. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el peso absoluto y relativo de testículos de hámsters. Los valores representan el promedio \pm DS de cada grupo (n=8), *p < 0.01 y **p < 0.001, comparación con el grupo control.

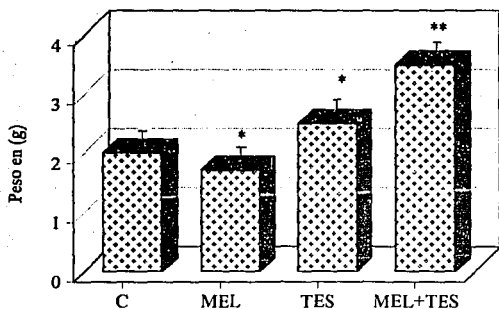
 Peso absoluto

 Peso relativo

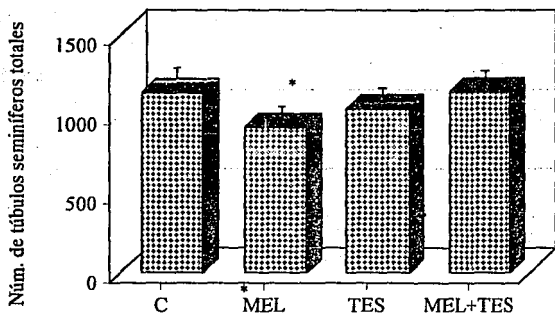


Gráf. 3. Diámetro mayor y menor de testículo de hámsters seniles. Los valores representan \pm DS (n=8), *p<0.02, ** p<0.01, comparación con el grupo control.

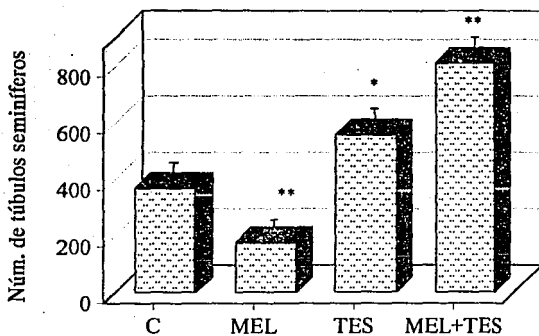
 Diámetro mayor
 Diámetro menor



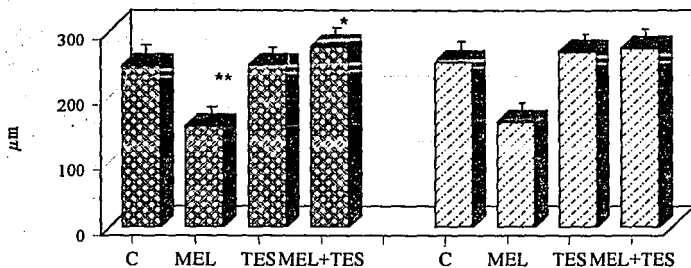
Gráf. 4. Peso de los órganos accesorios (vesícula seminal, conductores deferentes y epidídimo) y el efecto de la administración de MEL, TES y MEL+TES. Los valores representan promedio \pm DS de cada grupo (n=8), *p<0.01, **p<0.001 comparación con el grupo control.



Gráf. 5. Efecto de los diferentes tratamientos con MEL, TES y MEL+TES sobre el número de túbulos seminíferos totales de hámsters seniles. Los valores representan el promedio \pm DS de cada grupo (n=8) * $p < 0.01$, comparación con el grupo control.



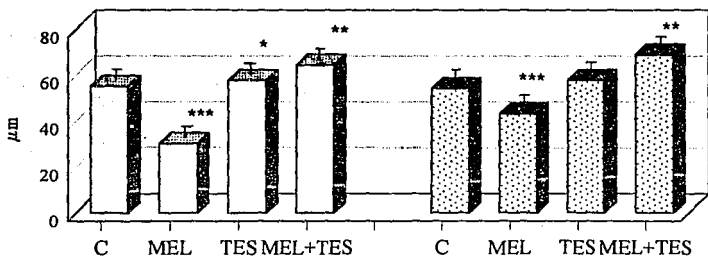
Gráf. 6 Número de túbulos seminíferos con actividad espermatogénica. Los valores representan el promedio \pm DS de cada grupo (n=8), * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, comparación con el grupo control.



Gráf. 7. Efecto de los diferentes tratamientos con MEL, TES y MEL+TES sobre el diámetro de los túbulos seminíferos centrales y periféricos. Los valores representan el promedio \pm DS de cada grupo (n=8), * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, comparación con el grupo control.

● Centrales

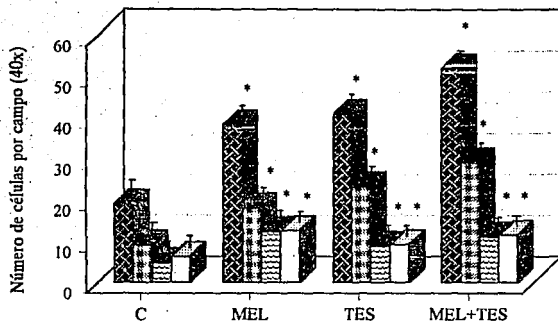
▨ Periféricos



Gráf. 8. Efecto de los distintos tratamientos sobre el espesor de pared de túbulos seminíferos centrales y periféricos. Los valores representan el promedio \pm DS de cada grupo (n=8), * $p < 0.01$ y ** $p < 0.001$, comparación con el grupo control.

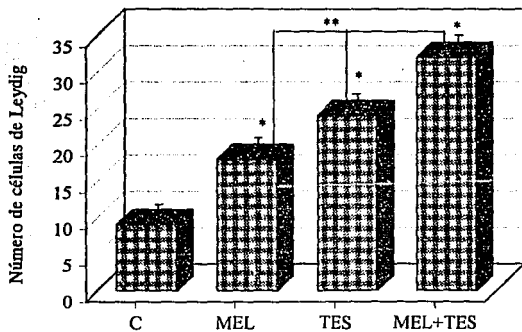
○ Centrales

▨ Periféricos

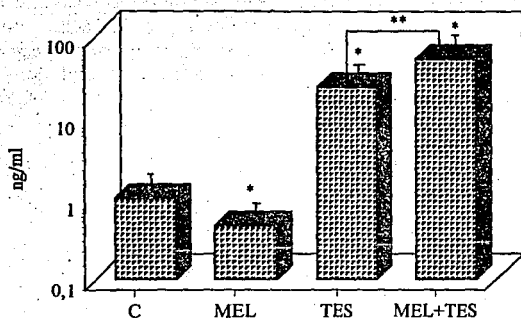


Graf. 9. Efecto de los diferentes tratamientos de MEL, TES y MEL+TES sobre las células de tejido intersticial (células de Leydig, fibroblastos y células endoteliales) de testículo de hámsters seniles. Evaluadas en un campo de (40x). Los valores representan \pm DS de cada grupo (n=80), *p<0.001 comparación con el grupo control.

 Total de células
 Células de Leydig
 Fibroblastos
 Endoteliales



Graf. 10. Número de células de Leydig en testículo de hámsters dorados con los diferentes tratamientos. Evaluadas en un campo de (40x) de corte longitudinal de testículo. Los valores representan el promedio \pm DS de cada grupo (n=80), *p<0.001, comparación con el grupo control, **p<0.01 comparación con MEL+TES.



Gráf. 11. Incremento de las concentraciones de Testosterona en plasma sanguíneo, con los diferentes tratamientos MEL, TES y MEL+TES. Los valores representan el promedio \pm DS de cada grupo (n=8), * $p < 0.001$, comparación con el grupo control, ** $p < 0.001$.

DISCUSION

La incidencia de las enfermedades neurodegenerativas aumenta dramáticamente con el envejecimiento de la población; las investigaciones biomédicas sobre la vejez y enfermedades relacionadas podrían proponer soluciones a estos importantes retos del tercer milenio.

Se ha propuesto que algunas de las alteraciones endócrinas que se presentan en la vejez están ligadas a eventos que ocurren tanto en el sistema nervioso como en las gónadas (19,106,109,127,163,181), principalmente a alteraciones en los mecanismos de retroalimentación que controlan la liberación de gonadotrofinas y prolactina (106). Existen pocos estudios sobre los cambios en la regulación de la función pineal que acompañan a la vejez, y los mecanismos involucrados en la supresión de la función testicular en el hámster dorado. La disminución de MEL acompaña también a la caída generalizada de la función de muchos órganos en la vejez (150). El testículo exhibe una disminución de su tamaño y peso, una reducción en el número de células de Leydig, alteraciones estructurales de los túbulos seminíferos y disminución de la actividad espermatogénica (gráf. 2, fig. 3A, 4A, 6A).

Los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis de que el envejecimiento va acompañado de alteraciones en la función testicular y de otras glándulas cuya actividad se relaciona con ésta, lo cual resulta en una baja concentración de testosterona circulante y en una pobre capacidad reproductiva. Así, en el grupo control de animales seniles, los principales cambios histológicos del testículo durante la vejez se caracterizaron por: disminución de la actividad espermatogénica, disminución en el número de células de Leydig, fibroblastos y capilares sanguíneos, así como desorganización de los elementos estructurales que constituyen a los túbulos seminíferos (gráf. 6, 9,10 fig. 3A,4A,6A); dichos cambios están relacionados con la disminución significativa de las concentraciones de TES (gráf. 11). Con respecto a la función testicular, los datos presentados aquí indican que con la administración simultánea de MEL+TES a hámsters seniles, se induce un incremento en la población de células de Leydig (gráf. 10), se observa también aumento de la actividad espermatogénica (gráf.6, fig. 4D) y reorganización de la morfología del tubo seminífero (fig.5).

Por otra parte, los resultados del presente trabajo concuerdan con lo reportado por Tamarin y cols. (190), quienes demostraron que la administración de MEL causa regresión del sistema reproductivo en hámsters hembras y machos. En nuestro estudio, la administración de MEL produjo atrofia testicular, también se encontró que las células de Leydig presentaron menor tamaño y

baja funcionalidad, cambios asociados a una disminución de las concentraciones de TES en sangre en comparación con el grupo control, se observó, sin embargo, un aumento en el número de células (células de Leydig, fibroblastos y células endoteliales).

En el presente estudio, a los animales que se les administró **Testosterona**, mostraron incremento de la actividad espermatogénica y en el número de células de Leydig, los cambios morfológicos de los túbulos seminíferos incluyen: incremento en el espesor de la pared y una mejor organización del epitelio germinal, observándose espermatogénesis en el 70% de los túbulos.

En los estudios realizados por Reiter y cols. (151) postulan que los organismos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante, uno de ellos es la melatonina, la cual puede penetrar en cualquier compartimiento celular y tiene efecto protector para ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Se ha demostrado que la generación de radicales hidroxilo está relacionada con la longevidad de las especies y que los organismos con una baja generación de radicales hidroxilo o mayor defensa antioxidante enzimática o no enzimática viven más tiempo (180). En la vejez existe disminución en la síntesis y secreción de MEL, así como una deficiencia generalizada en los mecanismos de defensa no enzimáticos, lo cual se traduce en una menor capacidad para hacer frente al estrés oxidativo. Ello conduce a un estado de mayor oxidación que es perjudicial y finalmente lleva a la degeneración y muerte celular. Por lo tanto, Reiter y cols (151) concluyen que MEL podría ser utilizada como una hormona de "rejuvenecimiento", que retarde los procesos de la vejez.

El proceso de modificación covalente, a través de fosforilación y desfosforilación de proteínas, es reconocido como uno de los principales mecanismos que regula las funciones celulares (63). Procesos tan diversos como la transducción de señales hormonales, regulación de rutas metabólicas, organización del citoesqueleto, regulación de la transcripción genética, neurotransmisión, regulación de la apertura o cierre de canales iónicos, contracción, secreción, motilidad, crecimiento, diferenciación, fertilización y aún la memoria, son todos regulados por modificaciones postraduccionales (63).

Los principales procesos celulares regulados por CaM incluyen la fosforilación de proteínas; metabolismo de nucleótidos cíclicos, transporte de Ca^{++} y regulación de la organización del citoesqueleto (6).

Benitez King y cols. (15) sugieren que las modificaciones postraduccionales de las proteínas del citoesqueleto se acompañan de cambios en la distribución y arreglo de citoqueratina, vimentina y filamentos de actina en las células

MDCK. Se sugiere que son cambios de fosforilación los que diferencian a los filamentos que participan en algunos de los eventos celulares (crecimiento y proliferación), incremento del número de células y en los procesos de rearreglo y reconstitución celular (14). Diversos estudios han demostrado que MEL modifica el patrón de crecimiento celular y el arreglo de microtúbulos y microfilamentos. Se sugiere que algunas de las modificaciones del citoesqueleto podrían ser debidas a un mecanismo común. El mecanismo de acción de MEL para inducir cambios en el citoesqueleto podría involucrar la unión de MEL con tubulina o actina, es posible que la respuesta a MEL esté determinada por el fenotipo o por la fase del ciclo celular (14). Por lo tanto, el mecanismo a través del cual MEL sincroniza los diferentes ritmos del cuerpo, podría ser el rearreglo cíclico de microtúbulos y microfilamentos. Lo anterior se demostró en células en cultivo (MDCK y N1E-115). Benitez King y cols. concluyen que los cambios observados en el citoesqueleto podrían ser el resultado de la unión de MEL a calmodulina (CaM) (15), de tal modo que esta unión MEL-CaM es capaz de modular la actividad celular. La información de nuestros resultados está basada en estudios realizados por otros investigadores que podrían ser utilizados para apoyar nuestros hallazgos.

Nosotros encontramos que en los animales tratados con MEL, TES y MEL+TES mostraron un incremento sobre el número de células (Leydig, fibroblastos, endoteliales) del tejido intersticial del testículo, además un rearreglo de la morfología estructural de los túbulos seminíferos, siendo más notable la reconstitución histológica, el incremento y funcionalidad celular, en el grupo tratado con MEL+TES (gráf. 9).

Después de revisar exhaustivamente la bibliografía de los últimos diez años, no hemos encontrado estudios en relación a los cambios histológicos producidos por la administración de Melatonina y Testosterona, mucho menos se ha estudiado sobre estos cambios en la etapa senil. Además existen pocos estudios sobre el efecto de la vejez sobre la función testicular del hámster. Muchos de los estudios de los efectos de MEL y TES sobre los cambios metabólicos celulares y la función gonadal, han utilizado modelos *in vitro*. La importancia de este estudio fue la de determinar y cuantificar *in vivo* los cambios en la histología del testículo producidos por la administración de MEL, TES y MEL+TES a hámsters seniles (18 meses).

Los hallazgos histológicos y fisiológicos más significativos de este estudio son las modificaciones encontradas en testículo después de la administración simultánea de MEL+TES. Se observa regeneración de la actividad espermatogénica (gráf. 6) y restauración de la estructura y de los elementos que

constituyen al túbulo seminífero (fig. 5), así como incremento de las concentraciones de TES en plasma (gráf. 11). Se advierte también la reanudación de la actividad sexual, misma que se encontraba atenuada, manifestándose por cortejo, monta, intromisión y eyaculación, que resulta en la restauración de la capacidad de los machos seniles para embarazar a las hembras (manuscrito en preparación).

En el presente estudio se observó que el tamaño, peso y estructura histológica del testículo de hámster senil son hipersensibles a la administración de MEL (gráf 1,3, fig. 3B), mientras que la administración de TES y el sinergismo de MEL+TES tienen efectos de reconstitución histológica y reactivación de la espermatogénesis (fig. 3C, 3D), así como aumento de tamaño y peso del testículo (gráf. 1,3).

El mecanismo responsable de la sensibilidad a MEL y la potenciación de los efectos por MEL+TES se desconocen, sin embargo existen estudios en los cuales nos hemos apoyado, y hemos especulado algunos posibles mecanismos:

1. Es factible que MEL+TES activen a las células gonadotropas, que regulan la producción del factor liberador de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo, estimulando la liberación de LH, la cual actúa sobre las células de Leydig, induciendo la producción de TES (72).

2. Posiblemente, MEL+TES actúa por un mecanismo de retroalimentación negativa, es decir, el pulso de TES exógeno incrementa las concentraciones plasmáticas de TES, que a su vez ejercen un efecto favorable sobre la actividad espermatozoaria. Griffin y cols., (72) sugieren que en este proceso participan las células de Sertoli, las cuales secretan inhibina, que tiene efecto supresor sobre FSH y LH. Es posible que la administración simultánea de MEL+TES tenga un efecto bloqueador sobre la inhibina, esto puede ser a nivel de su producción por las células de Sertoli y/o a nivel de sus sitios de acción, de tal modo que al suprimir a la inhibina, se estimula la producción endógena de LH, hormona que activa a las células de Leydig. Esta activación se manifiesta por un incremento en el número de células (gráf. 10) y un aumento en las concentraciones plasmáticas de su secreción, TES (gráf. 11).

3. La administración de TES reactiva la espermatogénesis en los animales del grupo III. TES no sólo es necesaria para la espermatogénesis, sino también para la maduración del esperma (72). O'Malley y cols. (119) realizaron algunos experimentos en los que demostraron que las hormonas esteroides provocan una serie de efectos en las células germinales, entre los que están la aparición y acumulación de nuevas especies de ácidos ribonucleicos (RNAs) en el núcleo, la estimulación de la síntesis de proteínas específicas, el incremento correspondiente en el contenido celular neto de RNA mensajero específico. Por

aparición y acumulación de nuevas especies de ácidos ribonucleicos (RNAs) en el núcleo, la estimulación de la síntesis de proteínas específicas, el incremento correspondiente en el contenido celular neto de RNA mensajero específico. Por otra parte, Wikstrom y cols., (213) mediante estudios bioquímicos sugieren que los receptores a andrógenos pertenecen a una familia de proteínas reguladoras de genes que funcionan como transductores de señales y como factores de transcripción. De acuerdo con estos datos, se propuso que los receptores citoplásmicos, al unirse a la hormona, son trasladados rápidamente al núcleo. Esto se manifiesta por estimulación de la actividad mitótica, resultando en un aumento del número de células de Leydig y recuperación de la morfología de los túbulos seminíferos.

En base a los resultados de reconstitución morfológica e histológica, así como la proliferación celular en testículo de hámsters seniles, y la reanudación de la conducta sexual (manuscrito en preparación), descritas en este estudio, es factible proponer un modelo que trate de explicar la participación sinérgica de MEL+TES. De tal forma que la administración simultánea de dosis farmacológicas de MEL+TES tengan un efecto potenciador sobre la reconstitución y reactivación de la gónada atrófica senil. La administración de TES durante 15 días, probablemente prepare la función de los túbulos seminíferos seniles, manifestado en una reconstitución sobre los elementos germinales que constituyen al túbulo seminífero y un aumento de las concentraciones endógenas de TES en plasma sanguíneo, mientras que MEL administrada durante los últimos 3 días potencia los efectos sobre la reconstitución y funcionalidad celular que proporciona TES. Es decir, MEL tendrá la función de *regular* los patrones de crecimiento celular, por lo que se observe un incremento en el número de células, con procesos de rearrreglo celular, aumento de tamaño (14) y reorganización de los elementos estructurales de los túbulos seminíferos estimulado por el efecto de TES el cual es *potenciado* por MEL. Se sabe que la respuesta de las células esteroideogénicas a la estimulación trófica involucra Ca^{++} . La participación de Ca^{++} en las actividades celulares esta influenciada por Calmodulina, de tal modo que la CaM es importante en la respuesta de las células de Leydig al efecto estimulante de LH (166). Posiblemente MEL potencie la acción de TES, este efecto podría estar regulado por la interacción con Ca^{++} y Calmodulina (14).

CONCLUSIONES

1) El testículo de hámsters seniles (GRUPO I) se caracteriza histológicamente por la presencia de cambios atróficos en los túbulos seminíferos con disminución del espesor de la pared, luz amplia, escaso número de células del epitelio germinal y nula actividad espermatogénica, en el intersticio se observa disminución en el número de células de Leydig, disminución en la red capilar y espacios intertubulares amplios ocupados por tejido conectivo laxo, estos cambios podrían considerarse características histológicas propias del envejecimiento.

2) La administración de MEL, produjo atrofia testicular, los túbulos seminíferos fueron pequeños, con adelgazamiento del espesor de la pared, luz reducida, escaso número de células del epitelio germinal y nula actividad espermatogénica, en el intersticio se observa un ligero incremento del número de células de Leydig, fibroblastos y células endoteliales.

3) El resultado de la administración de TES resulto en un aumento del tamaño de los túbulos seminíferos, engrosamiento del espesor de la pared, luz reducida, con reorganización del epitelio germinal. En los espacios intersticiales se observa un aumento en el número de células (Leydig, fibroblastos y endoteliales).

4) Dosis farmacológicas de MEL+TES actúan directamente en la reconstitución del tejido testicular de hámsters dorados seniles.

5) En consecuencia, se concluye que es probable que la administración de MEL+TES participe importantemente en la restauración de la capacidad reproductiva así como de la histología y fisiología de los testículos de estos animales viejos.

6) Nuestros resultados del rearrreglo morfológico, reorganización e incremento celular en el túbulo seminífero producidos por MEL+TES sugieren un posible mecanismo de acción que sea mediado quizá por la interacción de la CaM propuesto por Benitez-King y cols. (15) y el sinergismo observado con MEL+TES, en el hámster senil.

De este modo, los procesos de la vejez podrían ser retrasados por la administración de estas hormonas y su potente acción geroprotectora, lo que permitiría la reproducción, y por lo tanto se incrementaría la longevidad y la calidad de vida de estos animales viejos.

ABREVIATURAS

CaM: calmodulina
CL: células de Leydig
CS: célula de Sertoli
FRM: formación reticular mesencefálica
FSH: hormona folículo estimulante
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas
GCS: ganglio cervical superior
hCG: hormona gonadotrófica coriónica
HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa
LH: hormona luteinizante
MAO: monoaminoxidasa
MDCK: células de riñon de perro
MEL: melatonina
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
NIE-115: células de neuroblastoma de murinos NIE-115
NAT: N-acetiltransferasa
NE: norepinefrina
NGF: Factor nervioso del crecimiento
NSQ: núcleo supraquiasmático
PC: peso corporal
PDE: fosfodiesterasa dependiente de Calmodulina
POMC: proopiomelanocortina
PRL: prolactina
REL: retículo endoplásmico liso
RH-tracto retinohipotalámico
SNC: sistema nervioso central
TES: testosterona

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Agnati, L. F., Benfenati, V., Solfrini, G., Biagini, K., Fuxe, D., Guidolin, D., Carani, C. y Zini, I. 1990. Brain Aging and Neuronal Plasticity. Annals New York Academy of Sciences. pp 180-186.
2. Anderson, E. 1965. The anatomy of bovine and ovine pineals. Light and electron microscopic studies. J. Ultrastruct. Res. (Suppl.), 8:1-80.
3. Antón-Tay, F. Díaz, J. L. y Fernández-Guardiola, A. 1971. On the effect of melatonin on the human brain. Life Sci. 10:841-850.
4. Antón-Tay, F. 1974. Melatonin: effects on brain function. Adv. Bichem. Psychopharmacol., 11:315-324.
5. Antón-Tay, F., Forray, F. y Ortega-Corona, B. G. 1988. Subneural fate of intracerebroventricular injected ^3H -melatonin. J. Pineal Res., 5:125-133.
6. Antón-Tay, F., Huerto-Delgadillo, L., Ortega-Corona, B., y Benitez-King, G. 1993. Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. From basic science to clinical application. Y. Touitou, J. Arendt and P. Pévet, editors, pp 41-45.
7. Banerjee, S. y Margulis, L. 1973. Mitotic arrest by melatonin. Exp. Cell. Res. 78:314-318.
8. Bardasano, J. L. 1978. La Glándula Pineal. Ed. H. Blume. Madrid, España, pp 11-20.
9. Bardin, C. W., Shaha, C., Mahter, J., Salomon, Y., Margioris, A. N., Liotta, A. S., Gerandai, I., Chen, C. L., Krieger, D. T. 1984. Identification and possible function of proopiomelanocortin-derived peptides in the testis. Anals. N. Y. Acde. Sci. 438:436-364.
10. Bassi, C. J. y Powers, M. K. 1987. Circadian rhythm in goldfish visual sensitivity. Invest. Ophthalm. vis. Sci. 28: 1811-1815.
11. Beck-Friis, J., Von Rosen D., Kjellman B. F., Ljungren J. G. Wetterberg L. 1984. Melatonin in relation to body measures, sex, age, season and the use of drugs in patients with major affective disorders and healthy subjects. Psychoneuroendocrinol. 9:261-277.
12. Beck-Friis, J. Kjellman, B. F. Aperia, B. 1985. Serum melatonin in relation to clinical variables in patients with major depressive disorder and a hypothesis of a low melatonin syndrome. Acta Psychiatr. Scand. 71:319-330.
13. Bedrak, E. Z. Chap, y R. Brown. 1983. Age-related changes in the hypothalamic-pituitary-testicular function of the rat. Experimental Gerontology, 18: 95-104.
14. Benitez-King, G., Cázares, F. y Meza, I. 1989. Synthesis and phosphorylation of cytoskeletal proteins during *in vitro* biogenesis of MDCK cell monolayers. J. of Cell. Sci. 93:53-61.
15. Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., Antón-Tay, F. 1990. Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115. J. Pineal Res 9:209-220.
16. Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., Antón-Tay, F. 1991. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity *in vitro*. Brain Research, 557:289-292.

17. Bernstein, S. A., Breeding, D. J. y Fisher S. K. 1984. The influence of light on cone disk shedding in the lizard *Sceloporus occidentalis*. J. Cell. Biol. 99:379-389.
18. Besharse, J. C. e Iuvone, P. M. Circadian clock in *Xenopus* eye controlling neural serotonin N-acetyltransferase. Nature, 305: 133-135.
19. Bethca, C. L. y Walker, R. F. 1979. Age-related changes in reproductive hormones and Leydig cell responsivity in the male Fischer 344 rat. J. Gerontol. 34:21-27.
20. Bex, F. J., y Bartke, A. 1977. Testicular LH binding in the hamster: modification by photoperiod and prolactin. Endocrinology, 100, 1223-1126.
21. Bhattacharya, S. Glover, V. K., McIntyre, I. 1988. Stress causes an increase in endogenous monoamine oxidase inhibitor (tribulin) in rat brain. Neurosci. Lett. 92:218-221.
22. Bittman, E. L. y Karsch, F. J. 1984. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. Biol. Reprod. 30: 585-593.
23. Blask, D. E., Nodelman, J. L. Leadem, C. A., Richardson, B. A. 1980. Influence of exogenously administered melatonin on the reproductive system and prolactin levels in inbred male rats. Biol. Reprod. 22:507.
24. Blask, E. D. Nodelman, J. L. 1979. Antigonadotrophic and prolactin-inhibitory effects of melatonin in anomic rats. Neuroendocrinology, 29:406.
25. Bubenik, G. A., Brown, G. M. y Grotta, L. J. 1976. Immunohistochemical localization of melatonin in the rat Harderian gland, J. Histochem. Cytochem., 24: 1173-1177.
26. Cardinali, D.P., Vacas, M. I. 1978. Feedback control of pineal function by reproductive hormones-a neuroendocrine paradigm. J. Neural Transm. (Suppl.), 13:175-201.
27. Cardinali, D. P. 1981. Hormone effects on pineal gland. In: The Pineal Gland, Vol. 1. Anatomy and Biochemistry, edited by R. J. Reiter, Boca Raton, F.L.: CRC Press Inc pp, 243-272.32.
28. Cardinali, D. P. 1981. Melatonin. A mammalian pineal hormone. Endocr. Rev. 2:327-354.
29. Ceballos-Pivot, I., Nicole, A., Sinet, P-M. 1992. Cellular clones and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. Models for the study of free radical metabolism and aging. In: Free Radicals and Aging. I. Emerit, B. Chance eds. Birkhauser Verlag, Basel, pp 89-98.
30. Cohen, M., Roselle, D. y Chabner, B. 1978. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. Nature, 274:894-985.
31. Colzieher, J. W., T. S. Dozier, K. D. Smith, y Steinberger. 1976. Improving the Diagnostic Reliability of Rapidly Fluctuating Plasma Hormones By Optimized Multiple Sampling Techniques. I. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 824.
32. Cramer, H., Rudolph, J. Consbruch, U. and Kendell, K. 1974. The effects of melatonin on sleep and behaviour in man. Adv. Biochem. Psychopharmac. 11: 187-191.
33. Chan, S. W. C., Leatham, J. H. y Esashi, T. 1977. Testicular Metabolism and serum Testosterone in Aging Male rats. Endocrinology, 101: 128.
34. Chan, S. W. C., Mcfarlin, S. y Zummo, J. 1981. Ninth International Symposium on Comparative Endocrinology Hong-Kong, p 56 A (Abstract).

35. Chen, H. J., Walfish, P. G. 1979. Effects of age and testosterone propionate on the hypothalamo-pituitary-thyroid system in male rats. J. Endocr. 82: 53-59.
36. Chiueh, C. C., Krishna, G., Tuls, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S. J., Murphy, D. L. 1992. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus: Effects of MPP+. Free Rad. Biol. Med. 13:581-583.
37. Christensen, A. K. 1975. Leydig cells. En: Handbook of Physiology, sect 7, vol.5 Eds. D. W. Hamilton, R.O. Greep. William & Wilkins, Baltimore, pp 57-94.
38. Chung, M. H., Kasel, H., Nishimura, S., Yu, B. P. 1992. Protection of DNA damage by dietary restriction. Free Radic. Biol. Med. 12:523-525.
39. Dax, E. M., Sugden, D. 1988. Age-associated changes in pineal adrenergic receptors and melatonin synthesizing enzymes in the Wistar rat. J. Neurochem. 50:468-472.
40. Dearry A., and Barlow R. B. Jr. 1987. Circadian rhythms in the green sunfish retina. J. gen Physiol. 89: 745-770.
41. Delbarre, B., Delbarre, G., Calinon, F. 1992. Free radicals and neurotransmitters in gerbil brain. Influence of age and ischemia reperfusion insult. In: Free radicals and Aging. I. Emerit, B. Chance. eds. Birkhaeuser Verlag, Basel, pp 199-212.
42. Delbarre, B., Floyd, R. A., Delbarre, G., Calinon, F. 1992. Glutamate accumulation and increased hydroxyl free radical formation in the abdominal aorta and heart of gerbil after ischemia/reperfusion insult. Free Radic. Biol. Med. 13:31-34.
43. Deleo, F., Ruggeri, P., Valenti, A. 1983. Monoamino-oxidase activity in rat pineal gland. Histochemical studies. Bas. Appl. Histochem. 27:211-217.
44. Dunaway, J. E. 1969. Alteration in the timing of PMS-induced ovulation following pinealectomy. Neuroendocrinology 5:281.
45. Duncan, M.J., Takahashi, J. S. y Dubocovich, M. L. 1989. Characteristics and autoradiographic localization of 2-¹²⁵I-iodomelatonin binding sites in djungarian hamster brain. Endocrinology, 125:1011-1017.
46. Durville, H. 1929. Los misterios iniciáticos. Barcelona. Pellicena Camacho.
47. Ebadi, M. 1984. Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. "The Pineal Gland", Reiter, R. J., de., Raven Press, New York, ppl-38.
48. Edinger, T. 1955. The size of parietal foramen and organ in reptiles. A rectification. Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard Coll. 114:3-34
49. Eiknes, K. B. 1975. Biosynthesis and secretion of testicular steroids. En: Handbook of Physiology, sect. 7, vol. 5. Eds. D. W. Hamilton, R. O. Greep. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 95-115.
50. Ellis, L. C. 1972. Inhibition of rat testicular androgen synthesis in vitro by melatonin and serotonin. Endocrinology, 90:17-28.
51. Fabbri, A., Tsai-Morris, C. H., Luna, S., Faioli, F., Dufau, M. L. 1985. Opiate receptors are present in rat testis. Identification and localization in Sertoli cells. Endocrinology, 117:2544-2546.
52. Faiman, C., y J. S. D. Winter. 1971. Djurnal cycles in plasma FSH (testosterone and cortisol in men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:186-192.

53. Ficher, M., y Steinberg, E. 1971. Formation and metabolism of testosterone in testicular tissue of immature rats. *Endocrinology* 89: 679-84.
54. Finch, C. E. 1987. Neural and endocrine determinants of senescence: Investigation of causality and reversibility by laboratory and clinical interventions. In: Modern Biological Theories of Aging. H. R. Warner, R. N. Butler, R. L. Sprott, E. L. Schneider eds. Raven Press, New York, pp. 261-386.
55. Finocchiaro, L. M. E., Arzt, E. S., Fernández-Castelo, S., Crescuolo, M., Finkielman, S. y Nahmod, V. E. 1988. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J. Interferon Res.* 8: 705-716.
56. Foley, B. P., Cairncross, K. D., Foldes, A. 1986. Pineal Indoles: Significance and Measurement. *Neuroscience & Behavioral Reviews*, 10: 273-293.
57. Fraschini, F., Ferioli, M. E., Nebuloni, R., Scalabrino, G. 1980. Pineal gland and polyamines. *J. Neural Transm.* 48:209-221.
58. Frenkel, K. 1992. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol. Ther.* 53: 127-166.
59. Gaston, S., y Menaker, M. 1967. Photoperiodic control of hamsters testis. *Science*, 158:925.
60. Gern, W. A., Owens, D. W. y Ralph, C. J. 1978. The synthesis of melatonin in the trout retina. *J. Exp. Zool.* 206: 263-270.
61. Ghanadian, R., Lewis, J. G. y Chrisholm, G. D. 1975. Serum testosterone and dihydrotestosterone changes with age in rat. *Steroids*, 25(6): 753-62.
62. Ghiselli, A., Laurenti, O., De Mattia, G., Maianin, G., Ferro-Luzzi, A. 1992. Salicylate hydroxylation as an early marker of in vivo oxidative stress in diabetic patients. *Free Radic. Biol. Med.* 13:621-626.
63. Girault, J.A. 1994. Protein Kinases and Phosphatases. *Neurotrans. Res. Bioch. Int.* X(3): 1-6.
64. Glansdorf, P., Prigogine, I. 1971. Structure, Stability and Fluctuations. Wiley. New York. Tab. I, II, Geriatrika I: 11.
65. Goldman B., Hall V. Hollister, C. Reppert S., Roychoudhury P. Yellon, S. Tamarkin, L. 1981. Diurnal changes in pineal melatonin content in four rodent species: relationship to photoperiodism. *Biol. Reprod.* 24:778.
66. Goldman, B. D., Carter, D. S., Hall, V. D., Roychoudry P., Yellon S. M. 1982. Physiology of pineal melatonin in three hamsters species. In: Klein DC (ed) *Melatonin Rhythm Generating System*, Karger, Basel, p. 210.
67. González-Brito, A., Jones, D. J., Adame, R. M. y Reiter, R. J. 1988. Characterization and measurement of [¹²⁵I]-pindolol binding in individual rat pineal glands: existence of a 24 h rhythm in b-adrenergic receptor density. *Brain Res.*, 438: 108-114.
68. Govinda, A. 1972. Foundations of tibetan mysticism. London. Rider and Co.
69. Gray, G. D. 1978. Changes in the levels of luteinizing hormone and testosterone in the circulation of ageing male rats. *J. Endocr.* 76(3): 551.
70. Gray, G. D. Smith, E. R., Dorsa, D. M. y Davidson, J. M. 1981. Sexual behavior and testosterone in Middle Aged Male Rats. *Endocrinology* 109, 1597.

71. Greenberg, L. H. 1986. Regulation of brain adrenergic receptors during aging. Fed. Proc. 45: 55-59.
72. Griffin, J. E., Ojeda R. S. 1992. Textbook of Endocrine Physiology. Second Edition. New York Oxford, Capitulo 9, pp 168-188.
73. Harman, S. M., Martin, C. E. y Tsitouras, P. D. 1979. In: Endocrine aspects of Aging, Conference on the endocrine aspects of aging (edited by S.G. Korenman). p. 6, NIH, Bethesda, Maryland.
74. Hastings, M. H., Vance, G., Maywood, E. 1989. Phylogeny and function of the pineal. *Experientia* 45(10):903-1008.
75. Hayakawa, M., Hattori, S. Sugiyama, S., Ozawa, T. 1992. Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:979-985.
76. Hewing, M. 1976. Die postnatale Entwicklung der Epiphyse cerebri beim Goldhamster. *Verh. Anat. Ges.* 70:85-92.
77. Hill, S. M., Blask, D. E. 1988. Effect of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF7) in culture. *Cancer Res.* 48:1621-1626.
78. Hoffman, K. 1973. The influence photoperiod and melatonin on testis size, body eight, and pelage colour in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus sungorus*). *J. Comp. Physiol.* 85: 267-282.
79. Hoffman, K. 1978. Photoperiodic mechanism in hamsters: the participation of the pineal gland. In: *Environmental Endocrinology*, Assenmacher, I., Farner, D. S., editors, pp. 94-102 (Springer, New York).
80. Hoffman, K. 1981. In *Handbook of Behavioral Neurobiology*, J. Aschoff. Ed. (Plenum, New York). Vol. 4: 449-473.
81. Hoffman, K., Illnerova, H. y Vanecek, I. 1985. Comparison of pineal melatonin rhythms in young adult and old djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) under long and short photoperiods. *Neurosci. Lett.* 56: 39-43.
82. Inano, H. y B. Tamaoki, 1966. Bioconversion of Steroids in Immature rat testes *in vitro*. *Endocrinology* 79: 579.
83. Illnerova, H. Vanecek, J. Hoffman, K. 1983. Regulation of the pineal melatonin concentration in the rat (*Rattus norvegicus*) and in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 74A:155-159.
84. Illnerova, H. J., Vanecek. 1984. Circadian rhythm in inducibility of rat pineal N-acetyltransferasa after brief light pulses at night: control by a morning oscillator. *J. Comp Physiol.* 154:739-744.
85. Ito, T. y Matsushima S. 1968. Electron microscopic observations on the mouse pineal, with particular emphasis on its secretory nature. *Arch. Histol. Jpn.* 30: 1-15.
86. Kano, T., Miyachi, Y. 1976. Direct action of melatonin on testosterone and cyclic GMP production using rat testis tissue *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:969-975.
87. Kappers, J. A. 1976. The mammalian pineal gland, a survey. *Acta Neurochir.* 34:109-149.
88. Kavacs, K., Ilse, G., Ryan, N., Horvath, E., E. Chen, H. J., Walfish, P. G., 1980. Pituitary prolactin cell hyperplasia. *Hormone Res.* 12:87-95.

89. Kedziora, J., Bartosz, G. 1988. Down's syndrome: A pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. Free Radic. Biol. Med. 4:317-330.
90. Kinson, G. A. y Liu, C. C. 1973. Diurnal variation in plasma testosterone of the male laboratory rat. Horm. Metab. Res. 5: 233-4.
91. Klemcke, H. G., Bartke, A. y Borer, K. T. 1983. Testicular prolactin receptors and serum growth hormone in golden hamsters: effects of photoperiod and time of day. Biol. Reprod. 29:605-614.
92. Krause, D. N. y Dubocovich, M. L. 1990. Regulatory sites in the melatonin system of mammals. Trends Neurosci, 13:464-470.
93. Landfield, P. W., Baskin, K., Pitler, T. A. 1981. Brain aging correlates: retardation by hormonal-pharmacological treatments. Science, 214:581-584.
94. Lang, U., Aubert, M. L. y Sizonenko, P. C. 1981. Tissue distribution and subcellular location of melatonin receptors in the male rat. Experientia, 37:613.
95. Lang, U., Aubert, L., Conne, B.S., Bradtke, J. C., y Sizonenko, P. C. 1983. Influence of Exogeneous Melatonin on Melatonin Secretion and the Neuroendocrine reproductive axis of Intact Male rats during sexual maturation. Endocrinology, 112(5):1578.
96. Lewy, A. J., Tetsuo, M., S. P., Markey. 1980. Pinelectomy abolishes plasma melatonin in the rat. J. Clin. Endocrinol. Metab. 50:204-205.
97. Lynch, H. J., Ozaki Y., Shakal, D., Wurtman, R. J. 1975. Daily rhythm in human urinary melatonin sympathetic neural control of indoleamine metabolism in the rat pineal gland. Int. J. Biometeorol. 19:267.
98. Lynch, H. J., Wurtman, R. J. 1981. Melatonin levels as they relate to reproductive physiology. In: "Pineal Gland", Reiter, R. J., editor, pp. 3-48. (Karger, Basel).
99. Lynch, M. Ralph. Métodos de Laboratorio. Ed. Interamericana. 1987. pp. 1152,1153.
100. Lythgoe, J. N. y Shand, J. 1983. Endogenous circadian retinomotor movements in the neon tetra (*Paracheirodon innesi*). Invest. Ophthalm. vis. Sci. 24:1203-1210.
101. Margioris, A. N., Liotta, A. S. Vaudry, H., Bardin, C. W., Krieger, T. 1983. Characterization of immunoreactive proopiomelanocortin related peptides in rat testes. Endocrinology. 113:663-671.
102. Margolis, D. J., Lynch, R. G. 1981. Effects of daily melatonin injections on female reproduction in the white-foot mouse. *Peromyscus leucopus*. Gen. compar. Endocr. 44:530-537.
103. Matsushima, S. y Reiter, R. J. 1974. Comparative ultrastructural studies of the pineal gland of rodents. In: Electron Microscopic Concepts of Secretion, M. Hess, ed. John Wiley, New York, pp. 335-356.
104. Matsushima S. y Reiter, R. J. 1975. Ultrastructural observations of the pineal gland capillaries in four rodent species. Am J. Anat. 148: 463-478.
105. Meites, J. 1990. Aging: Hypothalamic catecholamines, neuroendocrine-immune interactions, and dietary restriction. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 195:304-311.
106. Mendieta, E., Salame, A., Herrera, J., Antón-tay, F. 1993. Melatonin inhibition of androgen biosynthetic pathway in Leydig cell (LC)-enriched cell fractions from normal adult rats. Mol. Androl. Vol. III: 319-329.

107. Mhatre, M. C. Van Jaarsveld, A. S. y Reiter, R. J. 1988. Melatonin in the lacrimal gland: first demonstrations and experimental manipulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1186-1192.
108. Miller, A. E. y Riegler, G.D. 1978. Serum testosterone and testicular response to HCG in young and aged male rats. *J. Geront.* 33:197.
109. Miller, A. E. y Riegler G. D. 1982. Temporal patterns of serum luteinizing hormone and testosterone and endocrine response to luteinizing hormone releasing hormone in aging male rats. *J. Gerontol.* 37:522-528.
110. Moger, W. H. 1984. Acute stimulation of rat Leydig cell steroidogenesis by gonadotropin-releasing hormone: investigation of the mechanism of action. In: *Hormone Action and Testicular Function*. Vol. 438. *Annls. N. Y. Acad. Sci.* pp. 629-631.
111. Moore, R. Y. y Card, J. P. 1985. Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms, in: *The Medical and Biological Effects of light* p. 123-133. Eds. R. J. Wurtman, M. J. Baum y J. T. Potts, Jr. New York Academy Sciences. New York.
112. Morales-Otal, A., Piña-Sánchez, P., Feria-Velasco, A. y Ortega-Corona, B. G. 1994. Estudio comparativo del efecto de la melatonina y la testosterona sobre testículo de hamsters dorados jóvenes y seniles. *Mem., Soc. Méx. Cienc., Fisiol.* 37: C-133.
113. Motta, M. Fraschini F., Martini L. 1967. Endocrine effects of pineal gland and of melatonin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126:431.
114. Mullen, P. E. y Smith, I. 1981. The endocrinology of the human pineal. *Br. J. Hosp. Med.* 25: 248-256.
115. Nayfeh, S. N., Barefoot, Jr. S. W. y Baggett, B. 1966. Metabolism of progesterone by rat testicular homogenates. II. Changes with age. *Endocrinology* 78: 1041-8.
116. Nelson, J. F., Latham, K. R., Finch, C. E. 1975. Plasma testosterone levels in C57BL/6J male mice: effects of age and disease. *Acta Endocr. Copenh.* 80:744-752.
117. Ng TB, Lo LLH. 1988. Inhibitory actions of pineal indoles on steroidogenesis in isolated rat Leydig cells. *J. Pineal Res.* 5:229-235.
118. Nishino, H. K., Kouzumi, C., McC. Brooks, H. 1976. The role of supraquiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Res.* 112: 45-59.
119. O'Malley, B. W., Tsai, S. Y., Bagchi M., Weigel, N.L., Schrader, W. T., Tsai, M.J. 1991. Molecular mechanism of action of a steroid hormone receptor. *Recent Prog. Horm. Res.* 47:1-24.
120. Oxenkrug, G., McIntyre, I., Mccauley, R., Yuwiler, A. 1988. Effect of selective monoamine oxidase inhibitors on rat pineal melatonin synthesis in vitro. *J. Pineal Res.* 5:99-109.
121. Pelliniemi, L. J., Niemi, M. 1969. Fine structure of the human foetal testis. I. The interstitial tissue. *Z. Zellforsch.* 99:507-522.
122. Pierce, M. E., y Besharse, J. C. 1986. Melatonin and dopamine interactions in the regulation of rhythmic photoreceptor metabolism in: Pineal and Retinal Relationships, p. 219-237. Eds. P. J. O'Brien y D. C. Klein. Academic Press. New York. 1986.

123. Pierpaoli, W., Maestroni, G. J. M. 1987. Melatonin: a principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its anti-aging effects. Immunol. Lett. 16:355-362.
124. Pierpaoli, W., Yi, C. X. 1990. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. I. Thymus-mediated, immunoreconstituting and antiviral activity of thyrotropin-releasing hormone. J. Neuroimmunol. 27:99-110.
125. Pierpaoli, W. A., Dall'ara, E., Pedrino, E. y Regelson, W. 1990. The Pineal Control of Aging. Annals New York Academy of Sciences. pp 291-313.
126. Pierpaoli, W., Dall'ara, A., Pedrino, E., y Regelson, W. 1991. The pineal gland and aging: The effects of melatonin and pineal grafting on the survival of older mice. Ann. N. Y. Acad. Sci. 621: 291-313.
127. Piva, F., R. Maggi, P. Limonta, D. Dondi y L. Martini. 1987. Decrease of muopioid receptors in the brain and in the hypothalamus of the aged male rat. Life Sci. 40: 391-398.
128. Plant, T. M. y Michael, R. P. 1971. Diurnal variations in plasma testosterone levels of adult male rhesus monkeys. Acta Endocrin. (Suppl) (Kbh), 155:69.
129. Poffenberger, M., y Fuller, G. M. 1976. Is melatonin a microtubule inhibitor. Exp. Cell Res. 103:135-141.
130. Powell, A. E 1971. El doble etérico. Buenos Aires. Kier
131. Powell, A. E. 1973. El cuerpo Astral. Buenos Aires. Kier.
132. Quay, W. B. 1964. Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115:710-712.
133. Quay, W. B. 1965. Histological structure and cytology of the pineal organ in birds and mammals. Prog. Brain. Res. 10:49-86.
134. Quay, W.B. 1974. Pineal Chemistry. C. C. Thomas, Springfield Illinois, 430 pp. 22.
135. Ralph, C. L., Mull, D., Lynch, H. J., Hedlund. 1971. A Melatonin Rhythm persists in rat pineals in darkness. Endocrinology 89: 1361-1363.
136. Ralph, C. L. 1978. Cytology of the pineal gland: Changes produced by various treatments. J. Neural Transm. (Suppl.), 13: 25-45.
137. Rebuffat, R. Mazzocchi, G. Stachowiak, A. 1988. A morphometric study of the effects of melatonin on the rat adrenal zona glomerulosa. Exp. Clin. Endocrinol, 91: 59-64.
138. Redman, J. S., Armstrong, S. y Ng, K. T. 1983. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. Science. 219:1080-1081.
139. Regelson, W. 1983. The evidence for pituitary and thyroid control of aging: is age reversal a myth or reality. The search for a "death hormone". "In Interventions in the aging process". W. Regelson & F. M. Sinex, Eds. 3-52. Alan R. Liss. New York.
140. Reiter, R. J. 1972. Evidence for refractoriness of the pituitary-gonadal-axis the pineal gland in golden hamsters and its possible implications in annual reproductive rhythms. Anat. Rec. 173:365-371.
141. Reiter, R. J. 1973. Comparative Physiology: pineal gland. Ann. Rev. Physiol. 35:305.
142. Reiter, R. J. 1973. Pineal control of a seasonal reproductive rhythm in male golden hamsters exposed to natural daylight and temperature. Endocrinology. 92:423-430.

143. Reiter, R. J In Greep, R. O. (ed.) 1974. Handbook of Physiology: Endocrinology IV, part 2, Am Physiol. Soc., Washington, D. C. p 519.
144. Reiter, R. J. Vaughan, M. K. Vaughan, G. M., Sorrentino Jr. S., Donofrio R. J. 1975. The pineal gland as an organ of internal secretion, In: Altschule MD (ed) Frontiers of Pineal Physiology. MIT Press, Cambridge, p 54.
145. Reiter, R. J., Blask, D. E., Johnson, L. Y., Rudeen, P. K., Vaughan, M. K., Waring, P. J. 1976. Melatonin inhibition of reproduction in the male hamster: its dependency on time of day of administration and of an sympathetically innervated pineal gland. Neuroendocrinology 22:107-116.
146. Reiter, R. J. 1980. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. Endocr. Rev. 1:109.
147. Reiter, R. J., Petterborg, L. J., Trakulrunsi, W. K. 1980. Surgical removal of the olfactory bulbs increases sensitivity of the reproductive system of female rats to the inhibitory effects of late afternoon melatonin injections. J. Exp. Zool. 212:47-52.
148. Reiter, R. J., Craft, C. M., Johnson, J. E., Jr., King, T. S., Richardson, B. A., Vaughan, G. M., Vaughan, M. K. 1981. Age-associated reduction in nocturnal melatonin levels in female rats. Endocrinology: 189: 1295-1297.
149. Reiter, R. J. 1981. The mammalian pineal gland: Structure and Function, Amer. J. Anat., 162: 287-313.
150. Reiter, R. J., Vriend, J., Brainard, G. C., Matthews, S. A. and Craft, C. M. 1982. Reduced pineal and plasma melatonin levels and gonadal atrophy in old hamsters kept under winter photoperiods. Exp. Aging Res. 8:27-30.
151. Reiter, R. J. 1983. The pineal gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. Psychoneuroendocrinol. 8: 31-40.
152. Reiter, R. J. 1983. Neuroendocrinology of melatonin, in: "Melatonin-Clinical Perspectives", Miles, A., Philbrick, D. R. S., and Thompson, C., eds., Oxford University Press, Oxford, pp. 1-42.
153. Reiter, R. J. 1991. Melatonin Synthesis: Multiplicity of regulation. Edited by R. Schwarcz, et al., Plenum Press, New York. pp. 149-158.
154. Reiter, R. J. 1992. The ageing pineal gland and its physiological consequences. BioEssays, 14(3):169-175.
155. Reiter, R. J., Poeggeler, B., Tan, D-X., Chen, L-D., Manchester, L.C., Guerrero, J.M. 1993. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. Neuroendocrinol. Lett., 15:103-116.
156. Reiklin, R. 1971. Relative efficacy of pinealectomy, hypothalamic and amygdaloid lesions in advancing puberty. Endocrinology 88:415.
157. Reppert, S. M. Weaver, D. R., Rivkees, S. A. y Stopa, G. A. 1988. Putative melatonin receptors in a human biological clock. Science, 242: 78-81.
158. Resko, J. A. y Eik-Nes, K. B. . 1966. Diurnal testosterone levels in peripheral plasma og human male subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 26: 573-6.
159. Reyes-Vázquez, C., Dafny, N. 1985. Interaction of norepinephrine and superior cervical ganglio input in the rat pineal body. Exp. Neurol. 90:552.
160. Reyes-Vázquez, C. B. Prieto Gómez, L., Aldes, D., Dafny, N. 1986. The rat pineal exhibits two electrophysiological patterns of response to microiontophoretical norepinephrine application. J. Pineal Res. 3:213-222.

161. Richardson, B. A., Petterborg, L. J., Vaughan, M. K. King, T. S. y Reiter, R. J. 1982. The effect of twice daily gonadotropin-releasing hormone (GnRh) administration and/or renal pituitary homographs on melatonin induced gonadal atrophy in male Syrian hamsters. In The pineal and its hormones, pp. 129-142. Ed. R. J. Reiter, Alan R. Liss, Inc., New York.
162. Riegle, G. D. y Meites, J. 1976. Effects of aging on LH and prolactin after LHRH L-dopa methyl-dopa, and stress in male rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151, 507-11.
163. Riegle, G. D., Meites, J., Miller, A. E. y Wood, S. M. 1977. Effects of aging on hypothalamic LH-releasing and prolactin inhibiting activities and pituitary responsiveness to LHRH in the male laboratory rat. J. Geront. 32:13-18.
164. Rigaudiere, N., Pelardy G., Robert A. y Delost, P. 1976. Les androgènes plasmatiques et testiculaires au cours du vieillissement chez le cobaye. J. Reprod. Fertil, 48:291.
165. Rollag, M. D., O'Callaghan, P. L., Niswender, G. D. 1978. Serum melatonin concentrations during different stages of the annual reproductive cycles in ewes. Biol. Reprod. 18:279.
166. Romano, M., Pedrera, E. 1980. La glándula intersticial del testículo. Tópicos selectos de la reproducción. 233-253.
167. Rose, M. R. 1991. Evolutionary Biology of Aging. Oxford University Press. Oxford.
168. Roso de Luna, M. 1918. De Sevilla al Yucatán. Madrid. Pueyo.
169. Roth, J. J. y Roth, E. C. 1980. The parietal-pineal complex among paleovertebrates. Evidence for temperature regulation. In: A Cold Look at the Warm Blooded Dinosaurs. D. K. Thomas and E. C. Olson, eds. Am. Assoc. Adv. Sci. Washington, pp 189-231.
170. Rothstein, M. 1981. Posttranslational alterations of proteins. CRC. Handbook of Biochemistry of Aging (J.R. Florini, Ed.), CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida p. 103.
171. Sanborn, B. M., Wagie, J. R., Sterinberg, A. 1984. Maturation and androgen-dependent aspects of Sertoli cell function. Annls. N. Y. Acad. Sci. 438. 586-587.
172. Scaccione, S., Alema, S., Cigliana, G., Navarra, D., Ramocci, M. T., Anglucci. 1991. Pituitary-adrenocortical and pineal activities in the aged rat. Ann. N.Y. Acad. Sci. 621:256-261.
173. Schmidt, T. J., Lippman, M. 1978. Evidence for cytoplasmic melatonin receptor. Nature, 274:894-895.
174. Sharpe, R. M., Fraser, H. M. Cooper, I., Rommerts, F. F. G. 1981. Sertoli-Leydig cell communication via an LH-RH like factor. Nature (London) 290: 785-787.
175. Sharpe, R.M., Fraser, H.M., Cooper, I. 1982. The secretion, measurement and function of a testicular LH-RH like factor. Annls. N. Y. Acad. Sci. 383: 272-292.
176. Sheridan, M. N. y Reiter, R. J. 1968. The fine structure of the hamster pineal gland. Am. J. Anat. 122: 357-375.
177. Sheridan, W.N., Reiter R. J. y Jacobs, J. J. 1969. An interesting anatomical relationship between the hamster pineal gland and the ventricular system of the brain. J. Endocrinol. 45:131-132.
178. Sheridan, M. N., y Reiter; R. J. 1973. The fine structure of the pineal gland in the pocket gopher, *Geomys busarius*. Am. J. Anat. 136: 363-382.

179. Sidney S., 1982. Estadística no paramétrica. Ed. Trillas. Séptima reimpresión. pp 344.
180. Simic, M. G. 1992. The rate of DNA damage and aging. In: Free Radicals and Aging. I. Emerit, B. Chance, eds., Birhaeuser Verlag, Basel, pp 20-30.
181. Simpkins, J. W. Mueller, G. P., Huang, H. y Meites J. 1977. Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats. Possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinology*, 100:1672-1678.
182. Sisk, C. L. y Turek, F. W. 1983. Developmental time course of pubertal and photoperiodic changes in testosterone negative feedback on gonadotropin secretion in the Golden hamster. *Endocrinology*, 112, 1208-1216.
183. Sizonenko, P. C. Lang U., Rivest, W. y Aubert, L. 1985. The pineal and pubertal development. In Photoperiodism. Melatonin and the Pineal. Ciba Foundation Symp. 117:208-225.
184. Smith, C. D., Carney, J. M., Tatsumo, T., Stadtman, E. R., Floyd, R. A., Markesbery, W. R. 1992. Protein oxidation in aging brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663:110-119.
185. Steger, R. W., Peluso, J. J., Bruni, J. F., Hafez, E., Meites, J. 1979. Gonadotropin binding and testicular function in old rats. *Endokrinologie*. 73:1-5.
186. Steger, R. W., Huang, H. H., Hodson, C. A., Leung, F. C. Meites, J., Sacher, G. A. 1980. Effects of advancing aging on hypothalamic-hypophysial-testicular functions in the male white-footed mouse (Peromyscus leucopus). *Biol. Reprod.* 22: 805-809.
187. Steiberger, A., Steinberger, E. 1971. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.* 51:1-22.
188. Steinberger, E., y Ficher, M. 1968. Conversion of progesterone of testosterone by testicular tissue at different stages of maturation. *Steroids*. 11:351189.
189. Stoclet, J. C., Gerard, D., Kilhoffer, M. C., Lugnier, C., Miller, R. y Schaeffer, P. 1987. Calmodulin and its role in intracellular calcium regulation. *Prog. Neurobiol.* 29:321-364.
190. Tamarkin, L., Westrom, W. K., Hamüll, A. I. and Goldman, B. D. 1976. Effect of melatonin on the reproductive system of hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology*: 99, 1534-1541.
191. Tamarkin, L., Lefebvre, N. G., Hollister, C. W., Bruce, D. 1977. Effect of melatonin administered during the night on reproductive function in the Syrian hamster. *Endocrinology*, 101:631.
192. Tamarkin, L., Reppert, S. M. Klein, D. C., Pratt, G. Goldman, B. D. 1980. Studies on the daily pattern of pineal melatonin in the Syrian hamster. *Endocrinology*, 107:1525.
193. Tamarkin, L., Cohen, M. Roselle, D. Reichert, C., Lippman, M. and Chabner, B. 1981. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7:12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumours in the rat. *Cancer Res.* 41: 4432-4436.
194. Tamarkin, L. Curtis, J., B., Almeida, F. X. 1985. Melatonin: A Coordinating Signal for Mammalian Reproduction? *Science*, 227: 714-720.

195. Tan, C. H., Khoo, J. C. M. 1981. Melatonin concentrations in human serum, ventricular and lumbar cerebrospinal fluids as an index of the secretory pathways of the pineal gland. Horm Res. 14:224-233 224.
196. Tan, D-X., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Chen, L-D., Chen, S., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L. R. 1993a. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. Cancer Lett. in press
197. Tan, D-X., Chen, L-D., Poeggeler, B., Manchester, L. C., Reiter, R. J. 1993b. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocrine J., in press.
198. Tang, F., Hadji Constantinou, M., Pang, S. F. 1985. Aging and diurnal rhythms of pineal serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid, norepinephrine, dopamine and serum melatonin in the male rat. Neuroendocrinology, 40: 160-164.
199. Tesco, G., Latorraca, S., Piersanti, P., Piacentini, S., Amaducci, L., Sorbi, S. 1992. Alzheimer skin fibroblast show increased susceptibility to free radicals. Mech. Ageing Dev. 66:117-120.
200. Trentini, G. P. De Gaetani, C., Criscuolo, M. 1991. Pineal gland and aging. Aging 3:103-116.
201. Troiani, M. E. Reiter, R.J., Vaughan, M. K. 1988. The depression in rat pineal melatonin production after saline injection at night may be elicited by corticosteroid. Brain Res. 450:18-24.
202. Tsitouras, P. D., Kowatch, M. A. y Harman, S. M. 1979. Age-Related Alterations of Isolated rat Leydig cell Function: Gonadotropin Receptors Adenosine 3' 5'-Monophosphate Response, and Testosterone Secretion. Endocrinology, 105:1400.
203. Turek, F. W., Desjardins, C. y Menaker, M. 1975. Melatonin: Antigonadal and progonadal effects in male golden hamsters. Science, 190: 280.
204. Vakkuri, O., Rintamäki, H. y Leppaluotto, J. 1985. Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure. 530.
205. Van Horn, R. N., Beamer, N. B. y Dixson, A. F. 1976. Primate breeding season: photoperiodic regulation in captive *Lemur catta*. Biol. Reprod. 15:523.
206. Viani, P. G., Cervato, G., Fiorilli, A., Cestaro, B. 1991. Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrana properties. J. Neurochem. 56:253-258.
207. Vollrath, L. 1981. The pineal organ. Springer. Berlin. 65 pp.
208. Walker, M. L., Gordon, T. P. y Wilson, M. E. 1983. Consequences of first pregnancy in rhesus monkeys. Biol. Rep. 29: 841.
209. Wallace, R. B., Altman, y G. D. Das. 1969. An autoradiographic and morphological investigation of the postnatal development of the pineal body. Am. J. Anat. 126: 175-183.
210. Weaver, D. R., Keohan, T., y Reppert, M. 1987. Definition of a prenatal sensitive period for maternal-fetal communication of day length. Am. J. Physiol. 253 (Endocrinol. Metab. 16):E701-E704.
211. Webley, G. E. Leinbenberger, F. 1986. The circadian pattern of melatonin and its positive relationship with progesterone in women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 63: 323-328.
212. Welsh, M. G., y Reiter, R. J. 1978. The pineal gland of the gerbil, *Meriones unguiculatus*. I. An ultrastructural study. Cell Tissue Res. 193: 323-336.

213. Wikstrom, A. C., Bakke, O., Okret, S., Bronnberg, M., Gustafsson, J. A. 1987. Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization. Endocrinology 120:1232.
214. Wolfe, D. E. 1965. The epiphyseal cell: An electronmicroscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat. Progr. Brain Res. 10:332-386.
215. Wright, L. Beck, C. L., Pérez-Polo, J. R. 1987. Sex differences in nerve growth factor levels in superior cervical ganglia and pineal. Int. J. Dev. Neurosci. 5:383-390.
216. Wurtman, R. J., Axelrod, J. y Phillips, L. S. 1963. Melatonin synthesis in the pineal gland. Control by light. Science, 142:1071-1073.
217. Wurtman, R. J. Axelrod, J. Chu, E. W., Fischer J. E. 1963. Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary. Science 141:277.1.
218. Wurtman, R. J., Axelrod, J. E., Kelly, D. E. 1968. The Pineal, Academic Press, New York. 143: 1329
219. ZG-Nagy, I. 1992. A proposal for reconsideration of the role of oxygen free radicals in cell differentiation and aging. Ann. N. Y. Acad. Sci. 673:142-14