



**FACULTAD MEDICINA**

**Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e  
Inmunología**

**PAPEL DE LA MELATONINA  
EN LOS PROCESOS INFLAMATORIOS  
MEDIADOS POR MASTOCITOS:  
IMPLICACIONES CLÍNICAS.**

Tesis presentada por

**D<sup>a</sup> Helena García Moreno**

para optar al grado de Doctor.

Sevilla, 2018.





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Avda. Sánchez Pizjuán,4.

Dpto. Bioquímica médica y Biología Molecular e Inmunología

41009 Sevilla.

**D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> DOLORES MALDONADO Y AIBAR**, Doctora en Medicina y Cirugía,  
Profesora Titular de Universidad del Área de Inmunología del Departamento de  
Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina  
de Sevilla.

CERTIFICA:

Que D<sup>a</sup> **HELENA GARCÍA MORENO**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo  
mi dirección el trabajo titulado: **PAPEL DE LA MELATONINA EN LOS  
PROCESOS INFLAMATORIOS MEDIADOS POR MASTOCITOS:  
IMPLICACIONES CLÍNICAS**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para  
optar al grado de Doctor.

Sevilla 9 de marzo de 2018,

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> de la Directora de la Tesis

La Doctoranda

D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Dolores Maldonado y Aibar

D<sup>a</sup> Helena García Moreno



*A la memoria de mi Madre,  
María Isabel Moreno Ramírez.*

*A la memoria de mi Tía,  
Ana María Moreno Ramírez.*

*“En mitad del invierno aprendí, por fin, que había en mí un verano invencible”.*

*Albert Camus  
(1913-1960)*

*“Esperando,  
el nudo se deshace y la fruta madura”.*

*Federico García Lorca  
(1898-1936)*

*“Las promesas engañan,  
el tiempo decepciona,  
la muerte vence todos los cuidados,  
las ansias de la vida son nada”.*

*Leonardo Da Vinci  
(1452-1519)*

*“No levantes el velo pintado que los vivos llaman vida,  
aunque formas irreales represente,  
imagen engañosa de aquello que creemos con colores dispersos.  
Detrás acechan miedo y esperanza,  
destinos gemelos que entretujan sus sombras en la sima sombría y encubierta.*

*A un hombre conocí de corazón sensible  
que levantó ese velo buscando algo que amar,  
pero no encontró nada,  
ni tampoco las cosas que contiene este mundo podían agradaarle.*

*Ignorado vivía, era luz en las sombras,  
una mancha brillante en esta escena turbia,  
un alma que luchaba por la verdad y nunca,  
como el predicador, la pudo hallar en nada”.*

*Percy Bysshe Shelly  
(1792-1822)*

## AGRADECIMIENTOS

Fueron una duda y una moneda las que me llevaron a comenzar mi aventura en el mundo de la investigación. Sé que puede parecer extraño, pero así fue. La moneda respondió que me atreviera con la Inmunología. Así que, eso hice. Aunque para ser sincera, la idea que tenía en mente era mucho menor. De hecho, pensaba hacer una pequeña colaboración en el laboratorio, sin más. Sin embargo, poco a poco “mi aventura” fue tomando cuerpo y el resultado se puede leer en esta Tesis. Así que es, precisamente este comienzo, lo que me hace pensar en la manera curiosa en cómo llegan algunas oportunidades y que debemos dar gracias por ellas y por tantas cosas más. Es por ello, que tras el reto que ha sido esta Tesis quiero darle las gracias a las Instituciones y personas que me han apoyado, intelectual o emocionalmente, en su realización.

Al Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología por su apoyo estructural y económico durante este tiempo.

A la Dra. María Dolores Maldonado y Aibar, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección. Gracias por guiarme, enseñarme e inculcarme, durante todos estos años, la importancia de la disciplina y la voluntad tanto en el trabajo de laboratorio como en la escritura de esta Tesis, así como por tus sabios consejos que, junto con tu valiosa ayuda, me han permitido evolucionar tanto bajo tu dirección. Gracias por ser el mejor de los ejemplos a seguir.

A la Dra. Carmen González Yanes por su ayuda a “cascoporro” y por su paciencia infinita, además de por guiarme con su “savoir faire” en mis quehaceres diarios. “Helgarmor hija de Larramor” siempre te estará agradecida.

Al Dr. Juan Ramón Calvo Gutiérrez por su interés en mi evolución durante la realización de esta Tesis.

A la Dra. Carmen Osuna Fernández, por nuestras interesantes charlas camino de su despacho que, junto con su cariño e interés durante este tiempo, la convierten en gran un ejemplo de amabilidad y buen trato.

Al Dr. Antonio Manuel Carmona Fernández (“Ketama”), por su buena disposición y compañerismo.

A los Dres. Enriqueta Tristán Clavijo y Rafael Camacho García por sus interesantes e instructivas conversaciones en el pasillo de los frigoríficos.

A la Dra. Flora Sánchez Jiménez (Flori), por su dedicación al introducirme en el mundo de los Western y por el compañerismo demostrado durante mi estancia en el Departamento.

A Verónica Carranco Galán, por su fuerza y vitalidad sin parangón de las que me he podido contagiar en tantas ocasiones.

A la Dra. Maribel García Sánchez, por nuestras charlas inspiradoras y tan clarificadoras para mí. Por su amabilidad, positividad y simpatía sin límites.

A Miriam Adorna Martínez, por nuestras confidencias y charlas desde cada “flanco” del laboratorio llenas de su risa tan maravillosa.

A los Dres. Víctor Sánchez Margalet, Antonio Pérez Pérez y demás Compañeros del Departamento, por ofrecerme su ayuda y atención siempre que lo he necesitado.

Y no me puedo olvidar de la Secretaría, ese “Reino del papeleo” de la planta superior donde tantas veces me han ayudado y animado en esta andadura por todas las vías posibles. Sólo nos ha faltado la paloma mensajera, ¿verdad?

A Carmen Gómez Ávila por su simpatía, fuerza y dinamismo. Por los cafelitos que hemos compartido y por las ideas que me ha ofrecido y me han allanado tanto el terreno.

A M<sup>a</sup> José Barbero Santos por sus cariñosas explicaciones, que tantas veces han conseguido que la burocracia sea más llevadera. Por ofrecerme sosiego con su trato dulce y alegre.

A Adoración Puente Carretero (Dora), por cada abrazo que me ha dado y porque tengo la suerte de que han sido muchos. Por tu sonrisa, amabilidad y cariño en cada segundo que hemos compartido juntas. Por todos y cada uno de los “momentazos” que hemos compartido en el comedor junto a M<sup>a</sup> José y “La Naranjito”. ¡Es que a Mafalda siempre le quedarán claras las bondades del pollo empanado!

Y, también, quiero agradecer todo el apoyo que me han ofrecido en la Secretaría de la Facultad de Biología, y en concreto:

A Rocío Guerrero Macho por su cordial trato y esmero en su ayuda.

A Ascensión Blasco Cortés (“Chon”) por ser tan extraordinaria y por celebrar cada uno de mis logros como si fuera propio. Por acompañarme desde el momento de mi matriculación en mi primer año y seguir haciéndolo y por aclararme el oscuro camino en infinitas ocasiones.

También quiero acordarme de muchas otras personas que comparten mi caminar:

A Sophia Quarenghi, mi “superprofesora” de violín. Por estar pendiente de mi evolución mientras escribía esta Tesis y ofrecerme su apoyo sincero, además de ser un



ejemplo de calidad en su trabajo y una gran persona.

A Mary Joplin, por comenzar siendo mi profesora de inglés y convertirse en una amiga y confidente. Por las charlas interesantes y los pensamientos geniales que hemos compartido y por conseguir que mi inglés descarriado volviera al redil en tantas ocasiones. Por los cafés y algún que otro desayuno en Valdelagrana o en La Moderna.

A Toñi, por mandarme sus pensamientos positivos y su fuerza para llenarme de coraje en tantas ocasiones y por ser todo un ejemplo de lealtad.

A Rocío por todos y cada uno de sus maravillosos mensajes.

A “Mary Sea” por ser una bióloga con “Tronío”, ser tan generosa durante las asignaturas del máster y regalarme su amistad desde entonces.

A María José Maillo Jiménez “Meryjou” por su alegría y entusiasmo al enterarse de que comenzaba esta andadura y por ofrecerme una amistad llena de tantos recuerdos alegres y maravillosos.

A Mariola Jimena García “mi pequeña Lola”, por acompañarme durante tantos años ya y por todos los recuerdos maravillosos que compartimos. Por escucharme y apoyarme con paciencia infinita. Por cada mensaje, cada pregunta sobre los párrafos, la burocracia y tanto apoyo infatigable que han hecho el proceso mucho más llevadero. Por una extraordinaria amistad que supera la distancia, el paso del tiempo, los malos momentos y que espera en la retaguardia para ayudar sin reservas. Gracias de todo corazón.

A María del Carmen Naranjo Gutiérrez, “Mi Naranjito”. Gracias por compartir conmigo tu maravillosa visión del mundo, porque por ella te envidio y admiro a partes iguales. Gracias por ayudarme a seguir cuando las cosas no tenían sentido, por todas las llamadas y momentos compartidos que han entretejido y entretejen una amistad que es un privilegio, por tanta comprensión, paciencia, bonitos detalles y por ser un ejemplo a seguir en cada uno de tus pasos. Gracias por todo. ¡Ah! Aprovecho y te aviso que seguiré molestándote...y sí, sé lo que estás pensando tras leer esta frase.

A José Amate García “Bigote” por su incansable apoyo en los momentos duros y por su amistad inquebrantable.

A mi tía Charo y mi tío Emilio, por soportar mi parloteo interminable sobre cada pequeño detalle durante el proceso de escritura. Gracias por vuestro interés infatigable y por acompañarme en mi caminar desde antes de que naciera.

A mis tías Pepa y Lola por habernos ayudado tantas veces con tanta amabilidad

inquebrantable y cariño.

A mi tío Ignacio, mi tía Mercedes y mis primas Verónica y Natalia. Por su abnegada ayuda, cariño y apoyo en los buenos y no tan buenos momentos vividos.

Y desde lo más profundo de mi corazón a mis padres, Manuel e Isabel y a mi tía Ani, mi familia. La palabra gracias con vosotros se queda demasiado corta porque sois mi gran suerte y mi mayor orgullo. Gracias por ser tan luchadores y por vuestro apoyo, comprensión, ejemplo y amor a manos llenas. Por haber plagado mi vida de momentos únicos, además de enseñarme el verdadero significado de las palabras familia, cariño, respeto, incondicionalidad y tantas otras. Gracias a ti, mamá, y a ti, tía Ani por seguir acompañándonos en nuestro caminar porque seguís presentes en cada uno de los latidos de nuestros corazones. A vosotras os dedico esta frase:

“Todas las almas son inmortales, pero las almas de los rectos son inmortales y divinas” Sócrates (470-399 a.C.).

Gracias a tod@s por todo.

## **ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>10</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>13</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17-51</b>
1.1-MASTOCITO	
1.1.1-Introducción histórica .....	17
1.1.2-Características, ubicación, mediadores .....	17
1.1.3-Receptores del mastocito .....	26
1.1.4-Vías de activación del mastocito .....	27
1.1.5-Mastocito e inflamación .....	31
1.2-MELATONINA Y SISTEMA INMUNE .....	34-43
1.2.1-Estructura génica y proteica .....	34
1.2.2-Síntesis y liberación .....	36
1.2.3-Mecanismos de acción de la melatonina .....	38
1.2.4-Interacciones de la melatonina con otros sistemas .....	39
1.2.5-Papel de la melatonina sobre las células del Sistema Inmune .....	40
1.2.5.1—Mecanismos de actuación vía receptor dependiente .....	40
1.2.5.2—Mecanismos de actuación vía receptor independiente .....	43
1.3-RELACIÓN MELATONIA Y MASTOCITOS .....	47-51
1.3.1-Receptores MT1, MT2, MT3 en los mastocitos .....	47
1.3.2-Receptores nucleares ROR/RZR .....	51
1.3.3-Enzimas en el mastocito .....	51
<b>2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>54</b>
<b>3-MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>56-77</b>
3.1-EXPERIMENTOS PILOTO PREVIOS A LA TESIS .....	56
3.2-MATERIAL BIOLÓGICO .....	56
3.2.1-Línea celular .....	56
3.2.2-Procesamiento de la línea celular .....	56
3.2.2.1-Procedimiento de subcultivo .....	56

3.2.2.2- Procedimiento de congelación .....	57
3.2.2.3- Procedimiento de descongelación .....	57
3.3- REACTIVOS QUÍMICOS USADOS .....	58
3.3.1- Medio de cultivo .....	58
3.3.2- Estimulación química .....	58
3.3.3- Preparación de soluciones .....	58
3.3.4- Citoprotección.....	58
3.3.5- Viabilidad celular .....	58
3.3.6- Inhibición receptores de la melatonina .....	58
3.3.7- Soluciones y tampones .....	58
3.3.8- Geles .....	60
3.3.9- Western Blotting .....	60
3.3.10- Medición de citoquinas en el sobrenadante .....	60
3.3.11- Medición de la MELn producida en sobrenadante .....	60
3.4- MATERIAL Y APARATOS EMPLEADOS .....	60
3.4.1- Material usado .....	60
3.4.2- Aparatos empleados .....	61
3.5- CULTIVOS CELULARES .....	62
3.6- PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE MELATONINA Y LUZINDOL .....	62
3.7- DISEÑO EXPERIMENTAL .....	62
3.7.1- Activación de los mastocitos .....	62
3.8- ANÁLISIS DE LA CITOPROTECCIÓN MEDIADA POR LA MELATONINA .....	63
3.9- EFECTO DEL LUZINDOL (LZD) SOBRE LA CITOPROTECCIÓN EJERCIDA POR LA MELATONINA EXÓGENA (MELx) .....	65
3.10- ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR USANDO EL ENSAYO MTT .....	67
3.10.1- Protocolo para estudiar la viabilidad según el tiempo de exposición a PMACI ...	67
3.10.2- Protocolo para estudiar la viabilidad según el pre-tratamiento con MELx-LZD y estimulación con PMACI .....	67
3.11- MEDICIÓN DE CITOQUINAS EN EL SOBRENADANTE DEL MEDIO DE CULTIVOS. ENZIMOINMUNOANÁLISIS (ELISA) .....	68
3.12- MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MELATONINA ENDÓGENA (MELn) EN EL SOBRENADANTE DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO. ENZIMOINMUNOANÁLISIS COMPETITIVO (ELISA) .....	69

3.12.1-Protocolo .....	70
3.12.2-Procedimiento del ensayo .....	71
3.13-ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LA MIOSINA E IKK $\alpha/\beta$ .....	73
3.13.1-Tratamiento de las muestras para la obtención de las proteínas .....	73
3.13.2-Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS .....	73
3.13.3-Transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa .....	74
3.13.4-Detección de las proteínas .....	75
3.13.5-Medida de la concentración proteica .....	76
3.14-MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	77
<b>4-RESULTADOS .....</b>	<b>79-89</b>
4.1-Inducción de citotoxicidad con PMACI .....	79
4.2-Citoprotección ejercida por el pretratamiento con la melatonina a dosis fisiológicas y farmacológicas .....	80
4.3-Efecto del luzindol sobre la citoprotección ejercida por la melatonina durante 2 horas de estimulación .....	81
4.4-Efecto del luzindol sobre la citoprotección ejercida por la melatonina durante 12 horas de estimulación .....	82
4.5-Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) en la liberación de citoquinas y de la melatonina endógena (MELn) en cultivos de RBL-2H3 sin estimulación química .....	83
4.6-Estudio de la liberación de citoquinas proinflamatorias en cultivos de RBL-2H3 que son estimulados con PMACI .....	84
4.7-Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y melatonina endógena (MELn) en cultivos celulares de RBL-2H3 con estimulación química (PMACI) .....	85
4.8-Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) sobre la síntesis y liberación de la melatonina endógena (MELn) en cultivos de RBL-2H3 en respuesta a PMACI .....	86
4.9-Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) sobre los mecanismos intracelulares responsables de la citoprotección .....	87
<b>5.-DISCUSIÓN .....</b>	<b>91-97</b>
5.1-IMPLICACIONES CLÍNICAS .....	96
<b>6.-CONCLUSIONES .....</b>	<b>99-100</b>
<b>7.-BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>102-128</b>
<b>8-ANEXOS .....</b>	<b>130-132</b>
8.1-Comunicaciones a congresos .....	130

8.2-Artículos .....	131
<b>9.-NOTAS .....</b>	<b>134-136</b>

## **ABREVIATURAS:**

- 5-HIAA** – 5-hidroxiindol ácido acético  
**5-HIAL** – 5-hidroxiindol-acetaldehido  
**5-HL** – 5-hidroxitriptofol  
**5-MIAA** – 5-metoxiindol ácido acético  
**5-ML** – 5-metoxitriptofol  
**5-MT** – 5-metoxitriptamina  
**125-Mel** – 2-[<sup>125</sup>I]- iodomelatonina  
**AA-NAT** – Arilalquilamina-N-acetiltransferasa  
**AAAH** – Hidrolasas de aminoácidos aromáticos  
**ACTH** – Adenocorticotropa  
**ADAMTS5** – Desintegrina y metaloproteasa con motivos de transpondina 5  
**AKT** – Proteína quinasa B  
**AMFK** – N-acetil-N-formil-5-metoxikinuramina  
**AMK** – N-formil-5-metoxikinuramina  
**AP-1** – Proteína activadora 1  
**bFGF** – Factor de crecimiento fibroblástico básico  
**C** – Control (sin estimulación)  
**CI** – Calcio ionóforo A23187  
**C\*** – Células estimuladas con PMACI  
**CCL2** – Ligando de quimioquinas 2  
**CD 63** – Complejo de diferenciación 63  
**CFU-GM** – Unidades formadoras de colonias granulocíticas y monocitoides  
**CK** – Creatinina quinasa  
**COX (1 y 2)** – Ciclooxygenasa  
**CPA-3** – Carboxipeptidasa A3  
**CRE** – Elemento de respuesta a AMPc  
**CRF** – Factor liberador de corticotropina  
**DAG** – Diacilglicerol  
**DD** – Dominio de muerte  
**Dominio TIR** – Receptor de tipo Toll  
**EC** – Celulas enterocromoafines e inmunopositivas  
**EL1-3** – Lazos extracelulares  
**FCεRI** – Receptores de alta afinidad para la IgE  
**GIRK** – Canales de potasio rectificadas internamente asociados a la proteína G  
**GP130** – Glicoproteína 130  
**GPCRs** – Superfamilia de receptores acoplados a proteínas G  
**HIOMT** – Hidroxiindol-O-metiltransferasa  
**IFN-γ** – Interferón γ  
**IL-** – Interleuquinas  
**IL1-3** – Lazos intracelulares  
**iNOS** – Óxido nítrico sintasa inducible

**IP3** – Inositol 1,4,5- trifosfato  
**IRAK** – Quinasas asociadas al receptor de IL-1  
**IRF-3** – Factor regulador del interferón 3  
**ITAM** – Motivo de activación del inmunoreceptor vía tirosina  
**LAT 1, LAT2** – Estabilizador de células T activadas  
**LCE- II** – Cadena ligera 3 de la proteína II asociada al microtúbulo  
**LL37** – Catelicidina  
**LPO** – Lactoperoxidasa  
**LPS** – Lipopolisacárido  
**LRR** – Secuencia rica en leucina  
**LTB<sub>4</sub>** – Leucotrieno B4  
**Lyn** – Tirosin Kinasa Lyn  
**LZD** – Luzindol  
**LZD+C\*** – Células preincubadas con LZD y estimuladas con PMACI  
**MAO** – Amino oxígeno reductasa  
**MAPK** – Proteína quinasa activada por mitógeno  
**MEK** – MAP quinasa quinasa  
**MEL<sub>n</sub>** – Melatonina endógena  
**MEL<sub>x</sub>** – Melatonina exógena  
**MEL<sub>x</sub> 100nM+C\***– Células pretratadas con MEL<sub>x</sub> 100nM (dosis fisiológica) y estimuladas con PMACI  
**MEL<sub>x</sub> 1mM+C\***– Células pretratadas con MEL<sub>x</sub> (dosis farmacológica) y estimuladas con PMACI  
**MEL<sub>x</sub> 100nM+LZD+C\***– Células pretratadas con MEL<sub>x</sub> 100nM y preincubadas con LZD 30'; lavadas y estimuladas con PMACI  
**MEL<sub>x</sub> 1mM+LZD+C\***– Células pretratadas con MEL<sub>x</sub> 1mM y preincubadas con LZD 30'; lavadas y estimuladas con PMACI  
**MHC** – Complejo mayor de histocompatibilidad (I y II)  
**MMP9** – Matriz metalopeptidasa 9  
**MyD88** – Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88  
**NAS** – N-acetilserotonina  
**NAT** – N-acetiltransferasa  
**NF-κβ** – Factor de transcripción nuclear κβ  
**NK** – Natural Killers  
**NO** – Óxido nítrico  
**NTAL** – Ligando para la activación de miembros de la familia de células T  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – Anión superóxido  
**P300 HAT** – Histona acetiltransferasa p300  
**PAF** – Factor activador de plaquetas  
**PAMPs** – Patrones moleculares asociados a patógenos  
**PGE<sub>2</sub>** – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
**PI3K** – Fosfoinositol 3-quinasa  
**PIP2** – Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato  
**PIRE** – Elemento regulador pineal



**PKA** – Proteína quinasa dependiente de AMPc  
**PKC** – Proteína quinasa C dependiente de calcio  
**PLC** – Fosfolipasa C  
**PMA** – forbol-12-miristato-13-acetato  
**PMACI** – forbol-12-miristato-13-acetato más calcio ionóforo  
**PT** – *Pars Tuberculosis*  
**QR<sub>2</sub>** – Quinona reductasa  
**RBL-2H3** – Línea celular de leucemia basofílica de ratas  
**RE** – Retículo endoplásmico  
**SAGE** – Análisis en serie de la expresión génica  
**SCAMP** – Proteína de membrana secretora asociada a transportador  
**SNC** – Sistema nervioso central  
**Syk** – Tirosin Kinasa Syk  
**TAK1** – Factor de crecimiento transformante  $\beta$  activado por la Kinasa 1  
**TGF $\beta$**  – Receptores del factor de crecimiento transformante  $\beta$   
**THP (1 y 2)** – Triptófano hidroxilasa  
**THP-1** – Línea celular de monocitos mieloides humanos  
**TLRs** – Receptores Toll-like (2,3,4,6,8)  
**TM I-VII** – Hélices transmembrana  
**TNF- $\alpha$**  – Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**TRAM** – Molécula adaptadora de TRIF  
**TRIF** – Adaptador para la activación de los receptores tipo Toll  
**T-SNARES** – Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF en la diana  
**VAMP (2,3,7,8)** – Proteínas de membrana asociada a vesículas  
**VEGFA** – Factor de crecimiento endotelial vascular A  
**VEGF** – Factor de crecimiento endotelial vascular  
**VIP** – Péptido intestinal vasoactivo  
**V-SNARES** – Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF en vesículas  
**Zeb2** – Proteína con dedos de zinc de la caja E vinculantes con la caja homeótica

## **LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS:**

### **Introducción:**

Fig.1: Origen de los mastocitos.

Fig.2: Representación de un mastocito tipo con algunas de sus características moleculares más importantes.

Fig.3: Estructura de la IL-6.

Fig.4: Estructura del TNF- $\alpha$ .

Fig.5: Estructura de los receptores de alta afinidad Fc $\epsilon$ RI.

Fig.6: Estructura de los receptores Toll-Like.

Fig. 7: Representación de los principales eventos del proceso de desgranulación del mastocito.

Fig.8: Ruta de señalización típica de un receptor TLR, en este caso, TLR4.

Fig.9: Representación esquemática de la fase aguda de la inflamación.

Fig.10: Representación esquemática de la fase tardía de la inflamación.

Fig.11: Estructura química de la melatonina.

Fig.12: Esquema de la síntesis de la melatonina en pinealocitos.

Fig.13: Esquema de la estructura de los receptores de la melatonina MT1 y MT2.

Fig.14: Representación esquemática de la vía de señalización de la melatonina mediado por sus receptores MT1.

Fig.15: Representación esquemática de la vía de señalización de la melatonina mediado por sus receptores MT2.

### **Material y métodos:**

Fig.1: Esquema del diseño experimental para estudiar la activación de los mastocitos RBL-2H3.

Fig.2: Diseño experimental para estudiar la citoprotección mediada por la melatonina.

Fig.3: Diseño experimental para estudiar el efecto del LZD sobre la citoprotección ejercida por la MELx en células estimuladas.

Fig.4: Representación esquemática para la medición de citoquinas en el sobrenadante del medio de cultivos enzimoinmunoanálisis (ELISA).

Fig.5: Representación esquemática de la técnica de ELISA para la determinación de la melatonina.

Fig.6: Representación esquemática del sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS usado.

Fig.7: Representación esquemática del sistema usado para la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.

Fig.8: Representación esquemática del sistema usado para la detección y revelado de las proteínas presentes en la membrana de nitrocelulosa. 7

Tabla I: Kit comercial de radioinmunoensayo (IBL).

## **Resultados:**

Fig.1: Análisis de la cinética de tiempo para la citotoxicidad mediada por PMACI.

Fig.2: Cambios morfológicos de los mastocitos RBL-2H3 tras su exposición durante 14h. con PMACI.

Fig.3: Citoprotección ejercida por la melatonina a dosis fisiológicas y farmacológicas en células expuestas a PMACI durante 2 horas.

Fig.4: Citoprotección ejercida por la melatonina a dosis fisiológicas y farmacológicas en células expuestas a PMACI durante 12 horas.

Fig.5: Efecto del luzindol sobre la citoprotección ejercida por la melatonina durante 2 horas.

Fig.6: Efecto del luzindol sobre la citoprotección ejercida por la melatonina durante 12 horas.

Fig.7: Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) en la liberación de citoquinas y la melatonina endógena (MELn) en cultivos de RBL-2H3 sin estimulación química.

Fig.8: Niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el sobrenadante de los cultivos celulares de RBL-2H3.

Fig.9: Efecto inhibitorio de la MELx sobre la síntesis y liberación de la MELn, inducida por el estímulo con PMACI, fue bloqueada al usar luzindol.

Fig.10: Resultados de la técnica de Western Blot al estudiar el efecto de la MELx, sobre la Miosina IIa, de los mastocitos estimulados con PMACI, durante 2h.

Figura.11: Resultado de la técnica de Western Blot al estudiar el efecto inhibitorio de la MELx sobre la fosforilación de los factores IKK $\alpha/\beta$  inducida por PMACI en cultivos de mastocitos durante 2h.

Tabla I: Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y la MELn en cultivos celulares de RBL-2H3 con estimulación química (PMACI).

## **RESUMEN**

### **INTRODUCCIÓN:**

Los mastocitos son una población de células heterogéneas, localizadas en los tejidos conectivos del organismo, que desarrollan respuestas alérgicas y antiparasitarias mediadas por la IgE. Estas células generan reacciones urgentes donde la inflamación es, en sí, un mecanismo protector frente a la amenaza detectada, cuyo objetivo es restaurar la homeostasis en el tejido dañado eliminando o aislando el agente causante que la puso en marcha. Para ello, y tras apenas unos treinta minutos desde que se detectó el estímulo comienza su etapa aguda, durante la cual los mastocitos vierten al tejido las moléculas preformadas y almacenadas en sus gránulos, produciéndose en consecuencia cambios morfológicos y fisiológicos característicos de los procesos inflamatorios. Todo ello, se traduce en la aparición de sus signos característicos calor, rubor, dolor y tumor. Posteriormente, y si sigue actuando el instigador, se desarrolla la fase tardía (dos horas tras el estímulo) donde se sintetizan y liberan leucotrienos y prostaglandinas, así como citoquinas entre las que se encuentran: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-13. Dicho mecanismo es de gran importancia para el organismo, y es por ello que los tejidos, para asegurar su activación, establecen estrategias redundantes. Sin embargo, cuando la amenaza es eliminada resolver los diferentes frentes establecidos que activaron la inflamación puede convertirse en una empresa complicada. Es por ello, que la investigación en este campo se enfoca, al menos en parte, en la búsqueda o desarrollo de fármacos que permitan su resolución con éxito evitando su cronificación.

Siguiendo esta línea, uno de los fármacos estudiados es la melatonina, la cual es una indolamina que presenta gran variedad de propiedades. Así, cabe destacar que durante el proceso inflamatorio desarrolla un papel dual por el cual funciona como una citoquina pro-inflamatoria más, y posteriormente, cuando ya no es necesario ayuda a la restitución de la homeostasis gracias a sus muchas capacidades como son la antioxidante, citoprotectora, inmunomoduladora y anti-inflamatoria. Concretamente, a través de ellas consigue reducir los radicales libres procedentes del metabolismo del oxígeno y del nitrógeno, mejorar la viabilidad celular, estimular o reducir la respuesta inmune e inhibir la activación del factor NF- $\kappa$ B.

### **OBJETIVOS:**

En nuestro estudio se establecieron dos objetivos principales: analizar el efecto del tratamiento exógeno de la melatonina, una molécula inmunomoduladora, sobre la línea de mastocitos RBL-2H3, modelo de inflamación *in vitro*, e identificar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a estos efectos y, también, trasladar nuestros descubrimientos básicos a la clínica.

## **HIPÓTESIS:**

En función de nuestros objetivos establecimos las hipótesis en las que trabajamos. A través de ellas, queríamos conocer si la administración exógena de la melatonina:

- Mejora la viabilidad celular y la regeneración del mastocito tras el estímulo químico.
- Si inhibe la activación del mastocito reduciendo la síntesis y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6).
- Si interviene en la síntesis y liberación de la melatonina endógena por parte del mastocito.

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se usaron cultivos de mastocitos RBL-2H3 que crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C, los cuales fueron sometidos a diferentes tiempos de estimulación química mediante forbol-12-miristato-13-acetato más calcio ionóforo (PMACI) para conocer su inducción de citotoxicidad o su efecto sobre la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias. Posteriormente, se realizaron pre-tratamientos con melatonina (durante 30 minutos) a concentraciones fisiológicas y farmacológicas para estudiar su capacidad citoprotectora y su efecto sobre la liberación de citoquinas y los niveles de melatonina endógena. Por otro lado, se estudió el efecto del antagonista selectivo luzindol sobre sus capacidades citoprotectoras. A su vez, estudiamos el efecto de la melatonina sobre la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias y la propia melatonina endógena y sobre los mecanismos intracelulares responsables de la citoprotección.

Para ello, se usó el ensayo MTT para estudiar la viabilidad celular, así como la técnica de enzimoanálisis (ELISA) para la medición de citoquinas en el sobrenadante del medio de cultivo. Para el estudio de la expresión proteica de la miosina IIa e IKK $\alpha/\beta$  se usó la técnica de western blotting, un sistema de transferencia semiseca y un sistema de detección de proteínas mediante quimioluminiscencia.

## **RESULTADOS:**

El ensayo MTT nos permitió determinar que la citotoxicidad generada sobre los cultivos mastocitarios con el estímulo químico (PMACI) era tanto dosis como tiempo dependiente. Así, y de manera estadísticamente significativa, a mayor tiempo de exposición al PMACI, mayores eran los daños celulares detectados; los cuales fueron extremos ante periodos iguales o mayores a 14 horas. Detectamos, también, que dicha estimulación con PMACI produce un aumento en la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6, así como de la melatonina endógena, los cuales disminuyeron si fueron precedidos del pre-tratamiento con melatonina.

Se observó que el pretratamiento con melatonina (30 minutos) mejoró la viabilidad celular de modo estadísticamente significativo, siendo mayor su capacidad a concentraciones farmacológicas; mientras que las concentraciones fisiológicas muestran esta capacidad citoprotectora tras 12 horas de experimentación. Aunque cabe destacar que en presencia del antagonista selectivo para los receptores MT1 y MT2 llamado luzindol, su capacidad citoprotectora disminuye, aunque no del todo.

Por último, se detectó que el pretratamiento con melatonina disminuye la activación del complejo IKK $\alpha$ / $\beta$  lo que le permite desarrollar su papel anti-inflamatorio.

### **CONCLUSIONES:**

La estimulación química mediante PMACI activa a los mastocitos de manera tiempo y dosis dependiente.

El pretratamiento con melatonina, sobre todo a concentraciones farmacológicas, ejerce protección celular cuando los mastocitos fueron estimulados con PMACI.

La estimulación química mediante PMACI introduce al mastocito en un estado de hiperestimulación con un aumento de los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 y de melatonina endógena; cuando se realizó el pretratamiento con melatonina disminuyó la síntesis y liberación de las mismas. Esta capacidad se revierte en presencia de luzindol.

La melatonina exógena en ausencia de estimulación química no afecta los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 o de melatonina endógena (MELn).

El pretratamiento con melatonina, tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas, en mastocitos estimulados, inhibe la activación de la ruta de activación mastocitaria IKK/NF- $\kappa$ B de forma estadísticamente significativa.

## **SUMMARY**

### **INTRODUCTION:**

Mast cells are a population of heterogeneous cells, located in the connective tissues of the body, which develop allergic and antiparasitic responses mediated by IgE. These cells generate urgent reactions where inflammation is, in itself, a protective mechanism against the detected threat, whose objective is to restore homeostasis in damaged tissue by eliminating or isolating the causative agent that started it. For this, and after only about thirty minutes since the stimulus was detected, its acute stage begins, during which the mast cells discharge the preformed molecules stored in their granules into the tissue, resulting in morphological and physiological changes characteristic of the inflammatory processes.

All this is translated in the appearance of its characteristic signs heat, flush, pain and tumor. Subsequently, and if the instigator continues to act, the late phase develops (two hours after the stimulus) where they are synthesized and released leukotrienes and prostaglandins, as well as cytokines among which are: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-13. This mechanism is of great importance for the organism, and that is why the tissues, to ensure their activation, establish redundant strategies. However, when the threat is eliminated resolving the different established fronts that activated the inflammation can become a complicated enterprise. That is why research in this field focuses, at least in part, on the search or development of drugs that allow its resolution successfully avoiding its chronification.

Following this line, one of the drugs studied is melatonin, which is an indolamine that has a great variety of properties. Thus, it should be noted that during the inflammatory process develops a dual role by which it functions as a pro-inflammatory cytokine more, and later, when it is no longer necessary to help the restitution of homeostasis thanks to its many capabilities such as antioxidant, cytoprotective, immunomodulatory and anti-inflammatory. Specifically, through them it manages to reduce free radicals from the metabolism of oxygen and nitrogen, improve cell viability, stimulate or reduce the immune response and inhibit the activation of factor NF- $\kappa$ B.

### **OBJECTIVES:**

In our study, two main objectives were established: to analyze the effect of the exogenous treatment of melatonin, an immunomodulatory molecule, on the RBL-2H3 mast cell line, in vitro inflammation model, and to identify the cellular and molecular mechanisms underlying these effects and, also, to transfer our basic discoveries to the clinic.

## **HYPOTHESIS:**

Based on our objectives, we established the hypotheses in which we work. Through them, we wanted to know if the exogenous administration of melatonin:

- If it improves cellular viability and regeneration of the mast cell after the chemical stimulus.
- If it inhibits mast cell activation by reducing the synthesis and release of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6).
- If it is involved in the synthesis and release of endogenous melatonin by the mast cell.

## **MATERIAL AND METHODS:**

Cultures of RBL-2H3 mast cells that grew in medium with decomplemented fetal bovine serum, 5% CO<sub>2</sub> and 37°C were used, which were subjected to different times of chemical stimulation by phorbol-12-myristate-13-acetate plus calcium ionophore(PMACI) to know its induction of cytotoxicity or its effect on the release of pro-inflammatory cytokines. Subsequently, pre-treatments with melatonin (for 30 minutes) were carried out at physiological and pharmacological concentrations to study its cytoprotective capacity and its effect on the release of cytokines and endogenous melatonin levels. On the other hand, the effect of the selective antagonist luzindol on its cytoprotective capacities was studied. In turn, we studied the effect of melatonin on the release of pro-inflammatory cytokines and endogenous melatonin itself and on the intracellular mechanisms responsible for cytoprotection.

To do this, the MTT assay was used to study cell viability, as well as the enzyme immunoassay (ELISA) technique for the measurement of cytokines in the supernatant of the culture medium. For the study of the protein expression of myosin IIa and IKK $\alpha/\beta$ , the western blotting technique, a semi-dry transfer system and a chemiluminescence protein detection system were used.

## **RESULTS:**

The MTT test allowed us to determine that the cytotoxicity generated on mast cell cultures with the chemical stimulus (PMACI) was both dose and time dependent. Thus, and in a statistically significant way, the longer the exposure to the PMACI, the greater the cellular damage detected; which were extreme before periods equal or greater than 14 hours. We also detected that this stimulation with PMACI produces an increase in the release of the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6, as well as endogenous melatonin, which decreased if they were preceded by pre-treatment with melatonin.

It was observed that pretreatment with melatonin (30 minutes) improved the cell viability in a statistically significant way, being greater its capacity at pharmacological



concentrations; while physiological concentrations show this cytoprotective capacity after 12 hours of experimentation. Although it should be noted that in the presence of the selective antagonist for the MT1 and MT2 receptors called luzindol, its cytoprotective capacity decreases, although not completely.

Finally, it was detected that pretreatment with melatonin decreases the activation of the IKK $\alpha$  /  $\beta$  complex, which allows it to develop its anti-inflammatory role.

## **CONCLUSIONS:**

The chemical stimulation by PMACI activates the mast cells in a time and dose dependent manner.

Pretreatment with melatonin, especially at pharmacological concentrations, exerts cellular protection when the mast cells were stimulated with PMACI.

Chemical stimulation by PMACI introduces the mast cell in a state of hyperstimulation with an increase in the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and endogenous melatonin; when the pretreatment with melatonin was carried out, the synthesis and release of them decreased. This capacity is reversed in the presence of luzindol.

Exogenous melatonin in the absence of chemical stimulation does not affect the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 or endogenous melatonin (MELn).

The pretreatment with melatonin, both at physiological and pharmacological concentrations, in stimulated mast cells, inhibits the activation of the mastocyte activation pathway IKK / NF- $\kappa$  $\beta$  in a statistically significant manner.

# ***INTRODUCCIÓN***

## INTRODUCCIÓN:

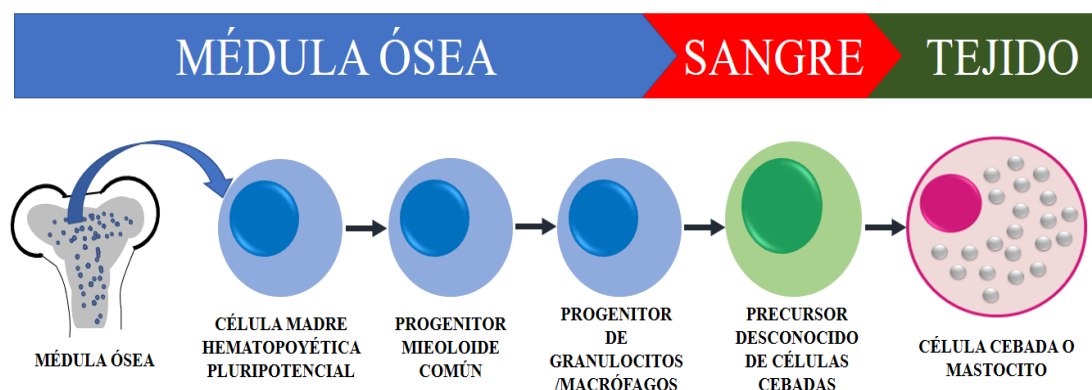
### 1.1-MASTOCITO:

#### 1.1.1-Introducción histórica.

Paul Ehrlich (1854-1915) fue un médico alemán que, como investigador, realizó importantes contribuciones a campos tan dispares como la hematología, farmacología, quimioterapia e inmunología [Lapage, 1952, Drews, 2004] Una de ellas fue, en 1878, la descripción, por primera vez, de los mastocitos en su tesis doctoral, nombrándolos como «células cebadas» [Crivellato et al., 2003]. Con ello pretendía remarcar la gran cantidad de gránulos presentes en su citoplasma [Wernersson and Pejler, 2014]. De igual manera, también los nombró, de forma más descriptiva como «células granulares del tejido conectivo» haciendo una vez más hincapié en su característica más notable.

#### 1.1.2-Características, ubicación, mediadores.

Los mastocitos o células cebadas son células del sistema inmune que desarrollan papeles relevantes tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. Se originan a partir de células madres pluripotenciales del interior de la médula ósea (Figura 1), las cuales se diferencian en un precursor mieloide común en estado indiferenciado que accederá al torrente sanguíneo como precursor inmaduro (c-Kit, CD34+, CD13+, FcεRI). Esta condición le permitirá alcanzar los tejidos conectivos donde se asentará para, por último, madurar como mastocito y llevar a cabo sus funciones tales como, la inflamación o las interacciones huésped-patógeno [Janeway 7º E.].



**Figura 1. Origen de los mastocitos.** Se originan a partir de precursores de la médula ósea. En concreto, tienen su origen en una célula madre pluripotencial diferenciada en un precursor mieloide común que accede al torrente sanguíneo en estado poco definido e inmaduro. De ahí, alcanza los tejidos conectivos donde se asienta y diferencia para realizar sus funciones (defensa inflamatoria y reacciones de interacción huésped-patógeno).

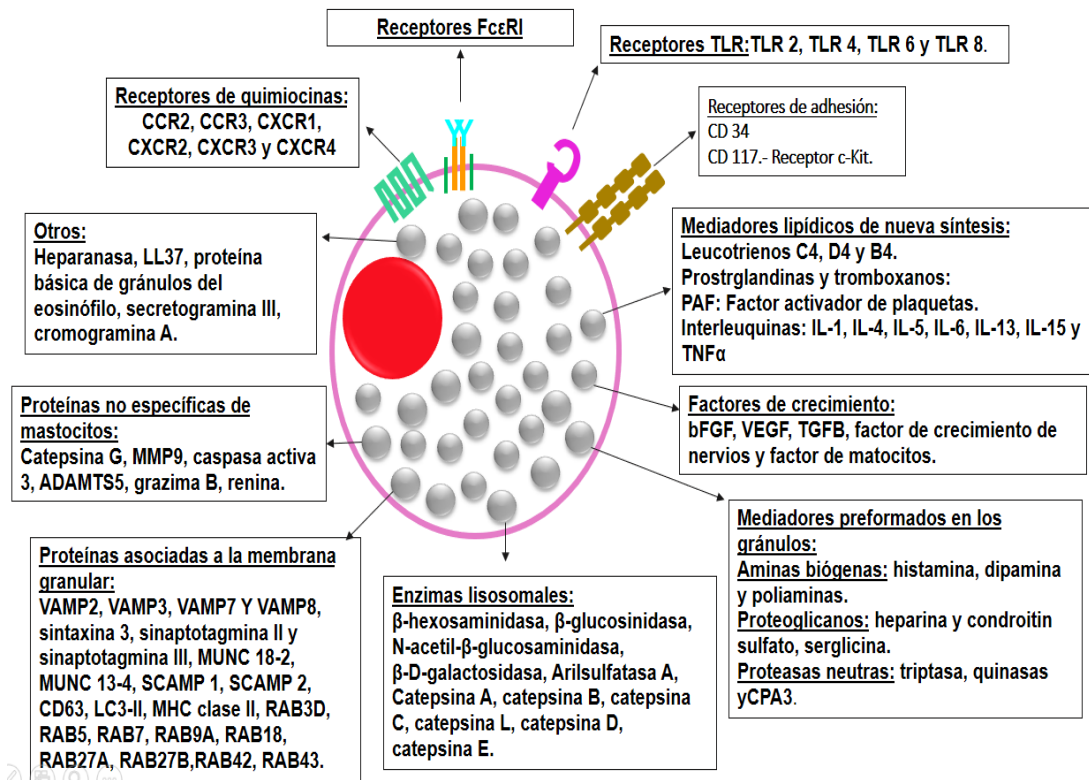
Los mastocitos constituyen una población celular muy heterogénea. Esto se debe a que estas células completan su diferenciación una vez alcanzan el tejido que va a ser su destino final. Por tanto, es en estas localizaciones a lo largo del organismo donde los diferentes factores de crecimiento secretados por cada tejido determinan que el mastocito complete su proceso de desarrollo. En consecuencia, sus características definitivas varían en función del tejido donde hayan completado su maduración. Así mismo, el contenido de sus gránulos será diferente en función del tejido en el que se asienten (Rich et al. 4ª edición).

Los mastocitos poseen una función protectora importante en las reacciones defensivas contra parásitos como, por ejemplo: los helmintos y contra bacterias como, por ejemplo: *Escherichia coli*. Son células de carácter inflamatorio que intervienen en la puesta en marcha de reacciones inflamatorias urgentes o inmediatas, así como en la remodelación de tejidos y defensa del huésped [Gordon et al., 1990]. Su distribución tisular es generalizada en los tejidos conectivos y los encontramos fundamentalmente en la interfaz dispuesta entre el huésped y el medio ambiente; es decir, en los lugares de potencial contacto con patógenos como son la piel y las mucosas donde suponen el 2-3% de la población leucocitaria [da Silva et al., 2014, Galli and Tsai, 2010, Jamur et al., 2005, Metcalfe and Boyce, 2006]. A su vez, conviene subrayar que su localización muy próxima a los vasos sanguíneos les facilita orquestar reacciones inflamatorias inmediatas [Maldonado et al., 2016].

A pesar de que durante un tiempo se creyó que mastocitos y basófilos eran el mismo tipo de células (la primera en tejidos y la segunda en la sangre), en la actualidad se sabe que son dos estirpes celulares diferentes que llevan a cabo funciones muy similares como, por ejemplo, la liberación de mediadores inflamatorios (en tejidos o en sangre, respectivamente).

Del mismo modo, destacamos otras características de los mastocitos (Figura 2):

- Son células esféricas, con núcleo excéntrico y citoplasma repleto de gránulos [Krystel-Whittemore et al., 2016].
- Dichos gránulos son metacromáticos y almacenan sustancias vasoactivas pre-formadas [da Silva et al., 2014].
- Poseen un aparato de Golgi y retículo endoplásmico muy reducidos, lo que no les impide llevar a cabo la modificación y distribución de una amplia variedad de macromoléculas por su citoplasma o el exterior celular en el caso del aparato de Golgi; así como la síntesis de lípidos, glicosilación de proteínas o ser reservorio de calcio intracelular por parte del retículo endoplásmico.
- Poseen numerosos receptores, destacando de entre ellos los receptores TLR y los receptores de alta afinidad FcεRI que les permite unirse a monómeros de IgE [Janeway 7º Ed.].



**Figura 2.- Representación de un mastocito tipo con algunas de sus características moleculares más importantes.** En ella, aparecen detallados algunos de sus receptores de membrana, los mediadores preformados presentes en sus gránulos, así como, los mediadores lipídicos de nueva síntesis, sus enzimas lisosomales, sus proteínas asociadas a las membranas celulares, las proteínas no específicas de los mastocitos y otras proteínas destacables

Sobre todo, su característica más destacable es la presencia, en su citoplasma, de un gran número de gránulos de almacenaje (150-200), desde los cuales durante la reacción de desgranulación se vierten los mediadores desencadenantes de los cambios, inmediatos y tardíos, en el tejido afectado [da Silva et al., 2014, Wernersson and Pejler, 2014]. Esos mediadores son:

A.- Los mediadores preformados presentes y almacenados en sus gránulos:

**-Aminas biógenas:**

Donde destaca por su importancia la histamina [4-(2-aminoetil)-1,3-diazol], que está involucrada en las respuestas locales y media la interacción durante la respuesta inflamatoria de otros tipos celulares, además de aumentar la permeabilidad capilar, la quimiocinesia y la broncoconstricción. Pertenecen a este grupo, también, la dopamina y la serotonina que actúan como neurotransmisores; y las poliaminas encargadas de la regulación estructural de los gránulos, así como del almacenamiento de histamina, serotonina y la β-hexosaminidasa [Wernersson and

Pejler, 2014; Abbas et al., 2002].

-Proteoglicanos:

Grupo en el que se encuentran la heparina y el condroitin sulfato cuyas funciones son la anticoagulación, además, de la creación de matriz para el almacenamiento de las aminas biógenas [da Silva et al., 2014]. Del mismo modo, encontramos la serglycina cuya función es promover el almacenaje de aminas y proteasas [Åbrink et al., 2004].

-Proteasas neutrales y específicas de los mastocitos:

La triptasa y la quinasa, encargadas de la remodelación tisular y la degradación de la membrana basal de los vasos, es decir, están involucradas tanto en funciones de protección como de detrimento del proceso inflamatorio [Glenner and Cohen, 1960, Benditt and Arase, 1959], junto a la carboxipeptidasa A3 (CPA3) encargada de la protección frente a toxinas [Haas et al., 1979].

-Proteasas no específicas de los mastocitos:

Grupo que comprende a la catepsina G que contribuye a la capacidad antibacteriana en los mastocitos [Schechter et al., 1990], la metaloproteasa 9 (MMP9) implicada en procesos de proteólisis a nivel de la matriz extracelular (ECM) [Baram et al., 2001], la caspasa 3 cuya función es desconocida [García-Faroldi et al, 2013a; Zorn 2013], la desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 5 (ADAMTS5) que está implicada en el proceso de degradación de los agreganos [García-Faroldi et al. 2013b], la granzima B implicada en los efectos pro-apoptóticos desarrollados por los mastocitos [Pardo et al., 2007] y, por último, la renina implicada en la regulación de la presión sanguínea [Silver et al., 2004].

B.-Los mediadores lipídicos de nueva síntesis:

-Leucotrienos C4, D4 y B4:

Generadores de moco, broncoconstricción y aumento de la permeabilidad vascular [Bitencourt et al.,2013].

-Prostaglandinas y tromboxanos:

Desarrollan los siguientes eventos: broncoconstricción, agregación plaquetaria, quimiotaxis de neutrófilos y vasodilatación.

-Factor activador de plaquetas (PAF):

Se define como un mediador responsable de cambiar la permeabilidad de los vasos sanguíneos durante la reacción inflamatoria.

-Interleuquinas (IL-1, 4, 5, 6, 13 y 15) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ):  
Encargadas de regular la fase tardía de la reacción de desgranulación.

-IL-1: citoquina pro-inflamatoria que produce un aumento en la síntesis de la IL-6 y que, además, genera vasoconstricción tanto por mecanismos dependientes de calcio como por mecanismos independientes de dicho ion [Eisenhut and Choudhury, 2017].

-IL-4: citoquina inductora de la polarización de las células Th2 [Bradding et al., 1992]. y, a su vez, inhibidora de la proliferación de las células Th1 por regulación negativa de la respuesta inmune mediada por ellas [Xiao-Wei Jia et al., 2017].

-IL-5: citoquina producida tanto por linfocitos T como por los mastocitos cuya función es estimular la proliferación de los eosinófilos además de su reclutamiento tisular [Bradding et al., 1993].

-IL-13: citoquina no glicosilada encargada de modular la producción de interleuquinas tales como IL-1, IL-8 y, también, del factor TNF- $\alpha$  [Seyfizadeh et al., 2015].

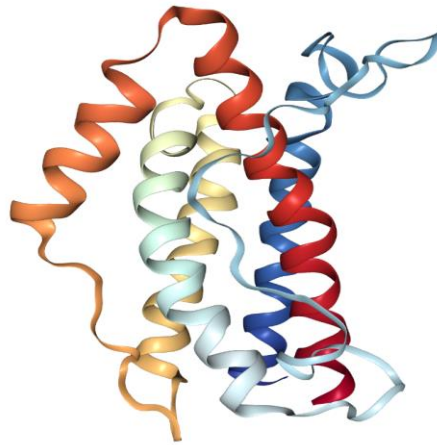
-IL-15: citoquina encargada de suprimir la actividad antibacteriana en las células cebadas [Orinska et al., 2007].

Dentro del grupo de las citoquinas se encuentran las dos moléculas que estudiamos durante nuestra investigación, el TNF- $\alpha$  y la interleuquina-6 (IL-6). Ambas moléculas, que son sintetizadas y liberadas en mayor o menor cantidad según sea el nivel de afectación del organismo, presentan las siguientes características:

#### Interleuquina-6 (IL-6):

Esta citoquina se define como una glicoproteína con una masa molecular de 26 KDa y 184 aminoácidos cuyo gen a partir del cual se codifica se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 [Scheller et al., 2006; Choy, 2004; Papanicolau et al., 1998]. Es sintetizada con un péptido señal en su extremo N-terminal y cuya estabilización se consigue mediante procesos de N- y/o O-glicosilación, así como por la presencia de puentes disulfuros intramoleculares en su estructura [Heinrich et al., 1998], la cual presenta cuatro  $\alpha$ -hélices [Bazán, 1990] dispuestas de la siguiente manera:

Como se observa en la figura 3, las hélices A y B se unen por un gran lazo disponiéndose, en consecuencia, paralelas entre ellas. Por otro lado, las hélices B y C se unen por un lazo pequeño disponiéndose, en este caso, de manera antiparalela. Por último, las hélices C y D se unen mediante un lazo largo lo que determina que las hélices C-terminales se empaqueten de manera paralela. Por consiguiente, la topología de su estructura es “up-up-down-down”. Además, esta estructura presenta una peculiaridad ya que si se tira de sus extremos C-terminal y N-terminal se formaría un nudo [Heinrich et al., 1998].



**Figura 3. Estructura de la IL-6.** En la cual, las hélices A y B se disponen paralelas y están unidas por un gran lazo. De manera análoga, las hélices C y D se unen mediante un lazo largo lo que determina que las hélices C-terminales se empaqueten de modo paralelo. Por último, las hélices B y C se unen por un lazo pequeño y son antiparalelas. En la imagen la hélice A es de color azul oscuro, la hélice B es de color azul claro, la hélice C es de color beige y la hélice D es de color rojo. Imagen tomada de Protein Data Bank, Xu et al., 1997.

En humanos, su receptor (IL-6R) se ha definido como una glicoproteína de membrana perteneciente a la familia de receptores de citoquinas de tipo I con un peso molecular de 80 KDa al cual se une su ligando con baja afinidad [Papanicolau et al., 1998]

Según Erta et al. (2012) se identificó como un factor de diferenciación de células B que inducía su maduración a células productoras de anticuerpos. En sí, sus funciones son muy variadas puesto que actúa a muchos niveles como, por ejemplo: el sistema inmune, la regulación de los hepatocitos, células progenitoras hematopoyéticas, así como a nivel del esqueleto, el sistema cardiovascular, la placenta y los sistemas endocrino y nervioso. En consecuencia, podemos decir que la IL-6 es una citoquina pluripotencial que, además, desempeña funciones tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias ya que, por un lado, es la principal mediadora en la respuesta de fase aguda y, al mismo tiempo, controla a la IL-1 y al TNF- $\alpha$  de manera parcial [Choy, 2004; O'Malley and Moldawer, 2006]; y, también, libera antagonista para los receptores de ambas citoquinas [Choy, 2004]. Otra de sus funciones es la regulación de la termogénesis corporal puesto que es muy conocido su rol como pirógeno endógeno; tanto es así que resulta indispensable su intervención para las etapas finales que producen la fiebre [Mackowiak, 1998]. Habría que destacar también su actuación a nivel de las células endoteliales vasculares en las que promueve la expresión de la selectina-E, las ICAM, las VCAM, moléculas de adhesión que facilitan el tráfico leucocitario y la residencia, además de



otros mediadores pro-inflamatorios [Gentiletti and Fava, 2003]. Por último, se ha descrito su capacidad para estimular la producción de VEGF en fibroblastos [Haynes and Fauci, 2006; Gentiletti and Fava, 2003].

Además, resulta destacable que su estructura sea compartida por otras citoquinas tales como: IL-11, IL-27, IL-31, factor inhibitorio de leucemia, oncostatina M, cardiotropina-1, neuropoyetina y dos análogos víricos de la IL-6; las cuales en su conjunto constituyen el grupo de las neuropoyetinas [Bazan, 1990; Bazan, 1991; Taga and Kishimoto, 1992; Heinrich et al., 2003; Bauer et al., 2007; Wang et al., 2009].

Como Anderson et al. (2013) explican, la activación de la IL-6 se desencadena a través de un factor de transcripción llamado Factor Nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ). Del mismo modo, estos autores determinan que en la unión a su receptor (IL-6R) es necesaria la presencia de la glicoproteína 130 (gp130) y con ello se activan las vías JAK/STAT, MAPK y IP3K.

#### Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ):

En 1975, Carswell et al. describieron por primera vez el TNF al intentar, durante sus experimentaciones, aumentar el nivel de dicho factor en suero de ratón que fueron tratados con un agente iniciador y lipopolisacárido (LPS). En sí, se define como una potente citoquina secretada por macrófagos que se aisló y definió en principio como caquexina [Eck and Sprang, 1989]. Entre sus características, cabe destacar que presenta un punto isoelectrico de 5,3, que se mantiene estable ante pH comprendidos entre 5.5 y 10, es moderadamente hidrofóbica, y que es termoestable durante 40h al ser sometida a 37°C.

Principalmente, se detectó su síntesis en monocitos sanguíneos y macrófagos hísticos, aunque, también, puede ser sintetizado por otros tipos celulares [Beutler et al., 1987] como son las Natural Killer (NK) [Paya et al., 1988], los linfocitos T periféricos y macrófagos [Steffen et al., 1988] entre otros. Esta molécula media en diferentes dolencias, tales como: procesos febriles inducidos por endotoxinas [Dinarello et al., 1986], shock [Beutler et al., 1985; Tracey et al., 1986], y desarrollo de caquexia asociado a enfermedades crónicas, tales como el SIDA [Oliff et al., 1987].

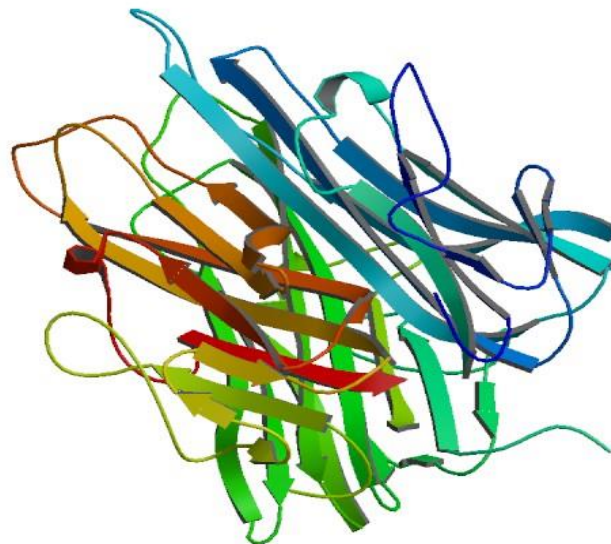
Se debe agregar que sus funciones son llevadas a cabo mediante su unión a receptores de alta afinidad [Eck and Sprang, 1989], tras la cual se producen los siguientes efectos:

- Inhibición del metabolismo de los triglicéridos en los adipocitos [Beutler et al., 1985; Kawakami and Cerami, 1981; Pekala et al., 1984; Torti et al., 1985] al suprimir la enzima lipoproteinalipasa y, por otro lado, el aumento de la

- glucogenólisis en miocitos [Zentella et al., 1993].
- Inhibición del desarrollo de células progenitora hematopoyéticas en estudios in vitro [Broxmeyer et al., 1986]
  - Estimulación de la producción de factores de crecimiento hematopoyéticos en diferentes tipos celulares [ Munker et al., 1986; Zucali et al., 1988]
  - Activación de los neutrófilos [Shalaby et al., 1985; Klebanoff et al., 1986].
  - Activación de los protooncogenes c-myc y c-fos en fibroblastos [Eck and Sprang, 1989].

Hay que mencionar que esta citoquina se encuentra codificada en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [Spies et al., 1986; Müller et al., 1987] y se clasifica junto con otras interleucinas e interferones en un grupo que carece de relación estructural entre sus componentes [Eck and Sprang, 1989]. Se sintetiza como prohormona que, para madurar, en el caso de los humanos, requiere de la escisión de un residuo formado por 76 aminoácidos presentes en el extremo amino terminal de su cadena. La hormona madura resultante presenta en su estructura un único puente disulfuro entre dos cisteínas en su superficie [Hsu et al., 1986].

En concreto, se forma a partir de la asociación de tres monómeros de entre 16-18 KDa que mediante uniones no covalentes dan lugar a una proteína de forma triangular [Wingfield et al., 1987], cuya estructura es de tipo sandwich de hojas  $\beta$  antiparalelas con topología de barril beta [Eck and Sprang, 1989]; a su vez, esta molécula se presenta, generalmente, en forma de trímero (Figura 4). En relación a la unión con su receptor se lleva a cabo a nivel de su base y, también, de manera no covalente.



**Figura 4. Estructura del TNF- $\alpha$ .** La cual está formada por tres monómeros de entre 16-18 KDa. de cadenas- $\beta$  antiparalelas que conforman una estructura de barril beta. Imagen tomada de Protein Data Bank, cuyos autores depositantes son Eck and Sprang, 1989.

Asímismo, como explican Wermesson and Pejler (2014) y retomando la composición de los gránulos en los mastocitos comentamos, a continuación, otros componentes que presentan:

-Enzimas lisosomales:

Donde encontramos a la  $\beta$ -hexosaminidasa, las  $\beta$ -glucuronidasa, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa y la  $\beta$ -galactosidasa junto a la arilsulfatasa A que, actúan en el proceso de degradación lisosomal; además de las catepsinas (A, B, C, L, D y E) las cuales actúan, también, en el proceso de degradación lisosomal, así como el procesamiento de pro-triptasas o pro-quimasas o de la CPA-3.

-Factores de crecimiento:

En este grupo están comprendidos: el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) los cuales desarrollan eventos pro-angiogénicos; el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) que produce tanto efectos pro-fibróticos como anti-inflamatorios, el factor de células madre y, por último, el factor de crecimiento de los nervios involucrado en la interacción de las terminaciones nerviosas con los mastocitos.

-Proteínas asociadas a la membrana granular:

En este grupo se encuentran las proteínas de membrana asociadas a vesículas (VAMP2, VAMP3, VAMP7 Y VAMP8) que actúan a nivel de la fusión de las vesículas en los mastocitos, la syntaxina 3 la cual interviene a nivel de la fusión entre los gránulos y, también entre éstos y la membrana plasmática, las sinaptotagmina II y sinaptotagmina III encargadas de testar el calcio presente y, además en el caso de ésta última está implicada en la regulación del tamaño granular, la MUNC 18-2 encargada del ensamblaje entre los gránulos y los microtúbulos del citoesqueleto, la MUNC 13-4 que está implicada en determinar el nivel de calcio que es, a su vez, promotor de la formación de los complejos SNARES, las proteínas de membrana secretoras asociadas a transportador (SCAMP 1, SCAMP 2) involucradas en los complejos de fusión entre los gránulos, el complejo de diferenciación 63 (CD63) que forma parte del proceso de desgranulación, la cadena ligera 3 de la proteína II asociada al microtúbulo (LC3-II) que están implicada en procesos de autofagia en las células cebada, el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC clase II) lo que indicaría la posibilidad de que los mastocitos pudieran actuar en la presentación de antígenos, y las RAB3D, RAB5, RAB7, RAB9A, RAB18, RAB27A, RAB27B, RAB42, RAB43 encargadas de regular el tráfico de membrana.

-Otros:

En este grupo se comprenden la heparanasa encargada de la estructura de la heparina, la catelicidina (LL37) cuyos efectos son antibacterianos, la proteína básica de gránulos de eosinófilos cuya función aún es desconocida, así como la secretogranina III y la cromogranina A las cuales se encargan de la regulación del número de gránulos en las células RBL-2H3.

### 1.1.3- Receptores del mastocito.

Los mastocitos pueden ser estimulados vía receptor dependiente o receptor independiente y por estímulos de diferente origen como físicos, químicos o biológicos. Sus receptores son glicoproteínas de membrana encargadas de la transducción de señales al interior celular, es decir, que tras unírseles su molécula señalizadora desencadenan las reacciones de la activación mastocitaria. En el caso de los mastocitos, encontramos numerosos receptores de la respuesta inmune y otros tipos de receptores que les confieren la capacidad de reaccionar frente a múltiples estímulos específicos e inespecíficos. De entre ellos destacaremos dos:

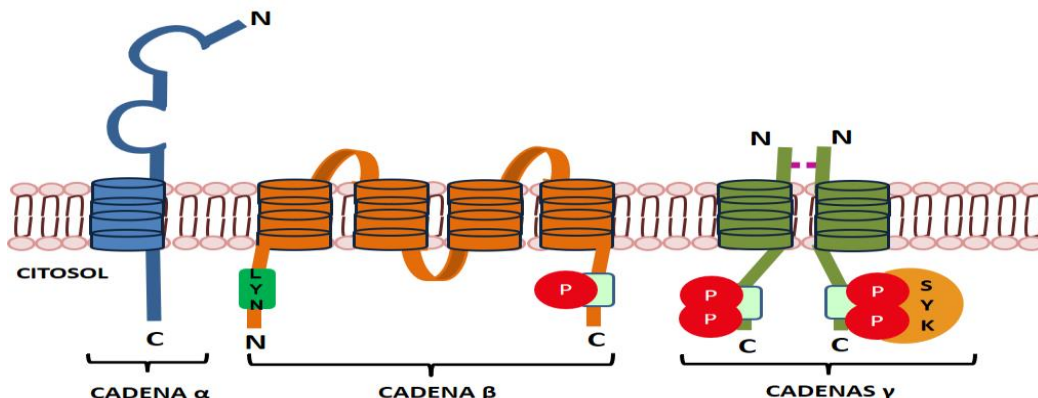
-Los receptores de alta afinidad para la IgE (FcεRI): los cuales están relacionados con la activación específica producida tras la unión de un antígeno específico a las fracciones variables de la inmunoglobulina E, la cual está, a su vez, unida a través de sus fracciones constantes a un receptor de membrana denominado FcεRI. Según Abbas et al. (2002) cada uno de estos receptores presentan tres subunidades transmembrana que son (Figura 5):

-Cadena α: lugar de unión de la inmunoglobulina E.

-Cadena β: formada por cuatro dominios transmembrana que tiene un motivo de activación del inmunorreceptor vía tirosina (ITAM) cuya fosforilación da comienzo al proceso de degranulación.

-Cadenas γ: son un dímero de cadenas idénticas unidas mediante un puente disulfuro y, junto a la cadena β, están involucradas en la señalización; puesto que también presentan dominios ITAM en sus porciones citoplásmicas.

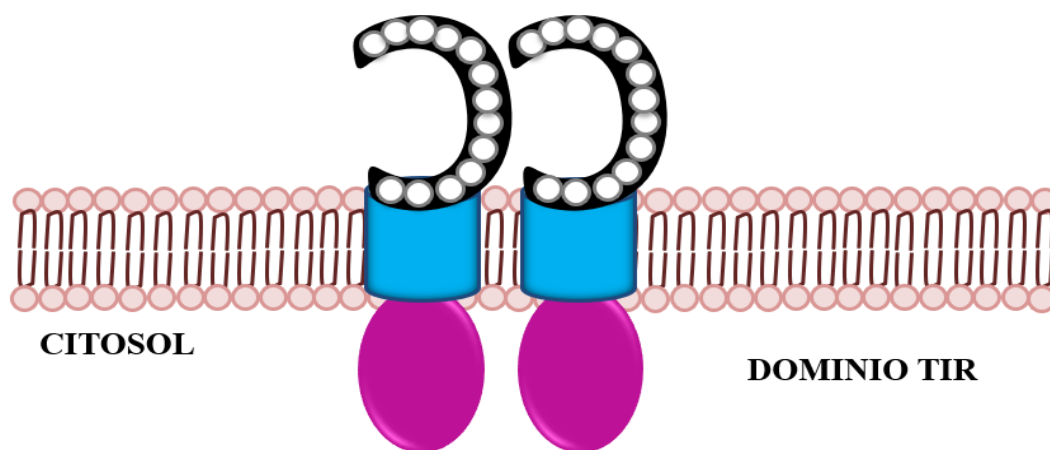
Para que este receptor se exprese en la membrana celular deben estar presentes tanto la cadena α como las cadenas γ; y es, específicamente, en los dominios Ig presentes en la región amino terminal de la cadena α donde se produce la unión de la IgE. Dicha inmunoglobulina regula de manera positiva las reacciones de hipersensibilidad por parte de los mastocitos, lo que conlleva la amplificación de las funciones efectoras llevadas a cabo por ella.



**Figura 5.- Estructura de los receptores de alta afinidad FcεRI. Está formada**

por tres tipos de cadenas distintas, como son: la cadena  $\alpha$  en cuyo dominio amino terminal se une la IgE, la cadena  $\beta$  que presenta cuatro dominios ITAM y un dímero de cadenas  $\gamma$  que, también, expresan dominios ITAM en sus porciones citoplásmicas.

- Los receptores Toll-like (TLR2, TLR4, TLR6 y TLR8): Son una familia de receptores del sistema inmune innato relacionados con la activación inespecífica debida al reconocimiento, por parte del mastocito, de componentes bacterianos o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son estructuras moleculares muy conservadas en familias enteras de patógenos como, por ejemplo; el LPS o la flagelina, entre otros. Son glicoproteínas transmembrana de tipo I que presentan, como se muestra en la figura 6, un dominio receptor Toll/IL-1 (TIR) [Bowie and O'Neil, 2000] en el citoplasma que mediante la unión de otros dominios TIR propagan la señal que da comienzo a la vía de señalización, mientras que sus dominios N-terminales extracelulares presentan una secuencia rica en leucina (LRR) flanqueada por una secuencia rica en cisteínas [Kruithof et al., 2007].



**Figura 6.- Estructura de los receptores Toll-like.** Son glicoproteínas transmembrana que tras reconocer PAMPs desencadenan los procesos inflamatorios. Presentan un dominio TIR en su parte citosólica y en su extremo N-terminal una secuencia LRR flanqueada por una secuencia rica en cisteínas.

#### 1.1.4-. Vías de activación del mastocito

Los receptores Fc $\epsilon$ RI y TLR pueden activar al mastocito de forma cruzada, por lo que pueden confluir sus rutas internas de señalización. La activación del mastocito mediante la vía IgE/Fc $\epsilon$ RI desencadena los siguientes eventos:

Según Krystel-Whittemore (2014), su ruta (Figura 7) comienza con la interacción del receptor Fc $\epsilon$ RI con la tirosin kinasa Lyn, provocándose así la activación de los motivos ITAMs al fosforilarse en las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  de dicho receptor [Kalesnikoff and Galli, 2008]. En el siguiente paso, la proteína Lyn fosforila

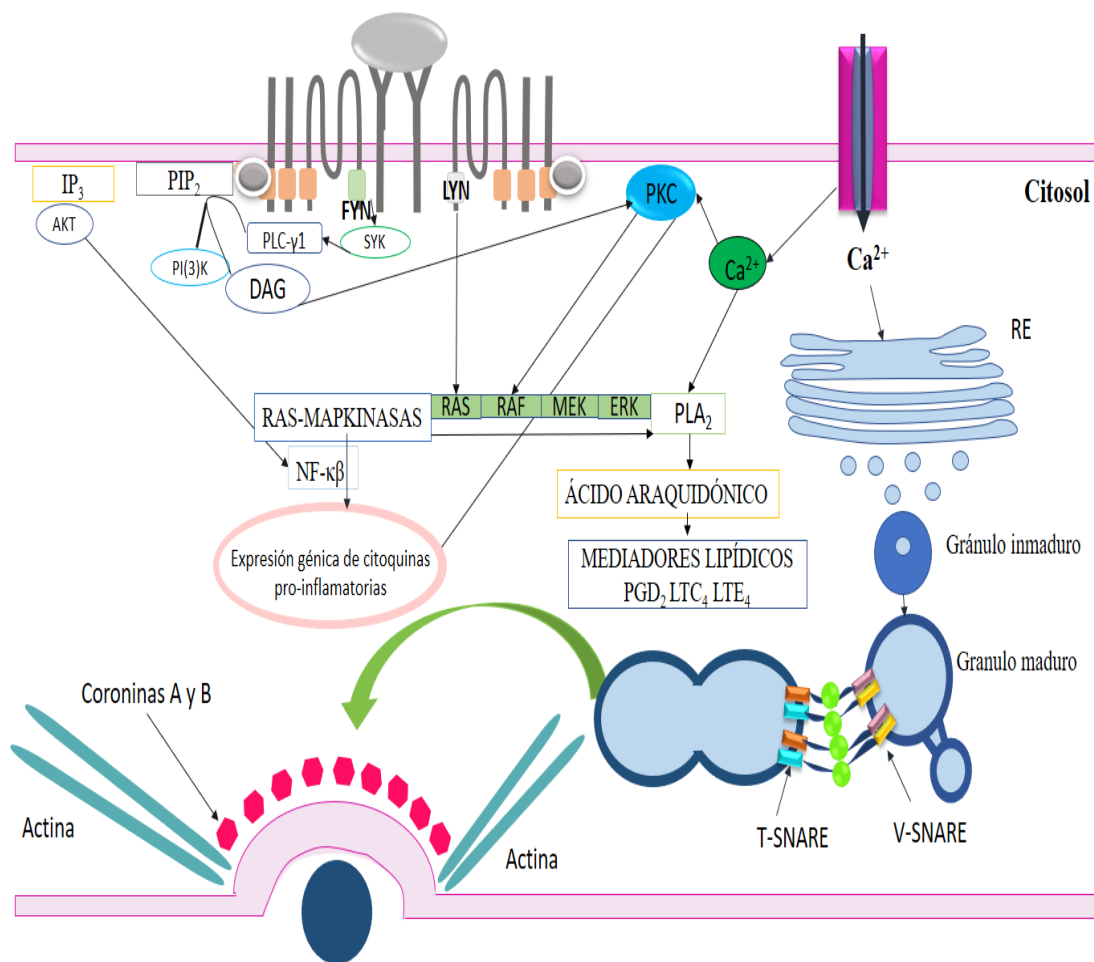
a la tirosin kinasa Syk que, a su vez, fosforila a las proteínas estabilizadoras de células T activadas (LAT1 y LAT2) [Iwaki et al., 2005]. Tras ello, la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ) fosforilada hidroliza el compuesto fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato obteniéndose, por consiguiente, los compuestos inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Dichos compuestos actúan como segundos mensajeros y producen la movilización de calcio del retículo endoplásmico (RE); siendo dicho aumento de calcio el causante de la translocación del factor NF- $\kappa$ B al núcleo y comenzándose, en consecuencia, la transcripción de las siguientes citoquinas pro-inflamatorias: Il-13, Il-6 y TNF- $\alpha$  [Hitomi et al., 2004].

La regulación de esta vía se lleva a cabo mediante la proteína de Zeb2 [Barbu et al., 2012], mientras que la proteína Fyn regula la degranulación complementariamente a Lyn. En concreto, Fyn activa al fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) que produce la activación de la proteína quinasa dependiente de calcio (PKC) al aumentar el calcio intracelular mediante la activación de la proteína quinasa B (Akt). A su vez, el ligando para la activación de miembros de la familia de células T (NTAL) también activa a PI3K y, con ello, regula la liberación de calcio intracelular. Con estos eventos se activa la desgranulación, así como la producción de citoquinas y mediadores lipídicos [da Silva et al., 2014].

Además, como explican Wernersson and Pejler (2014), la fase final de esta ruta requiere la fusión entre gránulos y entre la membrana de los gránulos o de la membrana plasmática; para ello, es necesaria la interacción de los receptores de proteínas de fijación soluble de NSF en vesículas (v-SNAREs) presentes en las vesículas que están en el citoplasma de los mastocitos y los receptores de proteínas de fijación soluble de NSF en la diana (t-SNAREs) presentes en los lugares de unión (otras vesículas o la membrana plasmática). En el caso de los mastocitos son predominantes las v-SNAREs: VAMP8 y VAMP7 [Puri and Roche, 2008, Tiwari et al., 2008, Sander et al., 2008]. Mientras que las t-SNAREs predominantes son: syntaxinas 3 y 4, y la proteína asociada al sinaptosoma (SNAP23) [Brochetta et al., 2014, Paumet et al., 2000, Guo et al., 1998, Sander et al., 2008]. Junto con ellas, otras proteínas están también involucradas en esta fusión de las membranas como son: complejo sensor de calcio II y las GTPasas de la familia RAB, siendo crucial para el desarrollo de la desgranulación la RAB27B [Tadokoro et al., 2005, Mizuno et al., 2007]. Durante este proceso, las sinaptotagminas son las encargadas de promover dicha fusión de membranas al testar el calcio intracelular, destacando entre ellas la sinaptotagmina II [Baram et al., 1999, Melicoff et al., 2009], así como las proteínas de la familia MUNC18 que también interfieren en la fusión entre membranas puesto que interaccionan con las syntaxina SNAREs. Revelándose la MUNC 18-2 con una importancia mayor en la interacción entre los gránulos y los microtúbulos [Brochetta et al., 2014].

Cuando los gránulos se dirigen hacia el exterior celular viajan a través de los microtúbulos [Nishida et al., 2005], con ello se inicia el proceso de exocitosis que en

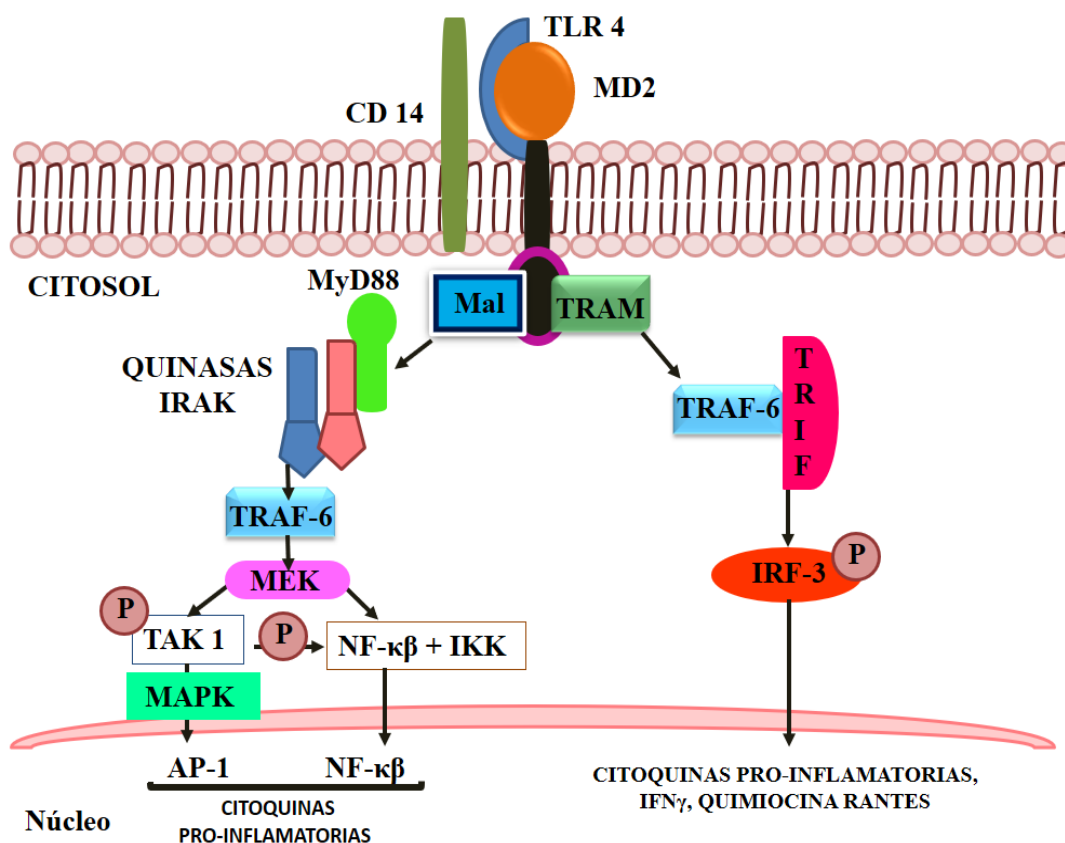
este caso se conoce como “compuesto de exocitosis”. El cual necesita de la despolimerización de la actina cortical que está regulada por las proteínas coronin 1A y coronin 1B [Deng et al., 2009, Föger et al., 2011]. En concreto, en el caso de los mastocitos se ha descrito la “exocitosis por partes” (del término en inglés “piecemeal exocytosis”) consistente en la gemación de vesículas de pequeño tamaño a partir de los gránulos citoplásmicos [Dvorak, 2005].



**Figura 7.- Representación de los principales eventos del proceso de desgranulación del mastocito.** El mecanismo se desarrolla tras la interacción del receptor FcεRI con la tirosin kinasa Lyn, provocándose así la activación de sus motivos ITAMs. El siguiente paso consiste en la fosforilación de la proteína Lyn por la tirosin kinasa Syk; la cual, también, fosforila a las proteínas LAT1 y LAT2. Posteriormente, se obtienen los compuestos IP<sub>3</sub> y DAG al hidrolizarse el fosfatidilinositol-4,5- bifsfato, los cuales, actúan como segundos mensajeros. En consecuencia, se produce la movilización de calcio del RE causándose la translocación del factor NF-κβ al núcleo y comenzándose así la transcripción de las siguientes citoquinas pro-inflamatorias: Il-13, Il-6 y TNF-α. Su fase final requiere la fusión entre gránulos y las membranas de los mismos y la membrana plasmática, es

decir, que se requiere la interacción de las proteínas v-SNARES y T-SNARES. Además, otras proteínas son necesarias como las coronin 1A y 1B y la actina entre otras.

En el caso de los receptores TLR se desencadenan dos rutas de señalización que pueden ser: dependiente de la proteína adaptadora llamada, respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (MyD88) o MyD88-independiente, aunque esta situación sólo ocurre para los receptores TLR3. En el caso de los mastocitos, la ruta desencadenada es MyD88 dependiente. Tal y como explican Núñez Miguel et al., (2007), MyD88 es una proteína adaptadora, al igual que las proteínas Mal, el adaptador de receptores tipo Toll (TRIF) y la molécula adaptadora de TRIF (TRAM) (Figura 8). Así, Mal y TRAM funcionan como “puentes adaptadores” de las proteínas TRIF y MyD88. En concreto, Mal produce una activación rápida del factor NF- $\kappa$ B mientras que TRAM activa al factor regulador del interferón (IRF-3) por lo que, en consecuencia, se producen citoquinas pro-inflamatorias, el interferón  $\beta$  y la quimiocina RANTES.



**Figura 8.- Ruta de señalización típica de un receptor TLR, en este caso, TLR4.** Dicha ruta requiere la actuación de la proteína adaptadora MyD88 junto con otras proteínas como son MAL, TRIF y TRAM. Así, Mal y TRAM funcionan como “puentes adaptadores” de las proteínas TRIF y MyD88; en concreto, Mal produce una activación rápida del factor NF- $\kappa$ B mientras que TRAM activa al IRF-3 por lo que, en consecuencia, se producen citoquinas pro-inflamatorias, el interferón  $\beta$  y la



*quimiocina RANTES. En sí la ruta se desencadena por el reclutamiento de las quinasas de la familia IRAK mediante interacción directa con la proteína MyD88, las cuales se autofosforilan. Dicho reclutamiento es llevado a cabo por el dominio DD de la proteína adaptadora MyD88. Tras ello, la proteína TRAF-6 activa a MEK una vez se ha producido la interacción directa de las proteínas de la familia IRAK con ella. En consecuencia, el complejo IKK se activa por la fosforilación de la proteína TAK1 produciéndose, por tanto, la activación del factor NF- $\kappa$ B al no estar bajo la influencia de su inhibidor I $\kappa$ B. Así, el factor NF- $\kappa$ B puede acceder al núcleo celular, produciéndose con ello la transcripción de los genes para ciertas citoquinas inflamatorias tales como: IL-1, IL-6, IL-8; IL-12 y TNF- $\alpha$ . A su vez, TAK1 puede activar la ruta de AP-1 a través de las MAPK. Imagen adaptada de Núñez Miguel et al., 2007.*

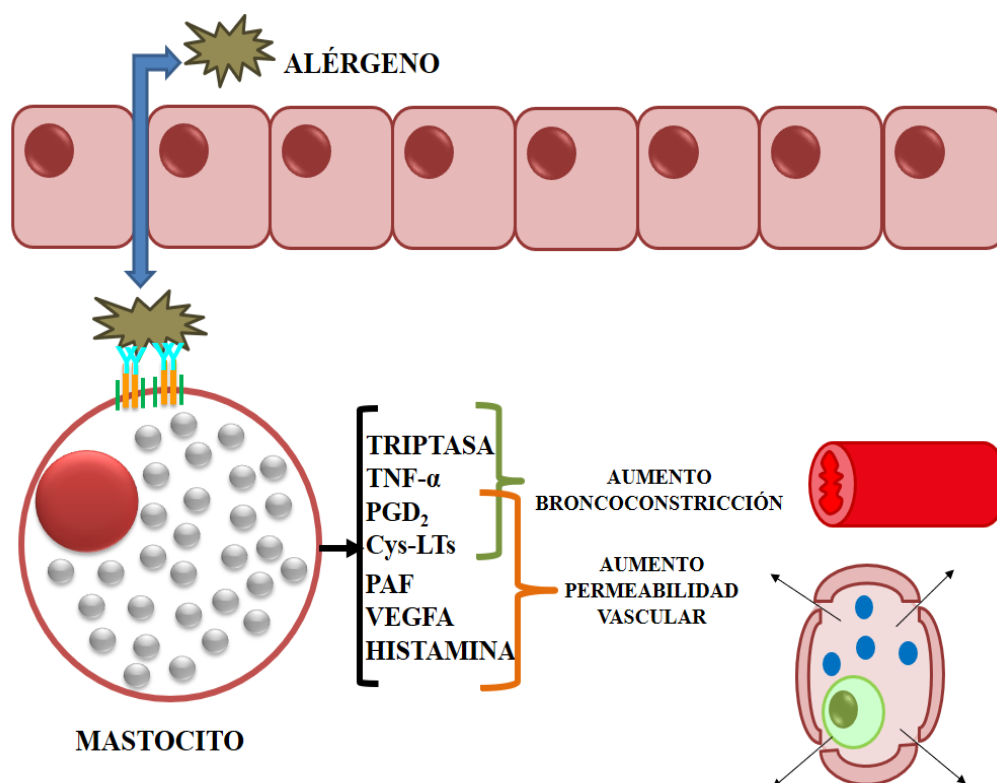
La ruta, en sí, se desencadenan por el reclutamiento de las quinasas asociadas al receptor de IL-1 (familia IRAK) mediante interacción directa con la proteína MyD88 [Kopp et al.,1999], puesto que dispara la autofosforilación de IRAK [Burns et al., 2000]. Dicho reclutamiento es llevado a cabo por el dominio de muerte (DD) de la proteína adaptadora MyD88. En los siguientes pasos, la proteína TRAF-6 activa a una MAP quinasa quinasa (MEK) tras la interacción directa de las proteínas de la familia IRAK con ella [Chaudhary et al., 1998]. En consecuencia, el complejo IKK se activa por la fosforilación del factor de crecimiento transformante  $\beta$  activado por kinasa 1 (TAK1) produciéndose, por tanto, la activación del factor NF- $\kappa$ B al no estar bajo la influencia de su inhibidor I $\kappa$ B [O'Neill and Dinarello, 2000]. Es decir, el factor NF- $\kappa$ B puede acceder al núcleo celular, produciéndose con ello la transcripción de los genes para ciertas citoquinas inflamatorias tales como: IL-1, IL-6, IL-8; IL-12 y TNF- $\alpha$ . A su vez, TAK1 puede activar la ruta de la proteína activadora (AP-1) a través de las proteínas quinasa activada por mitógeno (MAPK).

#### *1.1.5- Mastocito e inflamación.*

Los principales síntomas que se muestran al comienzo del proceso inflamatorio son: rubor, calor, dolor y tumor; presentándose, por tanto, eritema y habón. Su aparición nos indica que se están liberando los diferentes compuestos preformados y almacenados en los gránulos en su fase inicial (segundos y minutos) y, posteriormente, en su fase tardía (2-9 horas) se están liberando otros compuestos que provocan la inflamación general de la zona afectada; la cual pierde su función (functio laesa).

Según Galli et al., (2008), la fase aguda comienza minutos después del reconocimiento cruzado entre la IgE y el receptor de alta afinidad Fc $\epsilon$ RI; lo que desencadena la liberación de los siguientes compuestos: mediadores lipídicos, quimiocinas, factores de crecimiento, citoquinas de nueva síntesis y los compuestos pre-formados y almacenados en los gránulos del mastocito. Entre los compuestos pre-formados que se liberan están: histamina, serotonina, heparina, condroitin sulfato,

triptasas, quimasas y carboxipeptidasas, así como TNF- $\alpha$  y el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) (Figura 9). Su activación, también, conlleva la liberación de mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos C4 y B4 y PAF. Todos estos factores liberados producen los siguientes cambios en el tejido: vasodilatación que conlleva el aumento de la permeabilidad vascular, así como, rubor, dolor y tumor, además de la contracción del músculo liso bronquial obstruyéndose el flujo de aire y, por otro lado, la secreción de mocos.

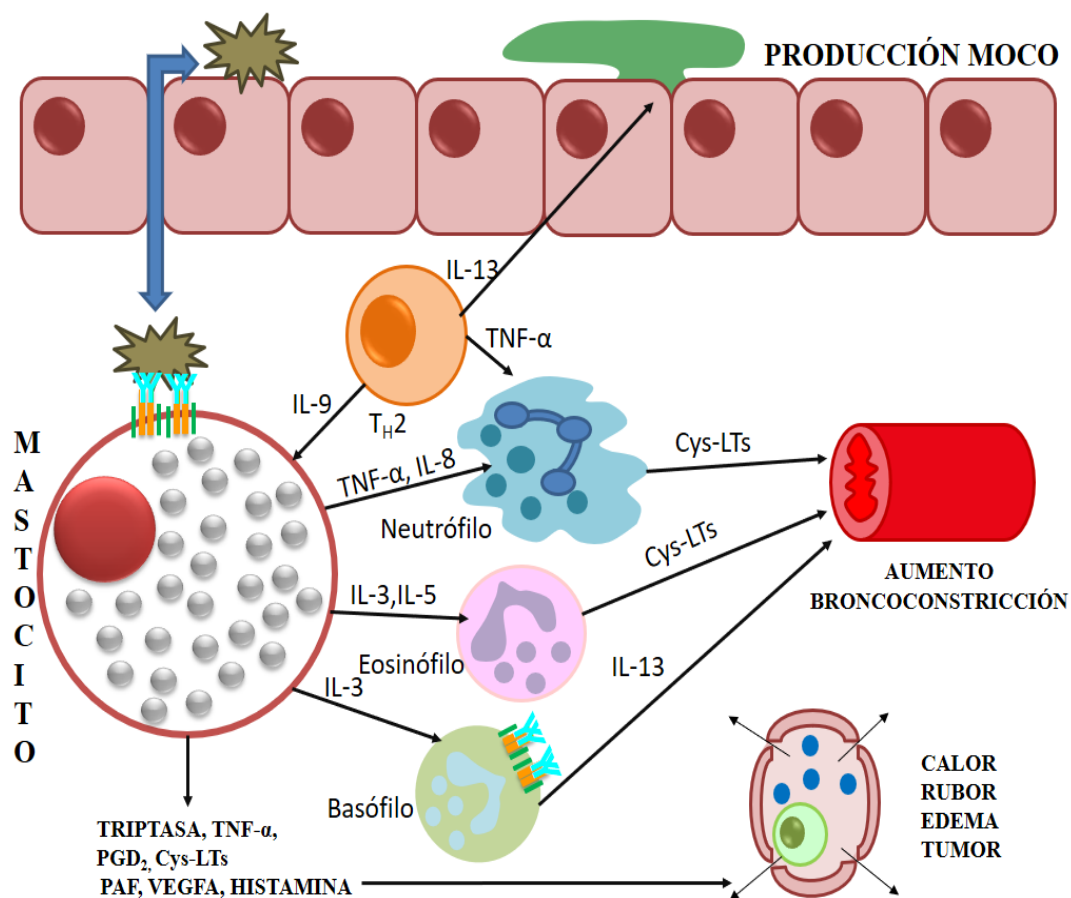


**Figura 9.- Representación esquemática de la fase aguda de la inflamación.** En ella se muestran algunos de los compuestos liberados y las reacciones que desencadenan en el tejido, como son: el aumento de la broncoconstricción y el aumento de la permeabilidad vascular.

Los mismos autores explican que durante la fase tardía de la inflamación (Figura 10) y de un modo más lento se liberan al tejido factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas de nueva síntesis. Algunos de estos compuestos, como son: TNF- $\alpha$ , leucotrieno B4 (LTB<sub>4</sub>), IL-8 y el ligando de quimioquinas 2 (CCL2) permiten el reclutamiento de otras células del sistema inmune; en el caso de los compuestos TNF- $\alpha$  o IL-5 producen la activación de células del sistema inmune innato; y, por último los compuestos TNF- $\alpha$ , IL-10 y TGF- $\beta$  estimulan las células dendríticas y, también, los linfocitos T y B; mostrando, además, los dos últimos compuestos capacidades anti-inflamatorias o inmunosupresivas. Junto con todas estas funciones, también estos compuestos son capaces de alterar la biología de las

células endoteliales de los vasos sanguíneos, las células epiteliales, fibroblastos, músculo liso y células nerviosas.

Las reacciones que forman parte de la fase tardía de dicho proceso se desarrollan entre 2-4 horas tras la exposición al alérgeno pudiendo presentar un pico, a menudo, entre 6-9 h más tarde. Durante esta fase, los neutrófilos liberan elastasa la cual activa a las metaloproteasas de la matriz extracelular que degradan al colágeno tipo III. A su vez, los eosinófilos liberan proteínas básicas y otros mediadores que dañan las células epiteliales o reclutan células que producen broncoconstricción. Dichos procesos, en la piel producen una serie de reacciones como son: edema, rubor y calor, y, en el caso del tejido pulmonar se produce estrechamiento de las vías respiratorias, así como moco.



**Figura 10. Representación esquemática de la fase tardía de la inflamación.** En ella se muestra el conjunto de compuestos liberados, así como el conjunto de reacciones que producen. Se encuentran implicados diferentes tipos celulares, tales como: linfocitos T<sub>H2</sub>, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Asimismo, el conjunto de compuestos liberados produce una serie de cambios en el tejido como son: producción de moco, aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y aumento de la broncoconstricción.

## **1.2-MELATONINA Y SISTEMA INMUNE:**

La melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina) es un derivado de la serotonina que se almacena en la epífisis de mamíferos. Esta molécula fue descrita por Mc-Cord y Allen [Mc-Cord y Allen, 1917] y años más tarde, en 1958, se aisló partiendo de extractos de glándula pineal [Lerner et al.,1958]. Su descubridor, Aaron Lerner, la nombró como melatonina para hacer referencia a su capacidad para blanquear las células epiteliales en los anfibios, así como al hecho de que deriva de la serotonina.

Esta molécula se ha detectado en una amplia variedad de organismos entre los que se encuentran: bacterias, organismos unicelulares eucarióticos, algas, plantas y hongos, además de invertebrados y vertebrados [Hardeland y Poeggeler, 2003].

### 1.2.1-Estructura génica y proteica.

#### Estructura génica:

La enzima triptófano hidroxilasa se define como una enzima perteneciente a la superfamilia de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos (AAAH) y se caracteriza por ser limitante durante la ruta de síntesis de la melatonina a partir del triptófano. Según el estudio de su cDNA se ha podido concluir que en el caso de los humanos está determinada por dos genes localizados en los cromosomas 11 y 12 [Nielsen et al.,1992; Walther and Bader, 2003; Walther et al.,2003]. A partir de los cuales se sintetizan dos enzimas homólogas denominadas como triptófano hidroxilasa 1 y 2 (TPH1 y TPH2), que además se distribuyen en tejidos diferentes en el organismo, puesto que, mientras, la TPH1 se localiza en órganos tales como: timo, bazo, glándula pineal o el intestino; la TPH2 actúa sólo en el cerebro. Sin embargo, en lo referente a su estructura y función existe un alto nivel de conservación lo que determina que compartan ciertas características: que puedan ser fosforiladas tanto por la proteína quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /Calmodulina como por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Por otro lado, se ha descrito la presencia de residuos idénticos, en ambas isoformas, en la zona de unión al triptófano y, también, es sus extremos C y N-terminal [Walther and Bader, 2003].

Durante la síntesis de la melatonina, la N-acetiltransferasa (NAT) encargada, principalmente, de N-acetilar a la serotonina es la arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT); la cual toma el grupo acetilo de la molécula AcetilCoA [Voisin et al., 1984]. Esta enzima forma parte de la superfamilia de las N-acetiltransferasas relacionadas con GCN5 (GNAT) que se caracterizan por presentar cuatro motivos (A, B, C y D) muy conservados [Vetting et al., 2005]. El gen encargado de su codificación está formado por 4 exones y 3 intrones que en humanos se localiza en la posición 17q25 de su cromosoma 11 [Coon et al., 1996]. Sus mayores niveles de expresión se detectan en la glándula pineal y en la retina, mientras que su presencia es menor en otras estructuras periféricas o del sistema nervioso [Simonneaux y

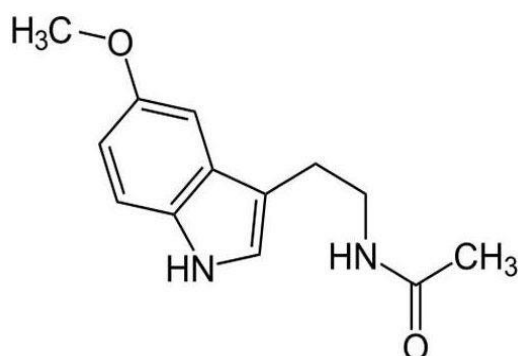
Ribelayga, 2003]. En el caso de los humanos, esta enzima presenta varios sitios de fosforilación para PKA, PKC y la caseína quinasa tipo II [Herxheimer y Petrie, 2002]. Esta enzima para activarse requiere la presencia de un puente disulfuro entre sus residuos Cys 61 y 177 [Tsuboi et al.,2002], además, de la fosforilación de sus residuos Thr 31 y Ser 205 por la PKA que aumenta su afinidad por la serotonina y su protección frente al proteosoma citosólico y las fosfatasas, debido a que la AA-NAT forma un complejo con la proteína 14-3-3 [Ganguly et al., 2001, Klein et al., 2002].

La enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) se encarga de metilar a su sustrato, la N-acetilserotonina (NAS); y el grupo metilo necesario lo obtiene del cofactor S-adenosil-L-metionina [Baldessarini and Kopin, 1966]. El gen que la codifica se encuentra en la región pseudoautosomal del cromosoma X (en humanos), y tiene dos secuencias promotoras (A y B) que presentan cada una un elemento regulador pineal (PIRE), además, de una secuencia de reconocimiento para el factor Ap-1 y un elemento de respuesta a AMPc (CRE) [Rodríguez et al., 1994a]. El transcrito al que da lugar puede presentar 9 ó 10 exones según el promotor presente.

#### Estructura proteica:

La melatonina se define como una indolamina; y, por lo tanto, en su estructura bicíclica observamos un anillo de benceno unido a un anillo de pirrol (Figura 11). Entre sus características encontramos:

- Es un cristal orgánico a temperatura ambiente (característica de los anillos heterocíclicos de las indolaminas) y de color blanco.
- Peso molecular: 232.38 Da.
- Punto de fusión comprendido entre los valores: 116-118°C.
- Hidrofóbica.
- Soluble en alcohol [Szmuszkovicz y cols.,1960].



**Figura 11. Estructura química de la melatonina.**

### 1.2.2-Síntesis y liberación.

Fueron los trabajos de Axelrod (1974) los que demostraron la capacidad de los pinealocitos para sintetizar melatonina puesto que presentan la maquinaria necesaria para ello. Sin embargo, su síntesis ocurre en una amplia variedad de tipos celulares entre los que podemos citar: retina y cuerpo ciliado del iris [Grace y cols.,1991, Aimoto y cols.,1985], ovario [Itoh et al.,1997], sistema portal hepático [Hueter et al.,1992], aparato digestivo [Bubenik, 1980, Tan et al., 1999], o sistema inmune [Guerrero and Reiter.,2002, Maldonado et al., 2009, 2013 y 2016].

Su ruta de síntesis (Figura 12) comienza con el transporte activo, controlado adrenérgicamente, que permite captar el triptófano procedente de los vasos sanguíneos circundantes. Este aminoácido es hidroxilado en su posición cinco por la enzima triptófano-5-hidroxilasa convirtiéndose, tras ello, en 5-hidroxitriptófano; este paso ocurre en la mitocondria y requiere la presencia de la pteridina tetrahydrobiopterina que actúa como cofactor [Sitaram and Lees, 1978]. Cabe destacar que dicha enzima, triptófano-5-hidroxilasa, presenta durante la noche una actividad algo más elevada [Wurtman et al., 1971]. En el siguiente paso, se lleva a cabo la descarboxilación del compuesto 5-hidroxitriptófano por acción de la L-triptófano descarboxilasa, localizada en el citosol de los pinealocitos, y obteniéndose como producto resultante la serotonina (5-hidroxitriptamina).

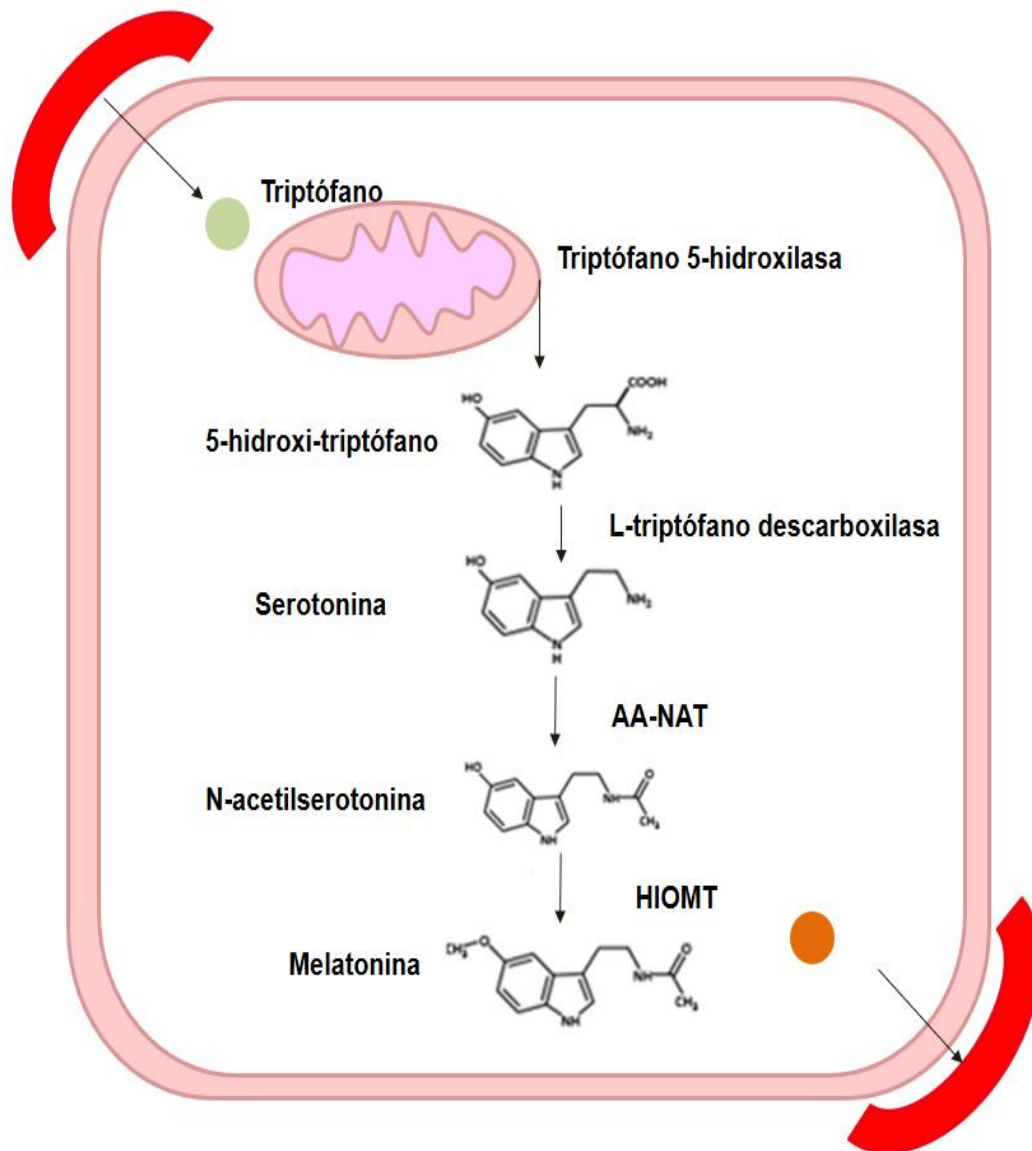
En la glándula pineal la serotonina puede seguir tres vías posibles para su metabolización, que son:

1.- Ser desaminada por la enzima amino oxígeno reductasa (MAO) y obtener 5-hidroxiindol-acetaldehído (5-HIAL), que será oxidado para obtener 5- hidroxiindol ácido acético (5-HIAA) mediante la acción de una aldehído deshidrogenasa. Y este compuesto puede ser metilado por la enzima HIOMT y se obtendrá 5-metoxindol ácido acético (5-MIAA) o bien puede ser, también, reducido mediante la acción de una alcohol deshidrogenasa a 5-hidroxitriptofol (5-HL), el cual, a su vez, será metilado por HIOMT y se producirá 5-metoxitriptofol (5-ML).

2.- Ser metilada por la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa produciéndose la molécula 5-metoxitriptamina (5-MT) (Axelrod and Weissbach, 1960).

3.- O generar melatonina bajo la actividad de los enzimas AA-NAT y HIOMT.

Centrándonos en esta tercera vía, describimos los pasos que se llevan a cabo: En primer lugar, la enzima AA-NAT, en función del ritmo circadiano, acetila a la serotonina obteniéndose acetil-5-hidroxi-triptamina o N-acetil-serotonina, cuyo grupo acetilo proviene del cofactor acetilCoA. Posteriormente, la enzima HIOMT metila a la N-acetil-serotonina para obtener N-acetil-metoxi-triptamina o melatonina. En este paso, el grupo metilo proviene de un cofactor de S-adenosil-metionina.



**Figura 12. Esquema de la síntesis de la melatonina en pinealocitos.** Este proceso comienza con el transporte activo del triptófano procedente de los vasos sanguíneos circundantes. Una vez el triptófano ha alcanzado la mitocondria es hidroxilado en su posición cinco por la enzima triptófano-5-hidroxilasa convirtiéndose, tras ello, en 5-hidroxitriptófano. En el siguiente paso, se lleva a cabo la descarboxilación del compuesto 5-hidroxitriptófano por acción de la L-triptófano descarboxilasa, localizada en el citosol de los pinealocitos, y obteniéndose como producto resultante la serotonina. Posteriormente, la enzima AA-NAT acetila a la serotonina obteniéndose acetil-5-hidroxi-triptamina o N-acetil-serotonina. Durante el último paso, la enzima HIOMT metila a la N-acetil-serotonina para obtener N-acetil-metoxi-triptamina o melatonina.

La liberación de la melatonina está controlada por el reloj biológico, es decir, el núcleo supraquiasmático. En concreto, el proceso comienza en la retina (detección de luz o de su ausencia) y se transmite a través de las células ganglionares [Lewy et

al., 1980, Smith et al., 1981]. Dichas células ganglionares al alcanzar al quiasma óptico se separan y se dirigen al núcleo supraquiasmático, el cual proyecta la señal recibida al núcleo paraventricular de hipotálamo hasta que alcanzan el ganglio cervical superior a través de la columna intermediolateral de la médula espinal torácica [Cardinali et al., 1981]. Remarcamos que, a nivel del parénquima pineal la relación existente entre las fibras posganglionares y los pinealocitos es parecida a la estructura sináptica.

Así, la luz diurna produce la hiperpolarización de los fotorreceptores lo que se traduce en el impedimento de la liberación de la noradrenalina por la vía nerviosa. En condiciones de oscuridad, en cambio, los fotorreceptores no están hiperpolarizados y su señal se transmite a los terminales sinápticos liberándose, en consecuencia, la noradrenalina; la cual se une en el pinealocito a sus receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ . Con estos eventos se produce un aumento tanto de la expresión como de la actividad de la AA-NAT asociada, a su vez, con un aumento de los niveles de N-acetilserotonina y melatonina [Hardeland et al., 1993].

Stefulj y colaboradores han detectado la expresión de los genes codificantes de las enzimas NAT y HIOMT en prácticamente todos los tejidos del organismo lo que permitiría, por tanto, a cada uno de ellos ser autónomos a la hora de sintetizarla [Stefulj et al., 2001].

### 1.2.3-Mecanismos de acción de la melatonina.

Los mecanismos de acción llevados a cabo por la melatonina se pueden incluir dentro de dos grandes grupos que son los mediados por receptores y los independientes de receptores. Dentro del primer grupo se incluyen los receptores de membrana MT1 y MT2 asociados al control de los biorritmos y la reproducción; los cuales llevan a cabo su función mediante la disminución del AMPc y la fosforilación de la proteína CREB, así como, mediante la disminución de la actividad de la PKA. En cuanto a los receptores MT3, su mecanismo de acción produce la hidrólisis de fosfoinositol [Dubocovich et al., 2003].

Del mismo modo, dentro de este grupo se encuentran los receptores nucleares que regulan la actividad de la ARN polimerasa II [Laudet et al., 1992], además de regular la expresión de diversos genes encargados de la producción de enzimas antioxidantes entre las que se encuentran la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd), superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT); además de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa (COX2) que, por el contrario son enzimas prooxidantes y proinflamatorias [Gilad et al., 1997, Crespo et al., 1999; Escames et al., 2003; Mayo et al., 2005]. Gracias a dicha regulación en la expresión génica de las enzimas antes nombradas, la melatonina, en consecuencia, potencia la expresión de los sistemas endógenos antioxidantes del mismo modo que reduce los proinflamatorios.



Por otro lado, sus mecanismos independientes de receptor se relacionan con sus capacidades antioxidantes y antiinflamatorias. Gracias a su capacidad de interacción con los radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) [Poeggeler et al., 1994], el hidroxilo ( $\bullet OH$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2 O_2$ ) [Tan et al., 2000], y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) [Zhang et al., 1999] la melatonina produce otros metabolitos que tienen, a su vez capacidad antioxidante, como son: el N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), el N-formil-5-metoxiquinuramina (AMK) y la 6-hidroximelatonina [Hardeland et al., 1993; Tan et al., 2000; Qi et al., 2000]. Al mismo tiempo, se han descrito las funciones antioxidantes que la melatonina lleva a cabo a nivel mitocondrial donde previene la formación de radicales libres, aumenta la formación de ATP, estabiliza la membrana mitocondrial y previene la apoptosis [Martin et al., 2000; Karbownik et al., 2000; Baydas et al., 2005; Hardeland and Poeggeler, 2007].

De manera análoga, la melatonina interacciona con proteínas del citosol celular. En concreto, se ha descrito su interacción con la calmodulina y la calreticulina las cuales se unen a calcio. Así, mediante su unión a calmodulina regula el estado del citoesqueleto celular [Ouyang and Vogel, 1998] y, en cambio, su unión a calreticulina regula la acción de diferentes hormonas a nivel del núcleo celular [Platet et al., 2000; Holaska et al., 2001]. A su vez, también se ha descrito su interacción con la proteína citosólica PKC que es una quinasa de serina y treonina activada por  $Ca^{2+}$ . En sí, la melatonina activaría a esta quinasa de forma dependiente de  $Ca^{2+}$  [Benítez-King et al., 1996] y ésta, luego, fosforila diferentes sustratos y modifica la estructura del citoesqueleto [Aderem, 1992].

Además, debido a sus capacidades hidrofílicas y lipofílicas [Reiter, 1991] puede acceder al citosol, a todos los compartimentos celulares que en él se encuentran [Abe et al., 1994; Tan et al., 1993] y en las membranas [Melchiorri et al., 1995]. En relación con ello, se ha descrito la capacidad de la melatonina para inhibir la translocación del factor NF- $\kappa B$  al interior del núcleo [Chaung et al., 1996].

#### 1.2.4-*Interacciones de la melatonina con otros sistemas.*

La relación entre sistema inmune y el cerebro se establece a través del sistema nervioso autónomo y el flujo neuroendocrino de la pituitaria. En ella, las vías noradrenérgicas y las peptidérgicas liberan una serie de sustancias tales como: noradrenalina, somatostatina, y el péptido vasoactivo intestinal (VIP). Dichas sustancias mediante su unión a los receptores localizados tanto en órganos como en células linfoides actúan en la regulación del sistema inmune [Ader et al., 1995]. A su vez, el sistema inmune también se ve afectado por hormonas y neuropéptidos entre los que se encuentran: la hormona del crecimiento, prolactina, melatonina, factor liberador de corticotropina (CRF), la hormona adenocorticotropa (ACTH) y los opioides. Destacamos que estos cambios a nivel del sistema inmune producen cambios, a su vez, a nivel de sistema nervioso autónomo, así como en procesos

endocrinos que están mediados por las interleuquinas y que activan la fiebre, los estados de ánimo, el sueño y la conducta locomotora al activar el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) [Ader et al., 1995]. En consecuencia, se le considera un órgano sensorial y se le llama el “sexto sentido” [Blalock, 2005].

La comunicación entre los sistemas neuronendocrino e inmune es de tipo bidireccional y se establece mediante diferentes moléculas, como son: neurotransmisores, hormonas neuroendocrinas, citoquinas, así como, también, sus receptores [Ader et al., 1995, Blalock, 2005]. Un ejemplo de ello, se encuentra en el modo en que la corticoesterona influye en la síntesis de la melatonina en la glándula pineal de forma dual, ya que depende del tipo de adrenoreceptor que esté involucrado; así, la síntesis se estimula por el  $\beta$ -adrenoreceptor y se inhibe en presencia de su antagonista  $\beta$ - $\alpha$ 1 [Fernandes et al., 1979].

### 1.2.5-Papel de la melatonina sobre las células del Sistema Inmune.

#### 1.2.5.1-Mecanismos de actuación vía receptor dependiente.

##### Monocitos:

En este tipo celular se ha confirmado la presencia tanto de los receptores de membrana de melatonina, como de sus receptores nucleares, si bien es cierto que en el caso de humanos su expresión está determinada por el estado de maduración del mismo [Barjavel et al., 1998; Pozo et al., 2004; García-Mauriño et al., 2000]. Varios estudios han demostrado que la melatonina estimula la producción de moléculas tales como: IL-6 [García-Mauriño et al., 1997] y la IL-12 [García-Mauriño et al., 1999]. A su vez y mediante la intervención de sus receptores nucleares se ha demostrado la estimulación de la producción tanto de IL-6 como del IFN- $\gamma$  en monocitos humanos y células U937 [García-Mauriño et al., 1997; García-Mauriño et al., 2000].

La melatonina también consigue proteger a este tipo celular de sufrir apoptosis. Concretamente, lo consiguen mediante la activación de MT1, MT2, la proteína ERK y la ruta de las MAPK [Radogna et al., 2007, Radogna et al., 2008, Luchetti et al., 2009]. La protección se lleva a cabo a nivel mitocondrial porque se debilita la activación/dimerización de la proteína Bax (pro-apoptótica) aunque se permite su translocación. Con ello se dañan, también, otros pasos durante la apoptosis como son: la liberación del citocromo c, la activación de las caspasas 3 y 9 o la vesicularización nuclear; además, permite la relocalización de Bcl-2 a la mitocondria que es antagonista de Bax [Radogna et al., 2008].

##### Células dendríticas:

A pesar de que en la literatura no se han descritos los posibles efectos de la

melatonina en estas células [Calvo et al., 2013]; cabe destacar, por otro lado, que en estudios con hámster sometidos a pinealectomía se ha constatado la supresión de los ritmos circadianos en relación al tránsito de estas células [Prendergast et al., 2013].

#### Macrófagos:

Por lo que se refiere al caso de los macrófagos, se ha descrito la presencia de receptores para melatonina [Maestroni et al., 2002]. Constatándose, además, la inhibición de la enzima adenilato ciclasa por la unión de la melatonina a sus receptores en estudios de macrófagos peritoneales de ratones [García-Perganeda et al., 1999]. A su vez, se ha descrito que la melatonina es capaz de desarrollar capacidades anti-inflamatorias además de regular la expresión de genes relacionados con varios procesos inflamatorios [Ban et al., 2011]. En relación con esto, Kadena et al. (2017) mediante microarray y análisis de co-expresión de genes han descrito la capacidad anti-inflamatoria de la melatonina al inhibir la transcripción de factores de transcripción al alterar la dinámica de la actina.

Como sabemos, los macrófagos son capaces de producir anión superóxido ( $O_2^-$ ) y óxido nítrico (NO) [Seljelid and Eskeland, 1993]. Aunque cabe destacar, que en el caso de murinos se ha demostrado que en presencia de melatonina sus macrófagos activos ven inhibida la producción de iNOS debido a la inhibición del factor NF- $\kappa$ B [Gilad et al., 1998], detectándose que disminuye su producción tanto de los ARNm como de proteínas en el caso de los macrófagos en murinos activos por LPS/IFN- $\gamma$  (interferón- $\gamma$ ). En concreto, se detectó que la disminución se debía a varias consecuencias desencadenadas por la presencia de la melatonina, como son: la disminución de la nitración de I $\kappa$ B- $\alpha$  citosólica y de su degradación, así como la disminución de la translocación de p65/RelA [Zhang et al., 2004]. En relación con esto, Kang et al., (2013) han descrito la capacidad de la melatonina para suprimir el aumento en la expresión de iNOS en macrófagos que fueron estimulados con vistafina. En concreto, determinaron que la melatonina consigue este efecto al inhibir las rutas STAT3 y NF- $\kappa$ B.

Por último, la melatonina ha demostrado su capacidad para prevenir tanto la activación de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) como de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS y que no tenían afectados los niveles de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) [Mayo et al., 2005]. En cuanto a COX-2, sabemos que la melatonina consigue inhibirla a nivel transcripcional al impedir la actividad de la histona acetiltransferasa p300 (HAT p300) con lo que se para también la unión, la transactivación y la acetilación de p52 [Deng et al., 2006].

#### Neutrófilos:

Se sabe que la administración in vivo de melatonina tras la realización de una pinealectomía aumenta su nivel circadiano lo que se asocia con la capacidad de esta

molécula para mantener la fagocitosis en los neutrófilos [Hriscu, 2005]. De hecho, se ha detectado la relación existente entre el ritmo circadiano de la melatonina y la capacidad fagocítica de los heterófilos en ratas y la tórtola rosigrís doméstica (*Streptopelia risoria*) [Rodríguez et al., 1999, Hriscu et al., 2002, Terron et al., 2004]. Detectándose, además, el descenso de células blancas cuando estas aves son sometidas a pinealectomía, así como también la alteración del proceso fagocítico [Rodríguez and Lea, 1994b]. Además, en estudios de paloma torcaz se ha demostrado la capacidad de la melatonina para inhibir la producción de la enzima SOD [Rodríguez et al., 1998]. Del mismo modo, en estudio en ratas se ha constatado la capacidad de la melatonina para impedir la pérdida de la actividad del enzima glutatión reductasa [Sewerynek et al., 1996].

Por otro lado, Ren et al. (2017) en estudios de pez cebra, han demostrado que mediante la melatonina endógena producida por los neutrófilos pueden promover sus migraciones rítmicas al inducir la producción de la IL-1 $\beta$  y la IL-8.

#### Natural killers:

En este tipo celular, en humanos, se ha detectado la presencia de los receptores nucleares de la melatonina, la presencia de la enzima HIOMT y del receptor MT1 [Pozo et al., 2004]. Cuando la melatonina se acompaña de IL-2, aumenta la presencia de NK en pacientes con cáncer [Lissoni et al., 1992, Lissoni et al., 1993] y en parte, el aumento de sus funciones se debe a la producción de citoquinas por las células T que también son estimuladas por melatonina [Lissoni et al., 1998, Currier et al., 2000]. En animales pinealectomizados, la melatonina consigue restablecer la actividad de las NK, así como restablecer las incapacidades de su respuesta inmune [Del Gobbo et al., 1989], a pesar de que en humanos suprime la actividad de este tipo celular [Lewinsky et al., 1989].

En animales pinealectomizados, la melatonina consigue restablecer la actividad de las NK, así como restablecer las incapacidades de su respuesta inmune [Del Gobbo et al., 1989], a pesar de que en humanos suprime la actividad de este tipo celular [Lewinsky et al., 1989].

#### Eosinófilos:

Se ha determinado que, en cultivos celulares de médula ósea en ratas la melatonina afecta a la ritmicidad circadiana en la proliferación de las células de colonias formadoras de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) en función de cuando se realizó la pinealectomía o se sustituyó a la melatonina [Haldar et al., 1992].

#### Mastocitos:

Chen et al., en 1998, mediante análisis de expresión génica (SAGE)

demonstraron la expresión de los genes de la melatonina tanto en mastocitos RBL-2H3 (una línea celular de mastocitos de rata) activos como no activos. En línea con este dato y también en cultivos de RBL-2H3 se ha demostrado ante estimulación química el aumento en la presencia de los receptores de melatonina MT1 y MT2, así como un ascenso en los niveles de síntesis de la melatonina y, por tanto, los enzimas AA-NAT y HIOMT, necesarias para su síntesis, activas [Maldonado et al., 2009].

Así, también, se ha constatado la presencia de ambos receptores en mastocitos localizados en los testículos de humanos [Rossi et al., 2014]. En el caso de las ratas, se detectan grandes poblaciones de mastocitos en todos los órganos linfoides [Ozkanlar et al., 2015]; y varios autores han descrito la presencia de los receptores MT1 y MT2 en dichos órganos incluyendo el timo y el páncreas [Calvo et al., 1995; Sánchez-Hidalgo et al., 2009]. A su vez, en aves se han detectado en la bolsa de Fabricio (órgano linfóide primario); hecho que podría ser indicativo de que la función llevada a cabo por la melatonina, a través de dichos receptores, estaría relacionada tanto con la regulación de los linfocitos, como con la respuesta inmune [Calvo et al., 1995].

Cabe destacar que esta molécula interfiere en la diferenciación y/o proliferación de este tipo celular mediante los receptores de estrógenos, *in vivo* o *in vitro*, en el tejido testicular de la especie *Rana esculenta*. En sí, produciría la activación de los receptores de estrógenos y desestabilizaría la unión de los compuestos estradiol-estrógeno a los mismos [Izzo et al., 2004]. A su vez, la melatonina protege frente a la degranulación mastocitaria generada ante una situación de estrés [Çikler et al., 2005].

#### 1.2.5.2-Mecanismos de actuación vía receptor independiente

##### Monocitos:

Cuando este tipo celular, en ratones, se ha tratado con melatonina exógena se detectado la estimulación de su producción en órganos como la médula ósea y el bazo [Currier et al., 2000]. Cabe destacar que en el caso de otras moléculas su función es inhibidora como ocurre con la IL-10 [Lissoni et al., 1996] o la producción de TNF- $\alpha$  en monocitos humanos [Fjaerli et al., 1999]. Sin embargo, y a través de la PKC, la melatonina consigue activar y estimular la producción de IL-1 [Morrey et al., 1994].

Varios autores han demostrado la capacidad de la melatonina para producir ROS en monocitos [Morrey et al., 1994]. Por otro lado, se ha descrito su capacidad antioxidante al disminuir ROS, siendo un ejemplo de ello su capacidad para depurar el peróxido de hidrógeno [Romero et al., 1999].

Asimismo, se ha descrito también su capacidad para interactuar con la

proteína intracelular calmodulina. En concreto, en esta investigación se sugiere que es la interacción melatonina-calmodulina la que le permitiría a la melatonina tanto inducir como inhibir la producción de ROS [Radogna et al., 2009a]. En sí, en el proceso descrito se defiende que dicha unión produce la liberación de calcio independiente de PLA<sub>2</sub> y, posteriormente, la enzima viaja hasta la membrana punto en el que libera ácido araquidónico que por acción de la 5-lipoxigenasa produce radicales libres [Radogna et al., 2009b].

### Células dendríticas:

Se conoce la capacidad estimulante de la melatonina en la producción y liberación de la IL-12 en este tipo celular, la cual a su vez inhibe la producción de melatonina [Lissoni, 1999].

### Macrófagos:

Ante la estimulación con melatonina, se genera el aumento en la producción IL-12 tanto en la línea celular de monocitos mieloides (THP-1) como en macrófagos activados por LPS [Cutolo et al., 1999]. La melatonina, también, disminuye la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos humanos y de ratón [Lissoni et al., 1994, Shin et al., 2000]. En diferentes casos de macrófagos activados con LPS y en presencia de melatonina se ha detectado que disminuye la producción de IL-12 [Cutolo et al., 1999], la producción de TNF- $\alpha$  mediada por TLR3 en macrófagos activados por el virus RAW 264.7 [Huang et al., 2008] o la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10 mediada por TLR4 activados por LPS [Xia et al., 2012]. Sin embargo, ni en murinos ni en ratas el pretratamiento con melatonina afectó a la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ni de IL-6 en sus macrófagos activados [Williams et al., 1998, Shafer et al., 2001]. Por otro lado, y debido a la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 junto con el incremento de la expresión de las moléculas de clase II del MHC por parte de macrófagos tras administrárseles melatonina, éstos aumentaron su capacidad de actuar como célula presentadora de antígenos a los linfocitos T [Pioli et al., 1993]. Así también, Cheng et al. (2017) al estudiar exosomas derivados de carcinoma hepatocelular tratados con melatonina han detectado la atenuación de la alta expresión de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ ) que se detecta en los exosomas que no han sido tratados con melatonina en macrófagos.

La reducción de la actividad del factor NF- $\kappa$ B mediada por la melatonina se ha detectado en una amplia variedad de tejidos y órganos como son: células T [Pedrosa et al., 2010], neuronas [Chang et al., 2012], hígado [Bruck et al., 2004], riñón [Ozbek et al., 2009], pulmón [Shang et al., 2009] y corazón [Veneroso et al., 2009]. Además, conviene subrayar que en estudios con macrófagos RAW264.7 es precisamente el factor NF- $\kappa$ B a través de la inducción de la actividad de AA-NAT genera síntesis de melatonina que les permite su modulación autocrina [Muxel et al., 2012]. Igualmente, se ha descrito la capacidad del forbol-12-miristato-13-acetato

(PMA), el IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y el LPS para regular la síntesis de melatonina a partir de triptófano en macrófagos peritoneales de rata [Martins et al., 2004].

A su vez, y gracias a la capacidad antioxidante de la melatonina se ha demostrado que puede reducir la formación de peroxinitrito y prevenir los daños a nivel del DNA, en modelos de ratas con shock no tóxico [Cuzzocrea et al., 1998a] o en macrófagos J774 [Gilad et al., 1997; Bagchi et al., 2001]. Además, esta capacidad también le permite proteger, en cultivos U937 sometidos a radiación UV-B, la estructura y función mitocondrial lo que genera en una protección frente a la apoptosis [Luchetti et al., 2006]. De manera contraria, Albertini et al., (2006) al estudiar cultivos de U937 han demostrado que la melatonina a pesar de no modificar la actividad de la glutatión deshidrogenasa muestra actividad pro-oxidativa.

Por último, Muxel et al., (2016) han descrito que la melatonina administrada exógenamente trabaja junto con la sintetizada por las células del sistema inmune en el control de la fase de resolución de la inflamación. Recientemente, Liu et al., (2017) han descrito un posible rol nuevo para la melatonina ya que parece establecer comunicación entre adipocitos y macrófagos, así como aliviar la inflamación metabólica.

#### Neutrófilos:

En diferentes estudios con neutrófilos humanos, se ha demostrado que la presencia de melatonina reduce la producción de anión superóxido [Fischer et al., 2001; Bouhafis and Jarstrand, 2002]. También se ha detectado la disminución de la producción de anión superóxido en neutrófilos estimulados con el compuesto forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), siendo en este caso una reducción dependiente de dosis [Perianayagam et al., 2005]. Del mismo modo, se ha demostrado la capacidad de la melatonina para inhibir la producción de anión superóxido en estudios de paloma torcaz [Rodríguez et al., 1997; Rodríguez et al., 1998; Rodríguez et al., 2001], cuyos niveles correlacionan con el ritmo circadiano en la producción de melatonina [Rodríguez et al., 1999].

Por otro lado, en relación con los roles desarrollados por los neutrófilos durante la inflamación local se ha demostrado que la melatonina es capaz tanto de reducir la permeabilidad vascular que induce el leucotrieno B4 [Lotufo et al., 2006] así como de impedir la eliminación de la L-selectina [Recchioni et al., 1998]. Además, en estudios en ratas la melatonina ha sido capaz de neutralizar la presencia de glutatión reducido y, a la vez, aumentar la presencia del glutatión oxidado [Sewerynek et al., 1996]. En estudios basados en el mismo modelo experimental, se determinó su capacidad para reducir la formación de peroxinitrito [Cuzzocrea et al., 1998b]. Por otro lado, y en modelos de peritonitis inducida por shock séptico disminuye los niveles de NO en plasma, la concentración de IL-1 $\beta$  y los niveles aórticos de anión superóxido [Wu et al., 2008]. En estudios sobre pielonefritis, la melatonina revertió

las alteraciones histopatológicas asociadas como otros efectos de dicha patología como son el incremento en la producción de ROS o los niveles altos de TNF- $\alpha$  detectados en suero [Sener et al., 2006]. Por otro lado, cabe destacar que en modelos de experimentación en ratas y ratones para el estudio de daño pulmonar debido a radiación la melatonina inhibe la infiltración de los neutrófilos [Serin et al., 2007; Genovese et al., 2005]. A su vez, cabe destacar que entre los efectos desarrollados por la melatonina en los diferentes modelos de experimentación estudiados se encuentra su capacidad para regular la producción de mediadores inflamatorios entre otros efectos [Calvo et al., 2013]. En humanos, la melatonina es capaz de aumentar la expresión de quimiocinas [Peña et al., 2007]. A su vez, la melatonina puede actuar junto con su metabolito AFMK y en este caso, disminuye la actividad antimicrobiana de estas células [Silva et al., 2006] y la producción de TNF- $\alpha$  e IL-8 en humanos estimulados con LPS [Silva et al., 2004]. Por último, cabe destacar que la melatonina aumenta la producción de ROS en células tumorales para que desencadenen el proceso de apoptosis mientras que en el caso de células sanas previene el desarrollo de este proceso [Bejarano et al., 2011].

Recientemente, Yi and Kim (2017) en estudios sobre inflamación inducida por estrés han constatado que la melatonina es capaz mediante la upregulación de la expresión proteica de STAT3 reducir la inflamación al inducir el cambio del fenotipo M1 al M2 en los macrófagos estudiados.

En humanos, la melatonina ha conseguido retrasar la apoptosis de neutrófilos en casos de pancreatitis aguda y alivió la inducción de su apoptosis al ser estimulados con calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [Chen et al., 2005, Espino et al., 2010a]. Siendo capaz de retrasar el estrés del RE inducido por la apoptosis del neutrófilo [Espino et al., 2011].

#### Eosinófilos:

En estudios de asma en ratas, se ha detectado que la melatonina disminuye la presencia de eosinófilos [Wang et al., 2004]; mientras que en estudios de casos de poliposis nasal se describe un aumento tanto del nivel de síntesis de la melatonina, así como del número de eosinófilos [Evsiuskova et al., 2008]. Cabe destacar que, en humanos, se ha identificado la presencia de melatonina en eosinófilos en la submucosa estomacal [Kvetnoy et al., 1999].

#### Mastocitos:

Kvetnoy and Yuzhakov (1997) explican que se ha constatado la presencia de la melatonina en este tipo celular. A su vez, se ha demostrado que tras la degranulación de las células enterocromoafines e inmunopositivas (EC) se detecta una fuerte reacción inmunopositiva a melatonina en los mastocitos; sugiriéndose que, dichas células, en estos puntos absorben la melatonina hacia el citosol.



Cabe destacar la disposición de mastocitos activos en la zona localizada entre el borde de los tumores y los tejidos sanos circundantes, y que esta disposición junto con la acumulación de melatonina y serotonina les permite crear un campo protector alrededor de los mismos. Por ello, Kvetnoy et al., proponen que la melatonina ejerce su citoprotección al igual que lo hace la serotonina, puesto que es su metabolito directo, así como a través de la neutralización de radicales libres. Según sus experimentaciones, los mismos autores proponen una función hormonal para la melatonina en desórdenes homeostáticos [Kvetnoy et al., 1997].

Por otro lado, diferentes autores han hecho referencia a la capacidad de penetrar a través de las membranas celulares de la melatonina debido a su capacidad lipofílica, así como han hecho referencia a su capacidad para neutralizar radicales libres [Reiter et al., 1995]. Para mejorar el conocimiento sobre los mastocitos, en estos aspectos, se suelen usar las células RBL-2H3, las cuales expresan los genes necesarios para la síntesis de la melatonina [Chen et al., 1998].

#### Natural killers (NK):

En ratones, la administración de melatonina produce aumento en la actividad de las células NK [Tian et al., 2003] incluso, cuando se dan condiciones de inmunotoxicidad por cadmio [Kim et al., 2000a] y plomo [Kim et al., 2000b]. Pudiéndose asociar el aumento de este tipo celular con la capacidad oncostática de la melatonina [Srinivasan et al., 2008].

### **1.3-RELACIÓN MELATONINA Y MASTOCITOS**

#### 1.3.1-Receptores MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub>, MT<sub>3</sub> en los mastocitos.

Los mastocitos presentan en su membrana periférica los receptores de melatonina MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> [Maldonado et al., 2009]. Estos receptores de melatonina pudieron ser localizados e identificados mediante el uso del compuesto 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonina (<sup>125</sup>-Mel) [Laudon and Zisapel, 1986, Pang et al., 1993, Morgan et al., 1994] proveniente de un potente agonista de la melatonina que es la 2-iodomelatonina. En concreto, fue el uso de métodos autorradiográficos para la detección de la <sup>125</sup>-Mel la técnica usada para determinar su distribución en los tejidos [Duncan et al., 1989]. En el caso de los mamíferos, se detectó alta afinidad por dicho compuesto en el sistema nervioso central (SNC) y en *Pars tuberalis* (PT) [Weaver et al., 1993], y también en un amplio número de estructuras periféricas pertenecientes a los sistemas gastrointestinal, cardiovascular e inmune y en órganos tales como: hígado, pulmón, próstata, células sanguíneas y granulosa [Song et al., 1995, Yie et al., 1995, Mahle et al., 1997, Paul et al., 1999, Guerrero and Reiter, 2002, Yau et al., 2002].

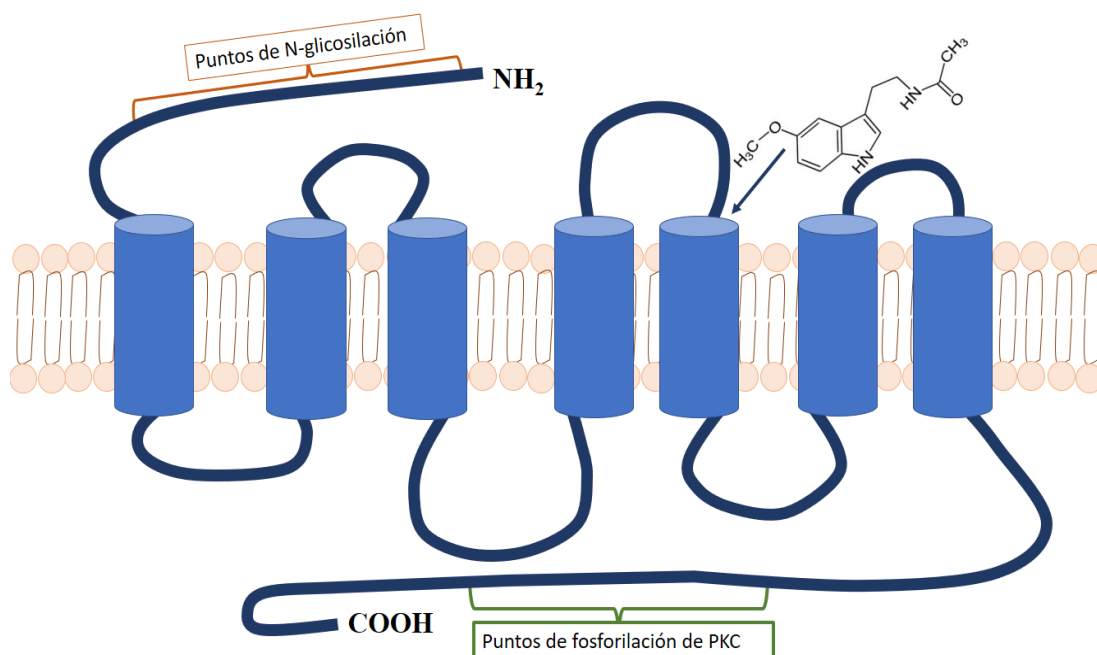
Cabe destacar, que la clonación del primer receptor de alta afinidad para la

melatonina se obtuvo usando ARNm de una línea inmortal de melanóforos de la especie *Xenopus laevis* [Ebisawa et al., 1994], cuyo cDNA codifica una proteína con 420 aminoácidos que presenta los 7 dominios transmembranas característicos de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Posteriormente, se identificaron los tres subtipos de receptores de melatonina (Mel<sub>1a</sub>, Mel<sub>1b</sub>, Mel<sub>1c</sub>); al clonarlos se usaron métodos basados en la homología [Reppert et al., 1994, 1995a, 1996]. De hecho, la clonación de los receptores de melatonina en diferentes genomas permitió determinar que en el caso de los mamíferos sólo se expresan dos de estos tres receptores, concretamente: Mel<sub>1a</sub> y Mel<sub>1b</sub>; sin embargo, para el caso de Mel<sub>1c</sub> se detectó en anfibios, aves y peces [Reppert et al., 1995b]. Cabe destacar que en el caso de los mamíferos estos receptores se expresan en una amplia variedad de tejidos periféricos y tipos celulares [Pang et al., 1993, Pozo et al., 1997, Dubocovich et al., 1998, Ting et al., 1999, García-Mauriño et al., 2000, Musshoff et al., 2002, Karasek et al., 2002, Soares et al., 2003, Slominski et al., 2004, Naji et al., 2004, Anisimov y Popovic, 2004, Tomas-Zapico et al., 2005, Sallinen et al., 2005], donde los receptores MT<sub>1</sub> se encuentran principalmente en las estructuras cerebrales y el subtipo MT<sub>2</sub> se ha descrito en la retina, SCN, hipocampo y algunas partes del cerebelo.

En la actualidad, los receptores de melatonina reciben una nomenclatura diferente que es MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> y MT<sub>3</sub>; aunque éstos últimos no son contemplados por la nomenclatura IUPHAR porque se encuentran en grupos de animales no mamíferos, tales como: anfibios, peces y aves [Reppert et al., 1995b].

La estructura molecular de los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> muestra que están asociados a proteínas G, así como que son mediadoras en la inhibición del enzima adenilato ciclasa [Masana and Dubocovich, 2001]. Concretamente, la secuencia de aminoácidos del MT<sub>1</sub> está formada por 350 aminoácidos con un peso molecular de unos 40 KDa; y la del MT<sub>2</sub> tiene 362 aminoácidos. Encontramos una diferencia más ya que ambos receptores presentan diferente número de sitios de glicosilación presentes en su extremo N-terminal, que son 2 para el MT<sub>1</sub> y sólo uno en los receptores MT<sub>2</sub>. En cuanto a sus semejanzas, podemos encontrar, diferentes regiones que pueden ser fosforiladas por una serie de enzimas entre las que se comprenden: PKC, creatinas quinasas 1 y 2 (CKI y CK2) y PKA; regulándose con ello, su función [Navajas et al., 1996].

Como se muestra en la figura 13, en ambos heterómeros están presentes siete hélices transmembrana (TM I-VII) que están unidas por tres lazos extracelulares (EL<sub>1-3</sub>) y tres lazos intracelulares (IL<sub>1-3</sub>); donde el extremo N-terminal es de vital importancia tanto para su transporte como para su inserción en la membrana plasmática [Barrett et al., 2003]. Cabe destacar, que existe una diferencia en su estructura molecular a nivel de la cremallera de leucina presente en el TM IV, ya que en el caso del receptor MT<sub>1</sub> presenta 7 leucinas, mientras que son 6 los residuos de leucina presentes en el receptor MT<sub>2</sub> a este nivel [Dubocovich et al., 2003].



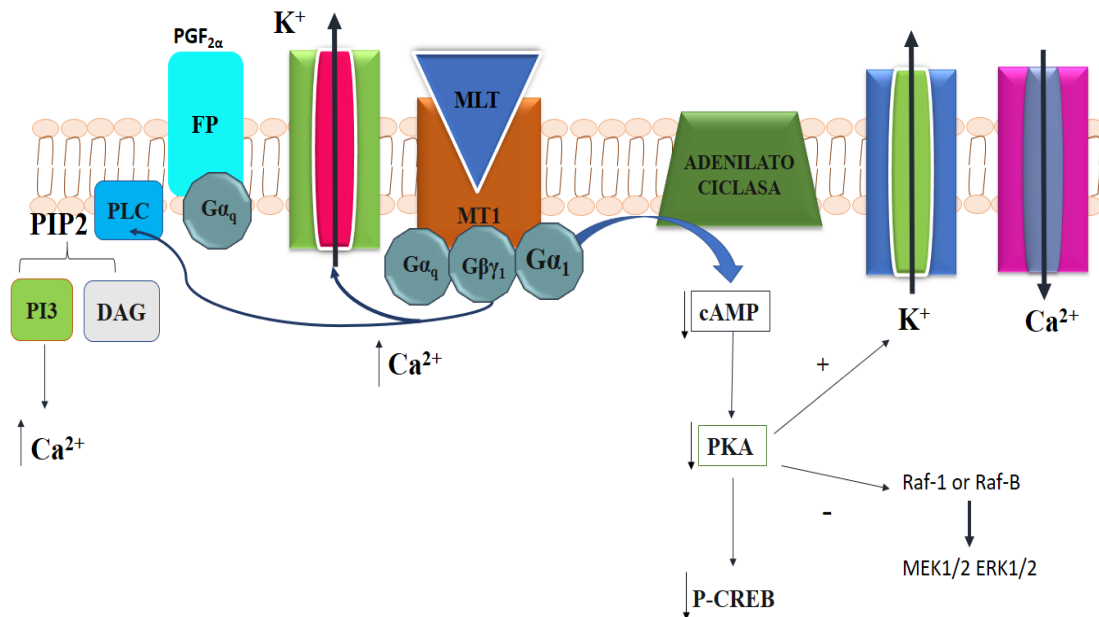
**Figura 13.- Esquema de la estructura de los receptores de melatonina MT1 y MT2.** Como se muestra en la figura, ambos heterómeros presentan siete hélices transmembrana (TM I-VII) unidas por tres lazos extracelulares (EL<sub>1-3</sub>) y tres lazos intracelulares (IL<sub>1-3</sub>); donde el extremo N-terminal es de vital importancia para su transporte y su inserción en la membrana plasmática. Destacamos, la existencia de una diferencia a nivel de la cremallera de leucina presente en el TM IV, ya que en el caso del receptor MT1 presenta 7 leucinas, mientras que son 6 los residuos de leucina presentes en el receptor MT2.

Por otro lado, a pesar del hecho de que ambos heterómeros son receptores pertenecientes a la superfamilia de los GPCRs, no muestran motivos muy conservados como ocurre con el motivo D/ERY; mostrando en su lugar un motivo NRY.

Pickering and Niles, en 1990, fueron los primeros en describir el sitio de unión en los receptores MT<sub>3</sub>, que, posteriormente, fue confirmado por Paul y cols., en 1999. Los receptores MT<sub>3</sub> no están acoplados a proteínas G y éstos median la unión entre la melatonina y la enzima quinona reductasa (QR<sub>2</sub>) [Nosjean et al., 2001], la cual no presenta función detoxificante [Long et al., 2002]. Se ha determinado su papel en el desarrollo de la respuesta inflamatoria al impedir la adhesión entre leucocitos y células endoteliales [Lotufo et al., 2001], inducida por la melatonina.

La figura 14, muestra la ruta de transducción de la melatonina a través de sus receptores MT<sub>1</sub>. En ella, la unión de la melatonina lo activa a través de proteínas G (G<sub>αq</sub>, Gβγ<sub>1</sub>, Gα<sub>1</sub>) produciéndose, tras ello, el descenso en la fosforilación de la proteína CREB puesto que disminuye la actividad de PKA como consecuencia de la

inhibición de la síntesis de AMPc llevada a cabo por la enzima adenilato ciclasa [Masana and Dubocovich, 2001, Dubocovich et al., 2003].

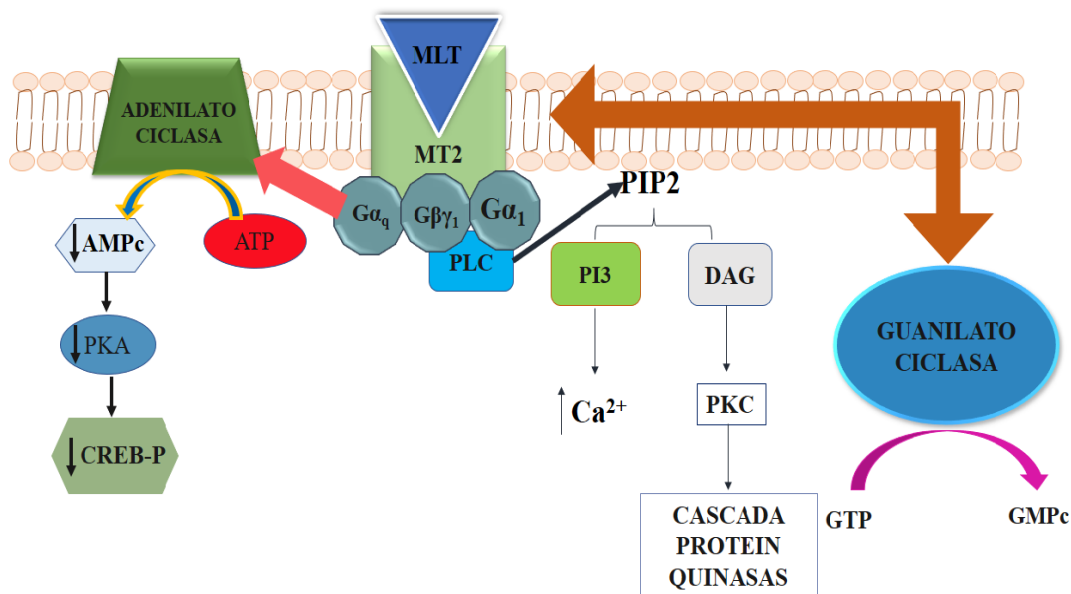


**Figura 14.- Representación esquemática de la vía de señalización de la melatonina mediada por sus receptores MT1.** En esta ruta, la unión de la melatonina produce la activación del receptor MT1 a través de las proteínas G ( $G_{\alpha_q}$ ,  $G_{\beta\gamma_1}$ ,  $G_{\alpha_1}$ ), lo que produce el descenso en la fosforilación de la proteína CREB debido a que desciende la actividad de PKA, porque se ha inhibido la síntesis de AMPc llevada a cabo por la enzima adenilato ciclasa. A su vez, se produce el aumento del calcio intracelular a consecuencia de la activación de la PLC $\gamma$  y su producción de IP $_3$ . Cabe destacar que, tanto la activación de PLC $\gamma$  como la liberación del ácido araquidónico, en esta ruta, se ven afectados por la potenciación del efecto de la prostaglandina F $_{2\alpha}$  a través de las subunidades de las proteínas G. También, a través de las proteínas G $_i$ , G $_0$  y G $_{i\beta\gamma}$  se modula la actividad de los canales de potasio que son activados por calcio. Imagen adaptada de Dubocovich et al., 2003.

Detectándose, además, el aumento del calcio intracelular a consecuencia de la activación de la PLC $\gamma$  y su producción de IP $_3$ , que lo moviliza, al hidrolizar al fosfoinositol [Brydon et al., 1999, Roka et al., 1999, Mackenzie et al., 2002]. En esta ruta, tanto la activación de PLC $\gamma$  como la liberación del ácido araquidónico se ven afectados por la potenciación del efecto de la prostaglandina F $_{2\alpha}$  a través de las subunidades de las proteínas G. De manera análoga, a través de las proteínas G $_i$  o G $_0$  y G $_{i\beta\gamma}$  se modula la actividad de los canales de potasio que son activados por calcio y, al mismo tiempo, los canales entrantes de potasio rectificadores entrantes asociados a la proteína G (GIRK Kir 3) [Geary et al., 1997, Geary et al., 1998, Nelson et al., 1996]. Adicionalmente, se activa también la ruta JNK a través de proteínas G sensibles e insensibles a la toxina pertúsica, y se produce un aumento

en la fosforilación de la ruta de la MEK1/2 y ERK1/2 [Chan et al., 2002, Witt-Enderby et al., 2000].

En el caso de la activación de los receptores de melatonina MT2 (Figura 15) se produce un descenso del AMPc inducido por la fosfocolina [Reppert et al., 1995a] así como el aumento en la hidrólisis del fosfoinositol [Mackenzie et al., 2002]; y, además, a través de este mecanismo de acción se produce la activación de la ruta de JNK [Chan et al., 2002].



**Figura 15.- Representación esquemática de la vía de señalización de la melatonina mediada por sus receptores MT2.** En esta ruta se produce un descenso del AMPc inducido por la fosfocolina y el aumento en la hidrólisis del fosfoinositol. Imagen adaptada de Dubocovich et al., 2003.

### 1.3.2-Receptores nucleares ROR/RZR:

Forman una familia que agrupa seis receptores nucleares de melatonina, que son: ROR $\alpha_1$ , ROR $\alpha_2$ , ROR $\alpha_3$ , ROR $\alpha$ , RZR $\beta$  y RZR $\gamma$  [Becker-Andre et al.,1994; Carlberg et al.,1994; Giguere et al.,1994; Hirose et al.,1994]. Aunque se nombren de manera diferente, en todos los casos se trata del mismo receptor nuclear que presentaría al menos cuatro isoformas diferentes según sea el procesamiento del ARNm precursor común a partir del cual se originan [Giguere et al.,1994]. Asimismo, teniendo en cuenta el patrón característico para la expresión de estos receptores se puede proponer que cada subtipo realiza funciones diferentes que están, a su vez, relacionadas con los mecanismos de control génico específico de diferentes tipos celulares. Dicho lo anterior, podemos determinar que se expresan en el SNC los

receptores RZR/ROR $\alpha$  y RZR $\beta$ ; disponiéndose este último en las siguientes zonas: núcleo supraquiasmático, retina y glándula pineal. A su vez, cabe destacar que la expresión de RZR $\beta$  sigue ritmos circadianos por un mecanismo regulado mediante AMPc [Baler et al., 1996; André et al., 1998]. Por otro lado, los niveles más altos de RZR/ROR $\alpha$  se detectan en la piel y en leucocitos de sangre periférica [Becker-Andre et al., 1994]. Por último, el receptor RZR $\gamma$  se dispone, principalmente, en el músculo esquelético, aunque se haya encontrado en otros órganos como: timo, páncreas, hígado, corazón, etc. [Hirose et al., 1994].

Se definen como receptores nucleares localizados en el interior nuclear lo que les permite unirse a la región reguladora presente en algunos genes. Entre sus ligandos se encuentra la melatonina y varios compuestos pertenecientes a la familia de las tiazolidinonas, los cuales podrían actuar tanto como agonistas y como antagonistas nucleares de la melatonina [Missbach et al., 1996]. Su actividad se regula por su ligando y, también, por las proteínas quinasas. En sí, su actividad se vería potenciada por la proteína quinasa IV dependiente de Ca<sup>2+</sup>/CaM [Kane and Means, 2000]. Es decir, que tras la unión de su ligando específico se produce su activación pudiendo así regular la actividad de la ARN polimerasa II, en una actuación conjunta con factores de transcripción generales.

### 1.3.3-Enzimas en el mastocito para la síntesis de melatonina.

Se ha detectado la presencia de la melatonina en cultivos de mastocitos tanto estimulados como sin estimular. La cantidad de melatonina detectada, mayor en los cultivos estimulados, indica la activación de su síntesis en los mastocitos. Para ello, es necesario que las enzimas encargadas de su síntesis estén presentes y activas. Así, mediante ensayos para el estudio de actividad enzimática se ha verificado la presencia en mastocitos tanto del enzima AA-NAT como del enzima HIOMT funcionales. Por lo tanto, se demostraría que estas células tienen la maquinaria suficiente para su síntesis [Maldonado et al., 2010]. A su vez, en las membranas de los mastocitos se ha caracterizado la presencia de los receptores MT1 y MT2 lo que, nos puede llevar a la conclusión de que dicha molécula puede tener una función protectora durante el proceso inflamatorio mediante un mecanismo paracrino o autocrino [Maldonado et al., 2010].

**HIPÓTESIS**  
**Y**  
**OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La inflamación es un mecanismo de defensa que el sistema inmune pone en marcha para evitar que seamos colonizados por patógenos. A veces, esta reacción es excesiva o se mantiene en el tiempo, o se genera en contra de sustancias inocuas ó propias, generando lesión en los tejidos donde actúa. En ella intervienen una gran cantidad de células y moléculas destacando como uno de los protagonistas al mastocito, célula que está localizada muy cerca de los vasos sanguíneos y de la interfase organismo-medio ambiente como por ejemplo la piel y las mucosas. Es una célula con capacidad para generar una respuesta inflamatoria potente en muy pocos segundos. La activación del mastocito, por múltiples agentes, es clave en la etiopatogenia de enfermedades inflamatorias donde se ven implicados tanto el sistema inmune innato como el específico, por lo que estrategias dirigidas a la inmunomodulación de su activación podrían ser claves en la recuperación del tejido en el que se está produciendo dicha inflamación.

En esta Tesis se postulan las siguientes hipótesis:

La administración exógena de melatonina mejora la viabilidad celular y la regeneración del mastocito secundario al estímulo químico.

La administración exógena de melatonina inhibe la activación del mastocito reduciendo la síntesis y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6).

La administración exógena de melatonina interviene en la síntesis y liberación de melatonina endógena por el mastocito.

Los objetivos de esta Tesis son:

Analizar el efecto del tratamiento exógeno de melatonina, una molécula inmunomoduladora, sobre la línea celular de mastocitos RBL-2H3 e identificar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a estos efectos y sus implicaciones clínicas.



**MATERIAL**  
**Y**  
**MÉTODOS**

### **3.-MATERIAL Y MÉTODOS:**

#### **3.1-EXPERIMENTOS PILOTO PREVIOS A LA TESIS**

Con anterioridad a la experimentación realizada para esta Tesis comprobamos que la estimulación química con PMACI de los mastocitos resulta más idónea de ejercer que la estimulación inmunológica para la realización final de los experimentos. Los beneficios a destacar de dicha estimulación química, con PMACI, son mayor activación celular, así como tiempos de incubación y manipulación más cortos. Teniendo en cuenta dichas propiedades nos decantamos por la estimulación química para la realización de los mismos.

#### **3.2-MATERIAL BIOLÓGICO**

##### **3.2.1-Línea celular:**

Durante nuestro trabajo usamos la línea celular denominada RBL-2H3 con ATCC: CRL-2256. Estas células, se usan como modelo experimental in vitro de mastocitos [Passante et al., 2009; Funaba et al.,2003; Crivellato et al.,2015]. Es una línea celular de leucemia basofílica aislada y clonada en 1978 en el Laboratorio de Inmunología del National Institute of Dental Research desde células basofílicas de ratas Wistar. Estas células tienen receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI). Pueden ser activadas para secretar histamina y otros mediadores mediante agregación de estos receptores, o por el método químico mediante éster de forbol y calcio ionóforo. La liberación de histamina y otros mediadores vasoactivos las hace muy útiles para el estudio y conocimiento de procesos tales como la inflamación, las alergias o en enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias. A menudo, aparecen referenciadas como mastocitos, aunque cabe destacar que crean cierta controversia dentro de la comunidad científica. Idea sustentada en que se originan a partir de basófilos. Sin embargo, basándonos en el hecho de que poseen características comunes tanto con mastocitos como con basófilos, creemos que son una herramienta útil para llevar a cabo nuestros experimentos.

Todas las manipulaciones de las células fueron realizadas en cabina de flujo laminar vertical y en condiciones de esterilidad.

##### **3.2.2-Procesamiento de la línea celular:**

###### **3.2.2.1-Procedimiento del subcultivo:**

Con este proceso mantenemos las células procedentes del cultivo primario en condiciones óptimas para su estudio, al controlar variables tales como: agotamiento del medio de cultivo, temperatura, nivel de CO<sub>2</sub> o confluencia del cultivo.

###### **Protocolo:**

-Las condiciones de los cultivos fueron temperatura a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El

medio se cambió cada 2-3 días para evitar su agotamiento y antes de añadir el nuevo medio se realizó un lavado con PBS.

-Cuando las células alcanzaron la confluencia se establecieron nuevos subcultivos. Para ello se usó el método de la tripsinización, que permite resuspender las células al tratar al cultivo con: Tripsina/EDTA en proporción 0.25%/0.03%. (Nota: Durante este procedimiento se consigue evitar la aglomeración celular evitando agitar o golpear el frasco de cultivo).

-Los subcultivos fueron re-sembrados en proporción 1:4 hasta 1:8.

#### 3.2.2.2-Procedimiento de congelación:

Con este proceso podemos mantener una reserva de células que, bajo congelación, está en estado latente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las soluciones usadas permiten preservar la integridad de las membranas celulares al enfrentarse al choque térmico de ser congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y, también, en su posterior descongelación.

Se deben preparar dos soluciones:

Solución 1: 70% Suero fetal bovino + 30% medio de cultivo MEME.

Solución 2: 95% de la solución 1 + 5% DMSO.

#### Protocolo:

-Se centrifugan las células RBL-2H3 en tubos de 15 mL. durante 15 minutos a  $400\times g$ , tras ello se retira el sobrenadante y colocamos los tubos boca abajo. El pellet celular se resuspende en  $400\ \mu\text{l}$  de la solución S1 y se pasan a eppendorfs debidamente rotulados.

-Se toman  $400\ \mu\text{l}$  de la solución S2 y se administra, lentamente, gota a gota en el eppendorf. (Nota: Para que el proceso resulte aún más lento se puede tomar  $100\ \mu\text{l}$  y se administra a cada tubo eppendorf hasta completar el volumen de  $400\ \mu\text{l}$ ).

-Los tubos eppendorf se colocan en hielo picado, después a  $-20^{\circ}\text{C}$  y, finalmente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.2.3-Procedimiento de descongelación:

Con este proceso pretendemos conseguir el mayor número de células viables al descongelar las células latentes a  $-80^{\circ}\text{C}$  para establecer los cultivos de las mismas.

#### -Protocolo:

-Se agita el vial de células (el tubo eppendorf que ha estado congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) en el baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta descongelar la suspensión celular.

-Se lava el vial, externamente, con etanol para evitar contaminaciones y se coloca dentro de la campana de flujo laminar. En el mismo tubo eppendorf se administra un poco de medio y se resuspende.

-Se transfiere la suspensión de células a un tubo de centrífuga de 10-15 mL.

-Se añade un volumen igual de medio de cultivo precalentado ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Se

esperan 5 minutos a temperatura ambiente y se añade un volumen igual de medio precalentado y se esperan 5 minutos de nuevo. Repetir este paso hasta completar el volumen del tubo.

-Se centrifugan las células a baja velocidad: 400xg durante 10 minutos.

-Se resuspende el pellet de células en medio de cultivo precalentado y se transfieren a un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

### **3.3-REACTIVOS QUÍMICOS USADOS**

Los diferentes compuestos usados durante la experimentación se obtuvieron en varias casas comerciales. A continuación, relatamos su uso durante la experimentación y los fabricantes de los mismos:

#### **3.3.1-Medio de cultivo:**

Medio DMEM Dulbecco's (modificación del medio BME, que es el medio basal Eagle)

Antibióticos:

- Penicilina (Gibco® BRL, USA).
- Estreptomina (Gibco® BRL, USA).
- Anfotericina B (Gibco® BRL, USA).

L-glutamina (Gibco® BRL, USA).

Suero Fetal Bovino (Gibco® BRL, USA).

#### **3.3.2-Estimulación química:**

Calcio ionóforo A23187 (CI) (Sigma®, St Louis, USA).

Forbol 12-miristato-13 acetato (PMA) (Sigma®, St Louis, USA).

PMACI: PMA  $5 \cdot 10^{-7}$ M + CI  $5 \cdot 10^{-7}$ M.

#### **3.3.3-Preparación de soluciones:**

Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma®, St Louis, USA).

#### **3.3.4-Citoprotección:**

Melatonina (Sigma®, St Louis, USA).

#### **3.3.5-Viabilidad celular:**

3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, ensayo MTT (Sigma®, St Louis, USA).

#### **3.3.6-Inhibición receptores de melatonina:**

Luzindol (Sigma®, St Louis, USA).

#### **3.3.7-Soluciones y tampones:**

##### **-Agua:**

Según los requerimientos de cada protocolo fue: agua destilada, esterilizada

en autoclave o MiliQ.

**-PBS 10x (Tampón fosfato salino) pH7.6:**

Solución usada para el lavado de las células RBL-2H3 en cultivo.

Buffer de fosfato salino de Dulbecco's con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Sigma®, St Louis, USA).

**-Buffer de lisado:**

Tampón usado para lisar las células, así como para, también, solubilizar las proteínas asociadas a sus membranas.

Composición: HEPES (Sigma®, St Louis, USA), EDTA (Sigma®, St Louis, USA), fluoruro sódico, Na PPI,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  qsq, Tritón-X-100 (Sigma®, St Louis, USA), inhibidor de proteasas (Complete mini, Protease inhibitor Cocktail Tablets provided in EASYpack de Roche).

**-Tampón de carga de proteínas para electroforesis SDS-PAGE:**

Tampón que contiene agentes desnaturalizantes presentes para las proteínas que se separarán al ser cargadas negativamente, además, de un agente reductor de puentes disulfuro, junto con un marcador colorante que indica el frente de avance durante la realización de la electroforesis.

Composición: Tris ácido 1M al 25% v/v; Glicerol al 50% v/v; SDS 10% p/v; DTT 100 mM; Azul de bromofenol 0.001% p/v; pH 6,8.

**-Tampón para la electroforesis en gel de poliacrilamida ("running buffer"):**

Solución que permite el desplazamiento anódico, en el gel de poliacrilamida, de las proteínas que, anteriormente, han sido desnaturalizadas y cargadas negativamente.

Composición: Tris-Glicina al 10% v/v; (Tris Base 250mM; Glicina 1,92M); SDS en stock del 20% al 0.5% v/v final.

**-Solución de bloqueo:**

Encargada de bloquear las membranas una vez la transferencia ha sido realizada; evitando, en parte, que se produzcan interacciones inespecíficas entre los anticuerpos primario y secundario. Además, es usado como el medio donde se lleva a cabo la dilución del anticuerpo primario.

Composición: Albúmina 3% p/v.

**-Tampón para la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida:**

Solución que empapa el papel Whatman y la membrana de nitrocelulosa para facilitar la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida.

Composición: Tris-Glicina al 10% v/v (Tris Base 250 mM; Glicina 1,92 M); Metanol 100% al 20% v/v; SDS 20% al 0.2% v/v final.

**-Tampón de lavado PBS-Tween:**

Solución usada tanto para lavar las membranas durante la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida como para los lavados en las incubaciones con los anticuerpos durante el proceso de western blotting.

Composición: PBS 10X con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y detergente Tween al 0.2%.

### **3.3.8-Geles:**

Geles de poliacrilamida de la marca Invitrogen™ (gradiente de 8-16%).

### **3.3.9-Western-Blotting:**

- Marcador de peso molecular de proteínas: Sigma Marker Wide Range MW 6,500-250,00 (Sigma Aldrich®).
- Sistema de detección luminol/peroxidasa. Sistema quimioluminiscente Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific Pierce®).
- Líquido revelador/fijador Ilford® y películas de autorradiografía Hyperfilm ECL (Amersham®).
- Anticuerpo monoclonal de conejo IKK $\alpha/\beta$  (Ser 176/180) (16A6) Cell Signaling Technology.
- Anticuerpo monoclonal para miosina IIa #3403 (Cell signaling Technology).
- Tween 20 (Sigma-Aldrich®, St Louis, USA).
- PBS (Gibco® BRL, USA).
- Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, St Louis, USA).

### **3.3.10-Medición de citoquinas en el sobrenadante:**

- BD OptEIA™ Mouse TNF ELISA Kit.
- BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA Kit.
- Fosfato sódico 0.2M.
- Buffer de lavado: PBS/0.05% Tween 20.
- Tampón de bloqueo: BSA en PBS/Tween 20.

### **3.3.11-Medición de la MELn producida en sobrenadantes:**

- Kit ELISA detector de melatonina (IBL-Hamburg Diagnostic, Germany).

## **3.4-MATERIAL Y APARATOS EMPLEADOS**

### **3.4.1-Material usado:**

- Pipetas Pasteur Copan innovation, LTD.
- Pipetas estériles de plástico de 5 y 10 ml (Greiner bio-one®, Cellstar®).
- Tubos de polipropileno de 15 ml estériles y de 50 ml (BD FALCON™ y Greiner bio-one® CELLSTAR®).
- Tubos estériles DeltaLab S.A. de 15 ml.
- Frascos estériles de 100 ml. Sorian genlab. SA.
- Tubos eppendorf® de 1,5-2 ml.
- Placas Petri estériles 10 ml SARSTEDT S.A.
- Placas de 6 pocillos Nunclon™ Delta Surface.
- Frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> SARSTEDT S.A.
- Parafilm "M", Laboratory Film (American National Can™, Chicago IL).

- Geles Tris-Glicina de poliacrilamida en gradiente de 8-16%, Novex Invitrogen™.
- Papel Whatman®.
- Puntas de plástico para pipetas: blancas, amarillas pequeñas, azules: Greiner bio-one, DIFCO.
- Membrana de nitrocelulosa para la transferencia de proteínas (Amersham ibérica S.A.).
- Cubeta de electroforesis Mini Protean Tetra Cell, de BioRad Inc.
- Cristales y Sistema de geles BioRad Inc.
- Cassette para revelado Gevomatic AGFA® Gevaert.
- Recipientes de cristal para las incubaciones de las membranas con los anticuerpos en los WB.
- Probetas, vasos de precipitados, matraces y otros utensilios necesarios.

### **3.4.2-Aparatos:**

- Campana de flujo laminar vertical TETSTAR AV-100 S.A.
- Baño de incubación: tipo 31AT, 1200W (Heto-Holten A/S).
- Incubador de CO<sub>2</sub> para cultivos celulares (REVCO®).
- Fuente de alimentación para electroforesis y transferencia modelo Amersham Pharmacia Biotech® EPS 301.
- Centrífuga eppendorf Centrifuge 5804R.
- Microcentrífuga refrigerada modelo Biofuge Fresco Heraeus Instruments, aceleración máxima de 16000g (Heraeus Instruments®).
- Sistema de transferencia de proteínas semi-seco (Invitrogen).
- Espectrofotómetro Ultrospec IIE, LKB Biochrom (Amersham Pharmacia).
- Microscopio de luz invertida WILD M-40 HEERBRUGG.
- Medidor de pH de Crison Instruments S.A, modelo Micro pH 2002.
- Termobloque incubador de microtubos (Stuart Scientific®).
- Pipetas automáticas Biopipette® (0.5µL., 2-20µL., 10-200µL. y 100-1000µL).
- Agitador de balanceo S.B.S Instruments S.A.
- Agitador Vortex Heidolph Reax 2000.
- Agitador de placas L.K.B Wallace® 1296-001.
- Autoclave (Raypa SL).
- Balanza Mettler PC 220 Delta Range®.
- Balanza de precisión Sartorius®.
- Centrífuga eppendorf® 5417R.
- Congelador hasta -40 °C REVCO.
- Congelador hasta -80 °C REVCO.
- Detector de fluorescencia LS 40, Perkin Elmer, Buckinghamshire, UK.
- Evaporador de tubos Unijet II Refrigerated Aspirator.
- Fuente de Corriente Biorad Mini-SUB cell GT.
- HP integrador Hewlett-Packard, Palo Alto, CA.
- pH Meter Basic 20 Crison®.

### **3.5-CULTIVOS CELULARES**

Las células RBL-2H3 crecieron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino descomplementado al 15%, L-glutamina 2 mM, así como los siguientes antibióticos: 100 U/ml penicilina, estreptomina 100 µg/ml y anfotericina B (antifúngico). Las condiciones de incubación fueron CO<sub>2</sub> al 5% y la temperatura a 37°C. Las células usadas durante la experimentación se encontraban entre los pases 5 y 10.

### **3.6-PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE MELATONINA Y LUZINDOL**

Las soluciones stock fueron melatonina 1M y luzindol 10 mM. En ambos casos, se prepararon en DMSO y se guardaron, hasta su uso, a -20°C. Posteriormente, antes de ser utilizadas y a temperatura ambiente, se elaboraron las diferentes soluciones para la experimentación. Para ello, se diluyeron las soluciones stock en medio DMEM estéril donde las concentraciones finales de los solventes fueron menores al 0.5%.

### **3.7-DISEÑO EXPERIMENTAL:**

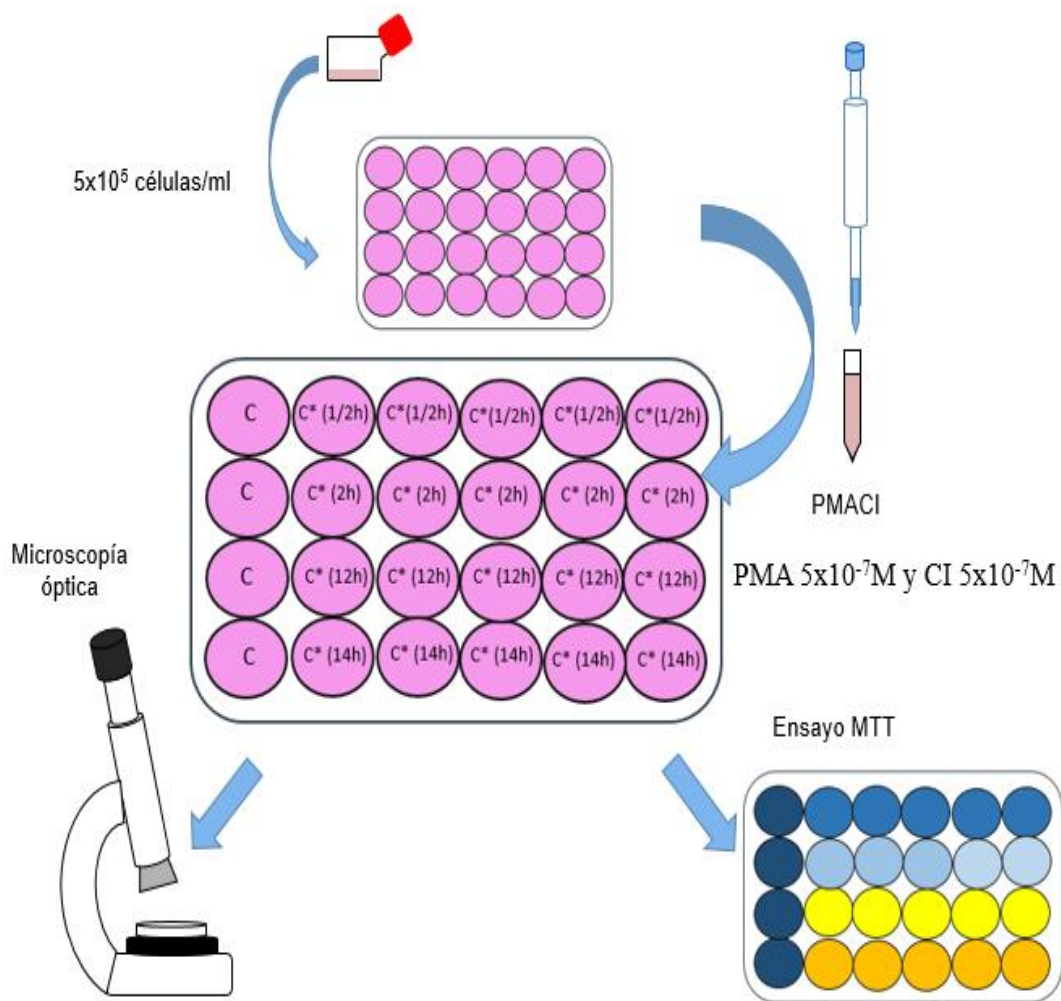
#### **-3.7.1-Activación de los mastocitos:**

Para activar químicamente a los mastocitos RBL-2H3 procedimos a cultivarlos en placas de 24 pocillos y con una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml. En un segundo paso, se usó el compuesto PMACI para generar la estimulación química. Para ello usamos una solución en cultivo de PMA  $5 \times 10^{-7}$ M y CI a  $5 \times 10^{-7}$ M. que se añadió a los pocillos, donde estuvo durante diferentes tiempos 1/2h, 2h, 12h, 14h (Figura 1). A su vez, estudiamos los cambios morfológicos sufridos por las células mediante microscopía óptica y los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como indicador de una correcta estimulación.

#### **3.7.2-Protocolo:**

- Se sembraron las células en placas de 24 pocillos, y con medio DMEM (1ml), hasta que alcanzaron la densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml.
- Se produjo la estimulación química con medio de cultivo y estimulación a las concentraciones de PMA  $5 \times 10^{-7}$ M y CI  $5 \times 10^{-7}$ M.
- Se incubaron las placas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.
- Las células estuvieron sometidas al estímulo químico por periodos de tiempo de: 30 minutos, 2 horas, 12 horas y 14 horas.
- Se estudiaron los cambios morfológicos en las células RBL-2H3 mediante microscopía óptica.
- Se estudió la viabilidad celular usando el ensayo MTT.

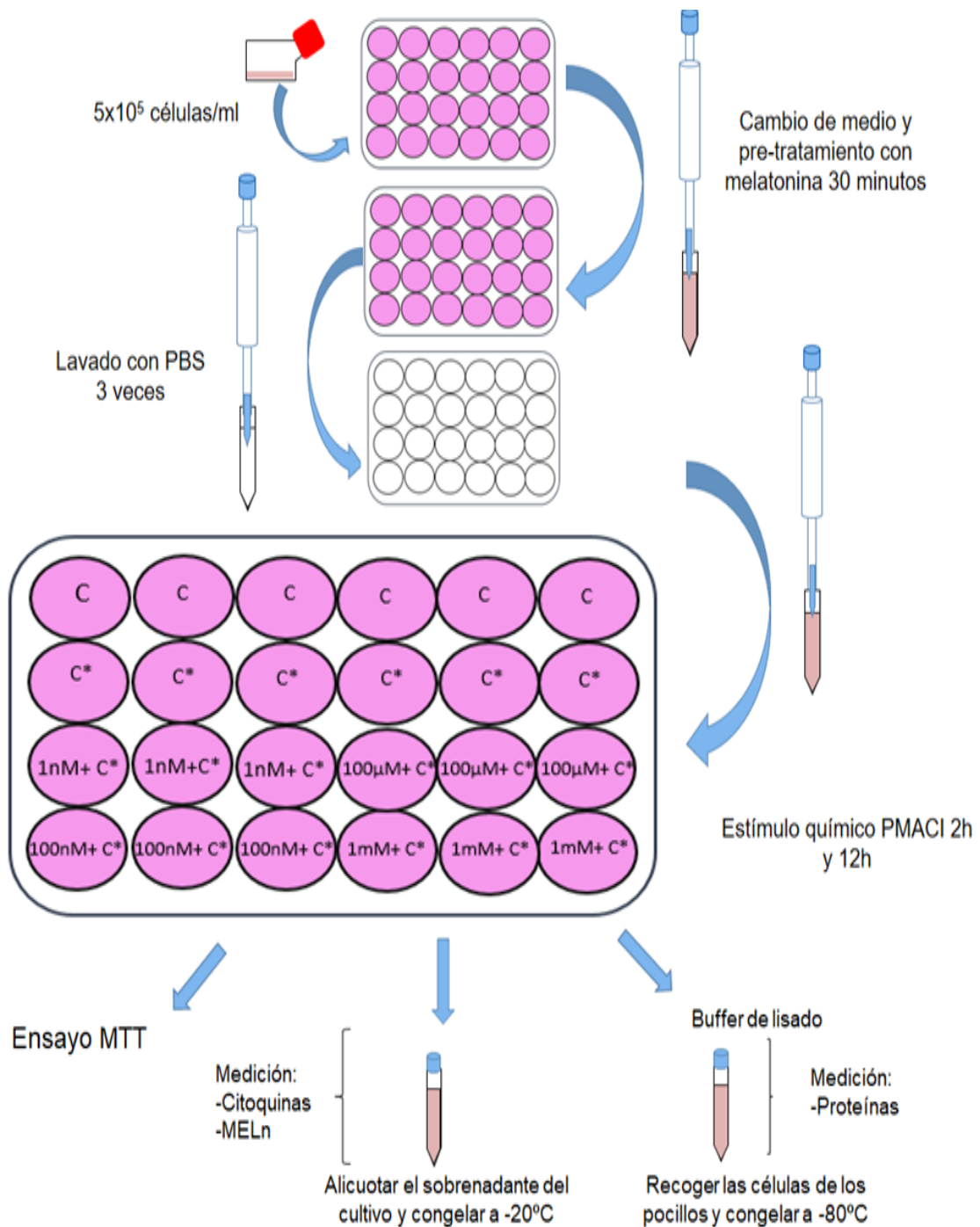




**Figura 1. Esquema del diseño experimental para estudiar la activación de los mastocitos RBL-2H3.** Los mastocitos fueron cultivados con 24h de antelación en una placa de 24 pocillos en medio DMEM (1ml). Tras alcanzar una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml procedimos a añadir el estímulo químico (PMACI) en diferentes tiempos de estimulación: 1/2h, 2h, 12h y 14h; excepto en los pocillos control (sin estimulación). La viabilidad celular se estudió mediante ensayo MTT y los cambios morfológicos mediante microscopía óptica.

### **3.8-ANÁLISIS DE LA CITOPROTECCIÓN MEDIADA POR LA MELATONINA**

Para estudiar el papel de la melatonina en los cultivos, procedimos a realizar un pre-tratamiento durante 30 minutos con melatonina (MELx) tanto a concentraciones fisiológicas (1 nM y 100 nM) como farmacológicas (100  $\mu$ M y 1 mM) (Figura 2). Según los resultados que obtuvimos, seleccionamos las concentraciones 100 nM y 1 mM como representante de las dosis fisiológicas y farmacológicas respectivamente, así como los tiempos de estimulación de 2 y 12 h para la experimentación.



**Figura 2. Diseño experimental para estudiar la citoprotección mediada por melatonina.** Las células RBL-2H3 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos con antelación para ser estudiadas, una vez alcanzaran una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml. Los pocillos se cambiaron de medio y, posteriormente, se pre-trataron con melatonina a concentraciones fisiológicas (1nM, 100nM) y farmacológicas (100µM, 1mM) durante 30 minutos. Se estudió la viabilidad celular mediante ensayo MTT. Se alicuotó el sobrenadante y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  para medir citoquinas y melatonina endógena. Las células RBL-2H3 fueron lisadas con buffer de lisado y

*almacenadas a -80°C para estudiar las proteínas.*

#### 3.8.1-Protocolo:

-Se sembraron las células en placas de 24 pocillos, en medio DMEM (1ml), 24h antes para alcanzar la densidad celular deseada de  $5 \times 10^5$  células/ml.

-Se pre-trataron, durante 30 minutos, con melatonina (MELx) en el medio de cultivo a las concentraciones fisiológicas (100nM) y farmacológicas (1mM) seleccionadas.

-Se procedió a la estimulación química (PMACI) durante 2h, y se incubaron las placas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.

-Se alicuotó el sobrenadante en eppendorfs a -20°C para, posteriormente, realizar la medición de citoquinas (TNF- $\alpha$  e IL-6).

-Se produjo la lisis de las células añadiendo 100-200 $\mu$ l de buffer de lisado y se alicuotaron en eppendorfs que fueron almacenados a -80°C para análisis de proteínas citosólicas.

-Posteriormente, se estudió las proteínas mediante Western-Blot.

-Se realizó el ensayo MTT con las mismas condiciones.

### **3.9- EFECTO DEL LUZINDOL (LZD) SOBRE LA CITOPROTECCIÓN EJERCIDA POR LA MELATONINA EXÓGENA (MELx)**

Para estudiar el efecto de LZD sobre la citoprotección ejercida por la melatonina en los cultivos (Figura 3), procedimos a realizar un pre-tratamiento durante 30 minutos con melatonina (MELx) tanto a concentraciones fisiológicas 100 nM como farmacológicas 1 mM y Luzindol 10 $\mu$ M (antagonista no-específico de los receptores de melatonina MT1 y MT2).

#### 3.9.1-Protocolo:

-Se sembraron las células en placas de 24 pocillos, en medio DMEM (1ml), 24h antes para alcanzar la densidad celular deseada de  $5 \times 10^5$  células/ml.

-Se pre-trataron, durante 30 minutos, con melatonina (MELx) en el medio de cultivo a las concentraciones fisiológicas (100nM) y farmacológicas (1mM) seleccionadas.

-Junto al paso anterior, se co-incubaron los pocillos con 10 $\mu$ l de luzindol.

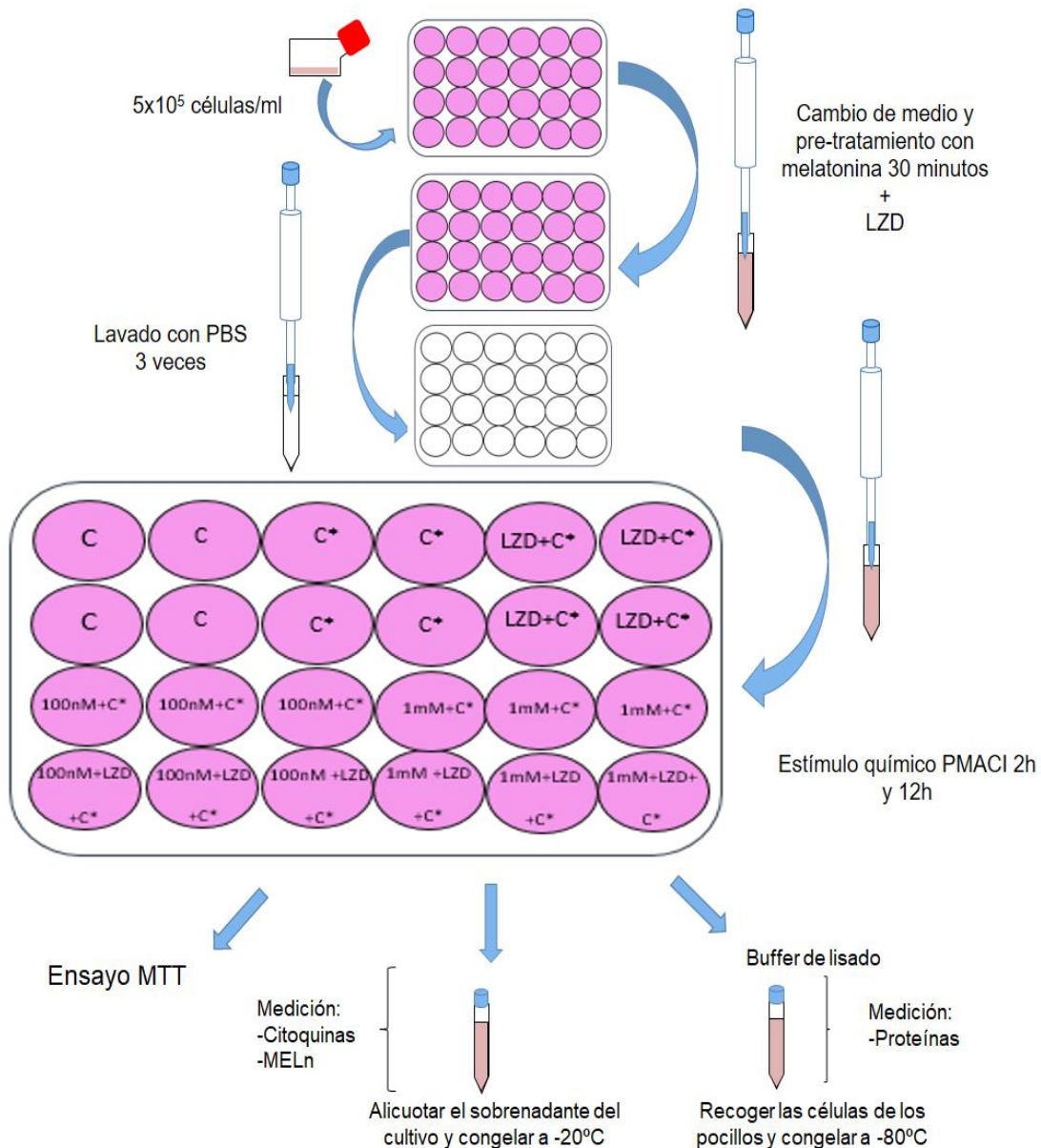
-Se procedió a la estimulación química (PMACI) durante 2h, y se incubaron las placas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.

-Se alicuotó el sobrenadante en eppendorfs a -20°C para analizar las citoquinas.

-Se produjo la lisis de las células añadiendo 100-200 $\mu$ l de buffer de lisado y se alicuotaron en eppendorfs que fueron almacenados a -80°C para análisis de proteínas citosólicas.

-Posteriormente, se estudió las proteínas mediante Western-Blot.

-Se realizó el ensayo MTT en placas las mismas condiciones.



**Figura 3. Diseño experimental para estudiar el efecto de LZD sobre la citoprotección ejercida por MELx en células estimuladas.** Las células RBL-2H3 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos con antelación para ser estudiadas, una vez alcanzaran una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml. Los pocillos se cambiaron de medio y, posteriormente, se pre-trataron con melatonina a concentraciones fisiológicas 100nM y farmacológicas 1mM durante 30 minutos. Además, hubo pocillos que junto al pretratamiento con MELX se les co-incubó con el antagonista LZD. Una vez finalizado, los pocillos se lavaron con PBS 3 veces y se produjo la estimulación química (PMACI) durante 2h. y 12h. Posteriormente, se alicuotó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para medir citoquinas y melatonina endógena. Las células

*RBL-2H3* fueron lisadas con buffer de lisado y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para estudiar las proteínas. Se estudió la viabilidad celular mediante ensayo MTT.

### **3.10-ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR USANDO EL ENSAYO MTT:**

Este ensayo permite conocer la viabilidad celular o supervivencia, así como la proliferación celular mediante la actividad del enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Esta enzima lleva a cabo la reducción metabólica del Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol en un compuesto llamado formazán, que es de color azul violáceo. En este ensayo la producción de formazán es directamente proporcional a la cantidad de células vivas y metabólicamente activas, presentes.

En este ensayo se estudiaron:

-C: células control sin estimular, se tomaron como referencia de viabilidad al 100%.

-C\*: células estimuladas con PMACI.

-MELx 100nM+C\*: células pretratadas con MELx 100 nM dosis fisiológica y estimuladas con PMACI.

-MELx 1mM+C\*: células pretratadas con MELx 1mM dosis farmacológica y estimuladas con PMACI.

-LZD+C\*: células preincubadas con LZD y estimuladas con PMACI.

- MELx100nM +LZD+C\*: células pretratadas con MELx 100nM y preincubadas con LZD 30'; lavadas y estimuladas con PMACI.

-MELx 1mM+LZD+C\*: células pretratadas con MELx 1mM y preincubadas con LZD 30'; lavadas y estimuladas con PMACI.

#### **3.10.1-Protocolo para estudiar la viabilidad según el tiempo de exposición a PMACI:**

-Se sembraron las células en placas de 96 pocillos con una densidad de  $5 \times 10^4$  células/100 $\mu\text{l}$ /pocillo.

-Se incubaron las células con PMACI los siguientes tiempos: 30 minutos, 2h, 12h, 14 h. A una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

-Se lavó cada pocillo tres veces con PBS para limpiar el medio de cultivo.

-Se añadió 100 $\mu\text{l}$  de MTT en cada pocillo.

-Se incubó durante 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

-Se añadieron 100 $\mu\text{l}$  de DMSO para disolver el MTT.

-Se leyó la densidad óptica a 530nm.

#### **3.10.2-Protocolo para estudiar la viabilidad según el pre-tratamiento con MELx-LZD y estimulación con PMACI:**

-Se sembraron las células en placas de 96 pocillos con una densidad de  $5 \times 10^4$  células/100 $\mu\text{l}$ /pocillo.

-Se pretrataron las células durante 30' con MELx, a concentraciones fisiológica

(100nM) y farmacológica (1mM). Así como con LZD obteniéndose las situaciones que se expresa en el apartado 3.10.

- Se lavó cada pocillo tres veces con PBS para limpiar el medio de cultivo.
- Se estimularon las células con PMACI durante 2h y 12h a una temperatura de 37°C.
- Se lavó cada pocillo tres veces con PBS para limpiar el medio de cultivo.
- Se añadió 100µl de MTT en cada pocillo.
- Se incubó durante 4 horas a 37°C.
- Se añadieron 100µl de DMSO para disolver el MTT.
- Se leyó la densidad óptica a 530nm.

### **3.11-MEDICIÓN DE CITOQUINAS EN EL SOBRENADANTE DEL MEDIO DE CULTIVOS. ENZIMOINMUNOANÁLISIS (ELISA)**

TNF- $\alpha$  e IL-6 son citoquinas pro-inflamatorias que se liberan por los mastocitos tras 2h. de estimulación [Maldonado et al., 2010; Lu et al., 2013]. Para determinar sus niveles en los cultivos de mastocitos RBL-2H3 hemos usado un enzimoinmunoanálisis (ELISA) de tipo captura-competición.

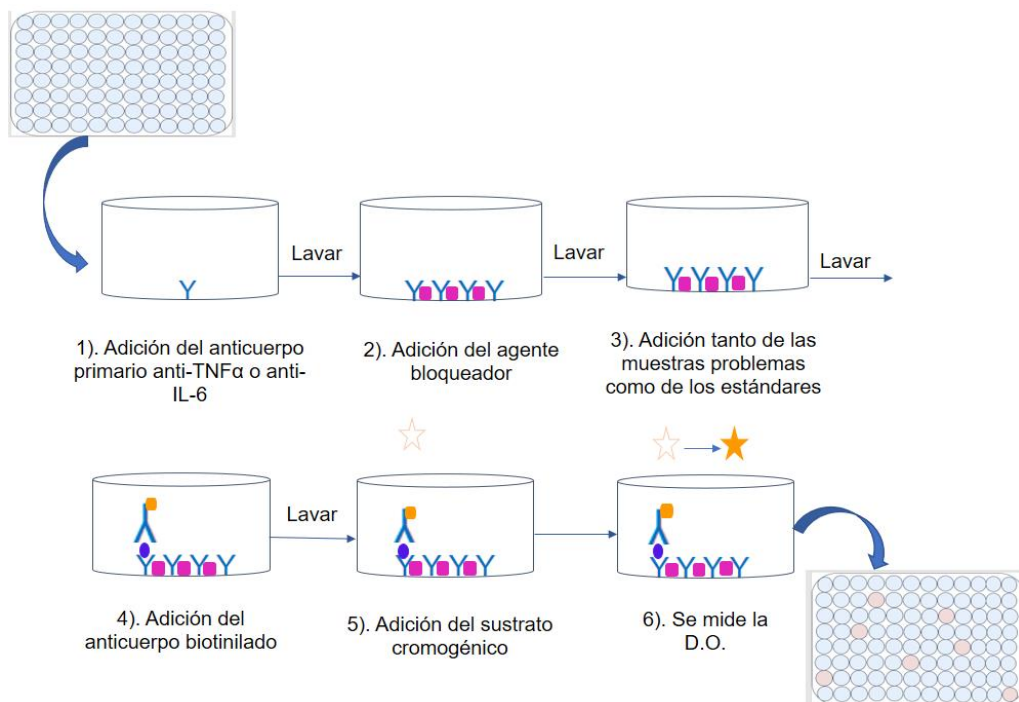
Dicha técnica se basa en el empleo de dos anticuerpos monoclonales específicos frente a dos epítomos diferentes de las citoquinas TNF- $\alpha$  o IL-6, uno de ellos tapizando las placas (anticuerpo de captura) y el otro conjugado con estreptavidina, peroxidasa (anticuerpo detector). Las cantidades de dichas moléculas en las muestras son directamente proporcionales al color producido tras añadir el compuesto tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno que es el sustrato del enzima conjugado (Figura 4). Para cuantificar la concentración de ambas citoquinas en las muestras usamos una curva con estándares conocidos.

#### **3.11.1-Protocolo:**

- Administrar 100 µl/pocillo del anticuerpo de captura (Anticuerpo anti-TNF-alpha o IL-6) diluido en buffer de pegado e incubación durante toda la noche a 4°C.
- Se aspiró el contenido de cada pocillo y, posteriormente, se lavaron con buffer de lavado (300 µl/pocillo) 3 veces. Tras el tercer lavado, invertimos la placa sobre papel absorbente para eliminar los residuos del buffer.
- Se bloqueó la placa con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS con 1% BSA) y se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente y tapada.
- Se aspiró y lavó la placa con buffer de lavado (300µl/pocillo) 3 veces. Tras el tercer lavado, invertimos la placa sobre papel absorbente para eliminar los residuos del buffer.
- Se prepararon las diluciones y los estándares necesarios (TNF- alpha e IL-6 recombinantes diluidos en tampón de bloqueo). Se administró 100 µl de cada estándar y muestras en los micropocillos apropiados y se incubaron 2h

a temperatura ambiente.

- Se aspiró y lavó la placa con buffer de lavado (300µl/pocillo) 5 veces.
- Se añadieron 100 µl del anticuerpo de detección conjugado con Sav-HRP en cada micropocillo. Se selló la placa e incubó durante una hora a temperatura ambiente.
- Se aspiró y lavó la placa con buffer de lavado (300µl/pocillo) 7 veces.
- Se añadieron 100 µl de solución sustrato a cada pocillo. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una habitación oscura.
- Se añadieron 50 µl de solución stop a cada micropocillo.
- Se leyó la absorbancia a 450 nm tras 30 minutos transcurridos de la solución stop.



**Figura 4. Representación esquemática para la medición de citoquinas en el sobrenadante del medio de cultivos enzimoimmunoanálisis (ELISA).**

### **3.12-MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MELATONINA ENDÓGENA (MELn) EN EL SOBRENADANTE DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO. ENZIMOINMUNOANÁLISIS COMPETITIVO (ELISA)**

Con el objetivo de poder estudiar los niveles de melatonina endógena (MELn) producidos por los mastocitos sometidos a diferentes condiciones usamos un enzimoimmunoanálisis (ELISA) de tipo competitivo. Sus reactivos son de la casa IBL-Hamburg Diagnostic, Germany y su protocolo se esquematiza en la figura 5.

Como se muestra en dicha figura, en este método se produce una competición entre el antígeno biotinilado y el no biotinilado para adherirse a un número fijo de

sitios de unión. Además, cabe destacar, que el antígeno biotinilado unido al anticuerpo resulta ser inversamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra. Así en una situación de equilibrio, el antígeno biotinilado libre es eliminado durante los lavados; mientras que el antígeno biotinilado adherido al anticuerpo se distingue usando una estreptavidina fosfatasa alcalina que actúa como marcador y el p-nitrofenil fosfato que actúa como sustrato. Para poder cuantificarlo se utiliza la comparación de la actividad enzimática detectada en cada muestra estudiada respecto a una curva de respuesta obtenida a partir de estándares conocidos.

En pasos previos, realizamos la recogida de los sobrenadantes que fueron centrifugados a 1100xg durante 10 minutos, para descartar las células arrastradas. Posteriormente, se reservaron dos alícuotas para determinar las citoquinas pro-inflamatorias objeto de estudio. Así, cuando los sobrenadantes se obtuvieron y se resuspendieron los estándares pasaron por las columnas Waters® activadas según los pasos siguientes:

#### 3.12.1-Protocolo:

##### **Acondicionamiento de las columnas:**

- Se colocaron las columnas de extracción en tubos de vidrio o propileno (12x75mm).
- Se añadieron 1x1 mL de metanol (sin diluir). Las columnas fueron centrifugadas durante 1 minuto a 120g para que el solvente pase a su través.
- Se añadieron 1x1 mL de agua bidestilada a todas las columnas. Hacemos que el solvente pase a través de la columna mediante su centrifugación durante 1 minuto a 120xg.
- Se aplicaron las muestras sin demora, para evitar que las columnas se sequen.

##### **Aplicación de las muestras y los estándares:**

- Se colocaron las columnas de extracción en tubos de vidrio o polipropileno (12x75mm) que fueron rotulados debidamente.
- Se añadieron 0.5 mL de los estándares, las muestras y los controles a las columnas.
- Se añadieron 0.5 mL de agua bidestilada a las columnas, y se centrifugaron las columnas durante 5 minutos a 120xg.
- Se lavaron las columnas añadiendo 2 x 1 mL de metanol al 10% en agua bidestilada (v/v) a las columnas; el solvente pasó a su través mediante centrifugación durante 5 minutos a 120 xg.

##### **Elución del extracto:**

- Se colocaron las columnas de extracción en tubos de vidrio o polipropileno (12x75mm) que fueron debidamente rotuladas.
- Se añadió 1 mL de metanol (sin diluir) a las columnas y se centrifugaron



durante 5 minutos a 120xg para que el solvente pasara a su través.

-Se extrajeron las columnas de los tubos (evitando que queden las columnas con gotas).

**Evaporación y reconstitución del extracto:**

-Se evaporó el metanol usando una centrífuga evaporadora.

-Se reconstituyeron las muestras con 0.15 mL de agua bidestilada.

-Se sometieron las muestras a Vortex al menos 1 minuto y se procedió a ensayar.

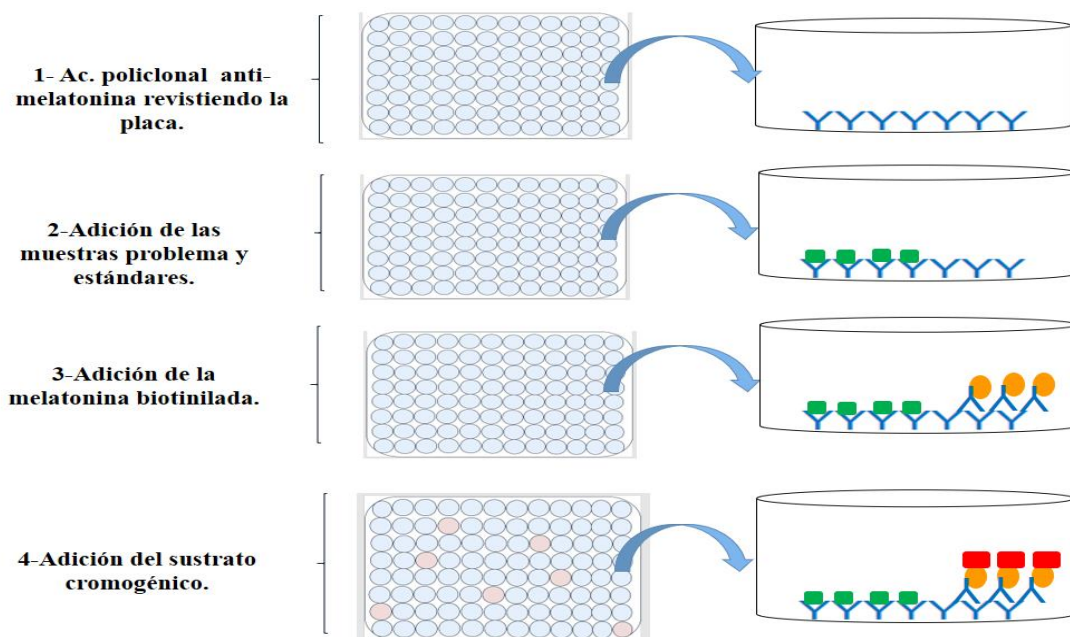
La valoración de los niveles de melatonina se determinó mediante un kit comercial de radioinmunoensayo (IBL) consistente en:

Componentes	Cantidad	Preparación	Ratio	Especificaciones
<b>Placa revestida con Ac. Policl.</b>	96 pocillos			Lista para su uso
<b>Melatonina biotinada</b>	3x2ml	2ml de Tp de ensayo diluido		En el momento
<b>Antisuero (liofilizado)</b>	3x2ml	2ml agua destilada.		En el momento
<b>Estándares de melatonina A-F</b>	1x6x2ml	En 2 ml de agua destilada.		15 minutos de agitación
<b>Enzima conjugado</b>	1x250µl	70µl en 5.6 ml Tp. Ensayo diluido	1:81	En el momento
<b>Control 1+2</b>	1x2x2ml	En 2 ml. de agua destilada.		15 minutos de agitación
<b>Solución Tampón</b>	1x50ml	15ml en 150 ml agua destilada	1:10	Lista para usar 4°C
<b>Substrato PNPP</b>	1x9	3 past. En 8ml Tp. substrato		En el momento
<b>Tampón de substrato (10x)</b>	1x27ml	Diluir en agua destilada (1x)		Lista para usar 4°C
<b>Solución de Stop</b>	1x5ml			Lista para usar 4°C
<b>Columnas de extracción</b>	2x10			
<b>Metanol</b>		10 ml en 100 ml agua destilada	10%	

**Tabla 1. Kit comercial de radioinmunoensayo (IBL). Relación de componentes usados para la determinación de melatonina.**

**3.12.2- Procedimiento del ensayo:**

- Se pipetearon 50  $\mu\text{L}$  de cada estándar, controles y muestras extraídas en los respectivos pocillos de la placa de microtitración.
- Se pipetearon 50  $\mu\text{L}$  de Melatonina Biotina en cada pocillo.
- Se pipetearon 50  $\mu\text{L}$  de antisuero de melatonina en cada pocillo y se agita la placa con cuidado.
- Se cubrió la placa con folio adhesivo y se agitó con cuidado. Posteriormente, se incubaron durante 14-20 h de 2-8°C.
- Se quitó el folio adhesivo y se eliminó la solución de incubación. Se lavó la placa 3 veces usando 250  $\mu\text{L}$  de solución buffer de lavado diluida. Posteriormente, se eliminó el exceso de la solución golpeando cuidadosamente la placa invertida sobre un papel.
- Se pipeteó 150  $\mu\text{L}$  de conjugado enzimático, preparado en fresco, a cada pocillo.
- Se cubrió la placa con un folio adhesivo y se incubó durante 120 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador.
- Se extrajo el folio adhesivo y se eliminó la solución de incubación. Se lavó la placa 3 veces con 250  $\mu\text{L}$  de solución buffer de lavado diluida y se removió el exceso de solución golpeando con cuidado la placa invertida sobre un papel.
- Se pipetearon 200  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato PNPP en cada pocillo.
- Se incubó la placa durante 40 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador.
- Se detuvo la reacción del sustrato añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de solución stop en cada pocillo.
- Se mezcló el contenido agitando la placa con cuidado.
- Se midió la D.O. a 405 nm, mediante un lector de placa (siendo su intensidad inversamente proporcional a la concentración de melatonina presente en las muestras).



**Figura 5.- Representación esquemática de la técnica de ELISA para la determinación de la melatonina.**

Los valores de D.O. de los estándares fueron representados frente a sus concentraciones. Los valores de las muestras problema se obtuvieron directamente de la curva estándar. Para el caso de las muestras diluidas, estos valores fueron multiplicados por sus correspondientes factores de dilución. Los resultados fueron finalmente expresados en pg/ml de proteína.

**3.13- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEÍCA DE LA MIOSINA E IKK $\alpha$ / $\beta$  MEDIANTE WESTERN BLOTTING:**

Usamos esta técnica con idea de detectar el nivel de proteínas específicas en las muestras estudiadas: células RBL-2H3 estimuladas, sin estimular y pre-tratadas con melatonina. Con ella se detecta la expresión de proteínas tanto citosólicas como nucleares que estén presentes en las muestras objeto de estudio. Este objetivo se alcanza usando la electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato-sódico (SDS) que fue descrita, en 1970, por Laemy. La técnica permite la separación de proteínas desnaturalizadas en función de su peso molecular durante su migración, a través de un gel de poliacrilamida, hacia el ánodo. El paso posterior, conlleva la transferencia de dichas proteínas a un gel de nitrocelulosa donde serán detectadas mediante una reacción quimioluminiscente en la cual se usan anticuerpos específicos para dichas proteínas.

**3.13.1-Tratamiento de las muestras para la obtención de las proteínas:**

Las células fueron lisadas con buffer de lisado, y los lisados resultantes se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Los homogeneizados se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos y a 4°C, posteriormente, se recogieron los sobrenadantes. Éstos se desnaturalizaron con buffer de carga, durante 5 minutos a 95°C.

**Buffer de lisado:** HEPES, EDTA, fluoruro sódico, Na PPI, Na<sub>3</sub> VO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O qsq, Tritón-X-100 1% v/v, inhibidor de proteasas.

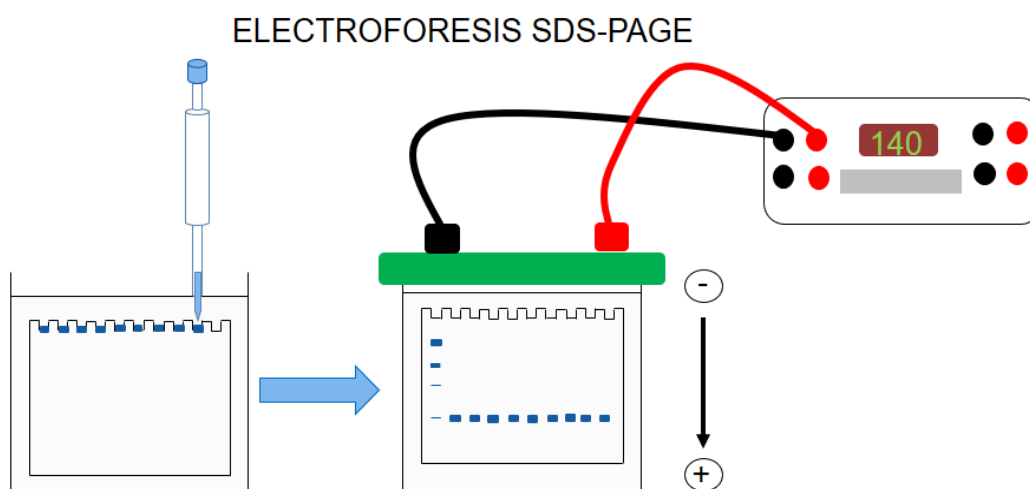
**3.13.2-Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS:**

La separación de las proteínas desnaturalizadas se llevó a cabo mediante geles de poliacrilamida en gradiente de 8-16%. Las muestras fueron desnaturalizadas durante 5 minutos a 95°C en presencia del tampón de carga de proteínas donde están presentes agentes reductores tales como SDS o DTT que les confieren cargas netas negativas.

**Tampón de carga de proteínas para electroforesis SDS-PAGE:** Tris ácido 1M al 25% v/v; Glicerol al 50% v/v; SDS 10% p/v; DTT 100 mM; Azul de bromofenol 0.001% p/v; pH 6,8.

Una vez las muestras han sido desnaturalizadas y presentaron la misma cantidad de proteínas (150-200 $\mu$ g), fueron cargadas en los diferentes pocillos para proceder a su separación a través del gel y según su peso molecular. Para ello, se añadió tampón de electroforesis en gel de poliacrilamida o “running buffer” y se sometieron los geles a una corriente de 70 voltios (V) aumentándose gradualmente hasta los 150 V cuando el frente de migración contactó con el gel de separación (Figura 6).

**Tampón para la electroforesis en gel de poliacrilamida (“running buffer”):** Tris-Glicina al 10% v/v; (Tris Base 250mM; Glicina 1,92M); SDS en stock del 20% al 0.5% v/v final.



**Figura 6.- Representación esquemática del sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS usado.**

### 3.13.3-Transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa:

Se realizó una transferencia electroforética de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa. El sistema de transferencia usado fue semi-seca semi-dry blotter (Sigma-Aldrich) según las pautas de dicha casa comercial.

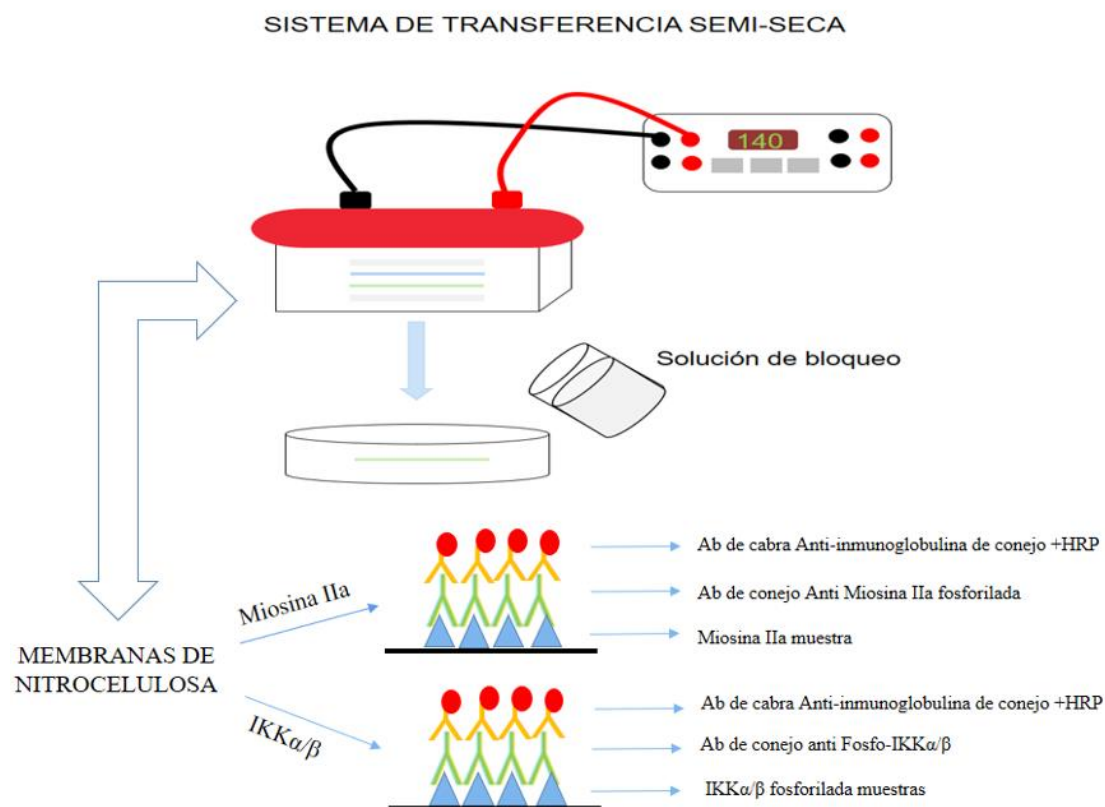
El proceso se llevó a cabo sobre una placa conductora-ánodo donde se colocaron tres papeles Whatmann, la membrana, el gel con las proteínas y sobre este conjunto tres papeles Whatmann más; todo ello humedecido con tampón de transferencia (Figura 7).

**Tampón para la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida:** Tris-Glicina al 10% v/v (Tris Base 250 mM; Glicina 1,92 M); Metanol 100% al 20% v/v; SDS 20% al 0.2% v/v final.

La transferencia se llevó a cabo aplicando una corriente que varía en función de

la superficie del gel ( $0.8\text{mA}/\text{cm}^2$ ) a un tiempo determinado por el peso molecular de la proteína que quiere ser estudiada, en este caso 20 minutos.

A su vez, la eficacia del proceso de transferencia se comprobó al teñir la membrana con una solución de Ponceau durante 1 minuto. Posteriormente, se llevaron a cabo varios lavados con PBS. Una vez realizado este paso, se saturó la membrana usando una solución de bloqueo (Albúmina 3% p/v) durante 1 hora, lo que permite evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos.



**Figura 7.- Representación esquemática del sistema usado para la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.**

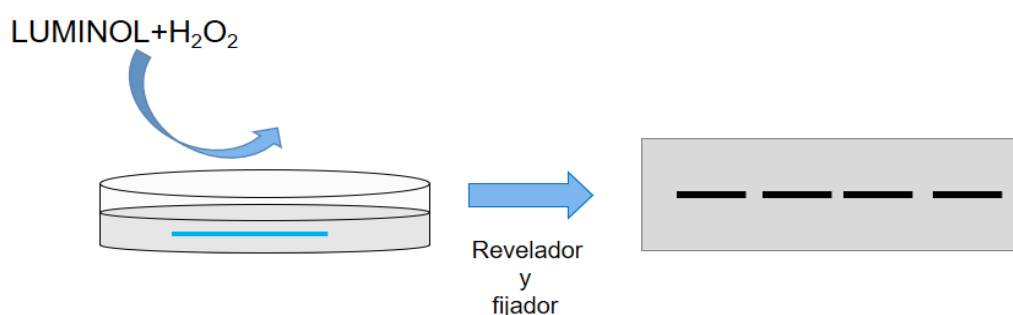
#### 3.13.4-Detección de las proteínas:

Una vez las membranas fueron bloqueadas, se procedió a su incubación con los anticuerpos primarios específicos para las proteínas-receptor a estudiar en tampón de bloqueo, con las siguientes condiciones: durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. Las membranas fueron lavadas (5 minutos) con tampón Tris Tween-20 para, posteriormente, incubarlas en presencia de los anticuerpos secundarios requeridos en las siguientes condiciones: 1 hora de incubación a temperatura ambiente.

Tras este periodo de incubación se procedió a lavar las membranas del

anticuerpo secundario, y se procedió a la detección de los inmunocomplejos formados mediante una reacción de quimioluminiscencia. Esta técnica consiste en añadir sobre las membranas los reactivos del kit de Supersignal®, que son: luminol y  $H_2O_2$  – en proporción 1:1- durante 5 minutos y en agitación. Durante este tiempo se produce la siguiente reacción: la catalización del proceso de oxidación del luminol por la enzima peroxidasa. Una vez finalizada esta fase, se produjo el revelado de dichas membranas al colocarlas entre dos acetatos que, en oscuridad, fueron expuestos a películas autorradiográficas (kodak Biomax XAR Film, Sigma Aldrich, EEUU) para detectar la señal (Figura 8).

#### DETECCIÓN DE PROTEÍNAS:QUIMIOLUMINISCENCIA Y REVELADO



**Figura 8.- Representación esquemática del sistema usado para la detección y el revelado de las proteínas presentes en la membrana de nitrocelulosa.**

##### 3.13.5 Medida de la concentración proteica:

Para detectar las proteínas, las membranas se incubaron durante 5 minutos en oscuridad y posteriormente, se procedió a su lectura a 595 nm usando un espectrofotómetro.

##### 3.13.6-Protocolos:

##### **Para el anticuerpo de Misoina IIa (Myosin IIa antibody #3403 Cell signaling Technology):**

- Se lisaron las células con buffer de lisado.
- Se incubaron los lisados resultantes durante 20 minutos a 4°C.
- Se desnaturalizaron los sobrenadantes solubles con buffer de carga durante 5 minutos a 95°C (Preparación para SDS-PAGE y la transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa)
- Se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS-T.
- Se incubaron con el primer anticuerpo de conejo, anti Myosin IIa fosforilada en Ser 1943, durante 3 horas a temperatura ambiente.

- Se lavó tres veces con PBS-T.
- Se incubó 1 hora con el segundo anticuerpo de cabra, anti inmunoglobulina de conejo acoplada con peroxidasa de rábano (HRP).
- Se detectó la actividad luminol/peroxidasa.

**Para el anticuerpo de conejo para IKK $\alpha$ /beta (IKK  $\alpha$ /beta (Ser 176/180) (16A6) Rabbit mAb):**

- Se lisaron las células con buffer de lisado.
- Se incubaron los lisados resultantes durante 20 minutos a 4°C.
- Se desnaturalizaron los sobrenadantes solubles con buffer de carga durante 5 minutos a 95°C (Preparación para SDS-PAGE y la transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa).
- Se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS-T.
- Se incubaron con el primer anticuerpo de conejo anti fosfo-IKK $\alpha$ /beta (Ser176/180) durante tres horas a temperatura ambiente.
- Se lavó tres veces con PBS-T.
- Se incubó 1 hora con el segundo anticuerpo de cabra, anti inmunoglobulina de conejo acoplada con peroxidasa de rábano (HRP).
- Se detectó la actividad luminol/peroxidasa.

**3.14-MÉTODOS ESTADÍSTICO:**

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos en las experiencias de cuantificación del contenido de citoquinas, melatonina, test de viabilidad celular y otros ensayos *in vitro* son expresados como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M.) del número de experimentos (n) indicado en cada caso.

Las imágenes de western blotting son representativas de, al menos, cuatro experimentos realizados individualmente, en días diferentes. Los resultados se expresaron normalizados con la densidad optica (D.O.) expresada por las células control sin tratamiento de melatonina.

El análisis estadístico ha sido realizado utilizando el programa informático GraphPad InStat statistical software package program 3.0. y la significación de las diferencias entre los grupos ha sido evaluada empleando el test de ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples Tukey-Kramer y del t student test. La diferencia entre los valores obtenidos se consideró estadísticamente significativa a partir de  $P < 0.05$ .

# **RESULTADOS**

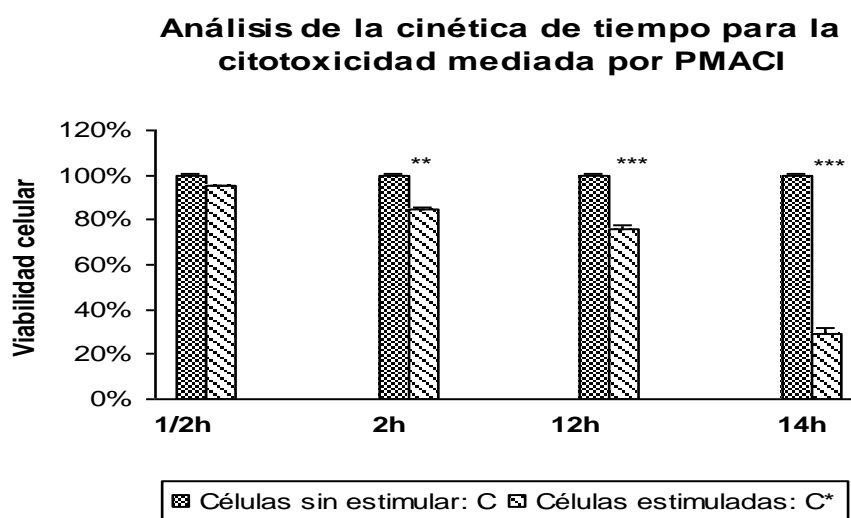


## 4.-RESULTADOS

### 4.1.- Inducción de citotoxicidad c

Para conseguir dicho objetivo, sometimos los cultivos celulares a diferentes tiempos de exposición a PMACI: ½, 2, 12, y 14 horas. En todos los casos, la estimulación química condujo a la reducción de la viabilidad celular, dependiendo de los tiempos de exposición y observando que a mayor periodo de exposición detectamos menor viabilidad celular y viceversa. Cuando expusimos los cultivos al estímulo químico (PMACI) durante 14h detectamos la mayor reducción en la viabilidad celular.

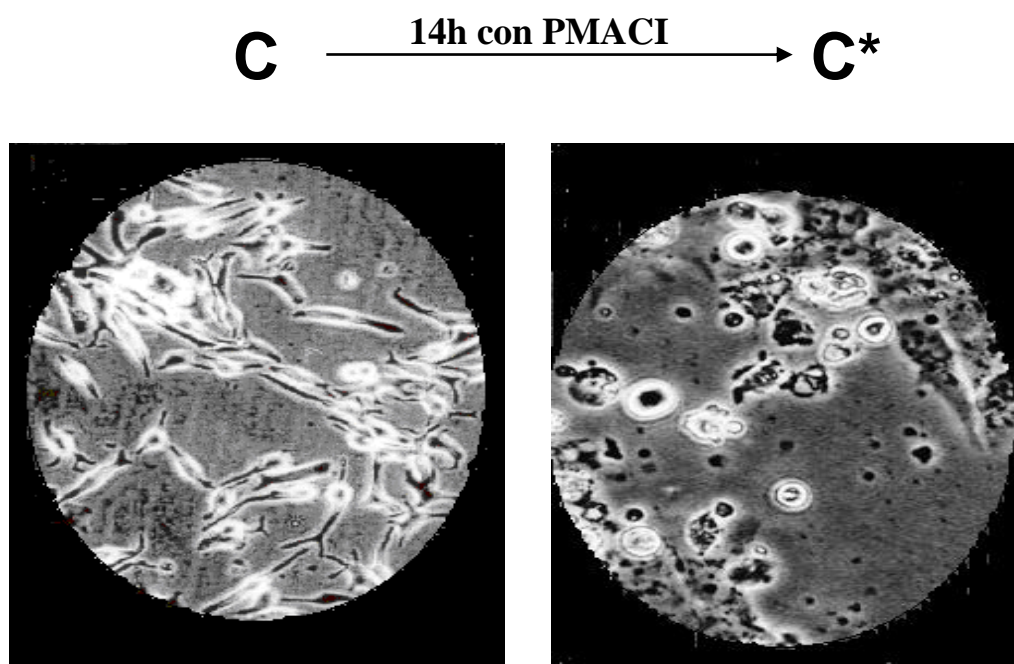
Como podemos observar en la figura 1, la disminución de los valores de viabilidad celular para las células estimuladas (C\*) es estadísticamente significativa (\*\* $p < 0.01$ ) y (\*\*\*) $p < 0.001$ ) con respecto a los valores obtenidos para las células sin estimular (C). Esta gráfica de tiempo nos permitió seleccionar las 2 y 12h, de exposición a PMACI, como los mejores tiempos para realizar el resto de los experimentos.



**Figura 1. Análisis de la cinética de tiempo para la citotoxicidad mediada por PMACI.** Los células RBL-2H3 crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C. Posteriormente, fueron sometidas a diferentes tiempo de exposición (1/2h, 2h, 12h y 14h) a PMACI (estímulo químico) lo que produjo, en todas ellas, la disminución de la viabilidad celular con valores estadísticamente significativos (\*\* $p < 0.01$ ) y (\*\*\*) $p < 0.001$ ) respecto a las células no estimuladas. La máxima citotoxicidad se alcanzó cuando el tiempo de exposición fue de 14h. Bajo estas condiciones, las células sufrían cambios extremos en su morfología a consecuencia de los cuales mostraban formas redondeadas, citoplasma

*vacuolado, presencia de cuerpos apoptóticos, y perdían su adherencia a la placa de cultivo, presentándose flotando en el medio.*

A su vez, también constatamos mediante microscopía óptica los cambios morfológicos producidos tras la exposición de los cultivos a PMACI. Así, mientras las células sin estimulación mostraban crecimiento en monocapa, forma fusiforme y adherencia al fondo de las placas de cultivos, las células con estimulación química cambiaban drásticamente. En concreto, destacamos que su morfología viraba a redondeada, con el citoplasma vacuolado y la presencia de cuerpos apoptóticos. Además, las células permanecían flotantes en el medio por pérdida de la adherencia (Figura 2).

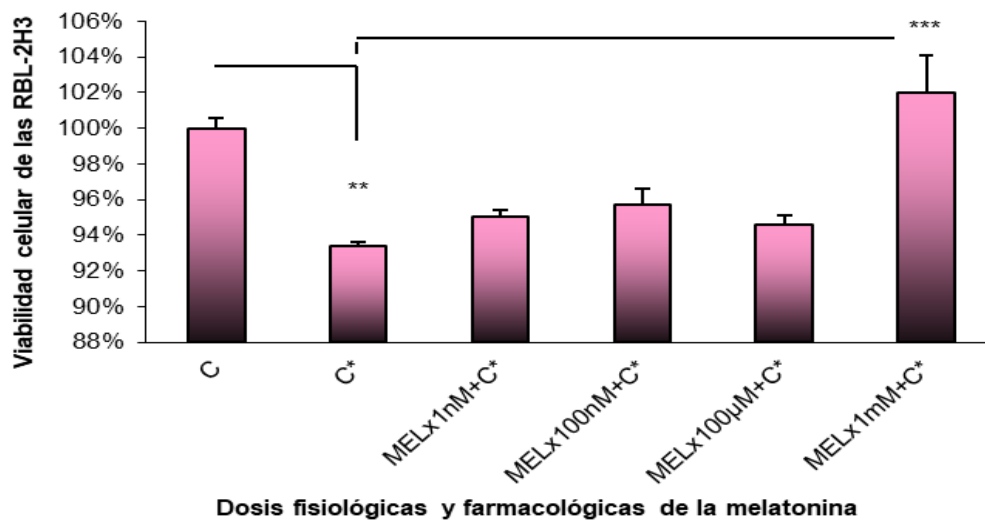


**Figura 2.** *Cambios morfológicos de los mastocitos RBL-2H3 tras su exposición durante 14 horas a PMACI. En la imagen podemos ver que tras dicho periodo de estimulación los mastocitos se presentan con forma redondeada, citoplasma vacuolado, presencia de cuerpos apoptóticos y flotantes en el medio de cultivo.*

#### **4.2.-Citoprotección ejercida por el pretratamiento con la melatonina a dosis fisiológicas y farmacológicas**

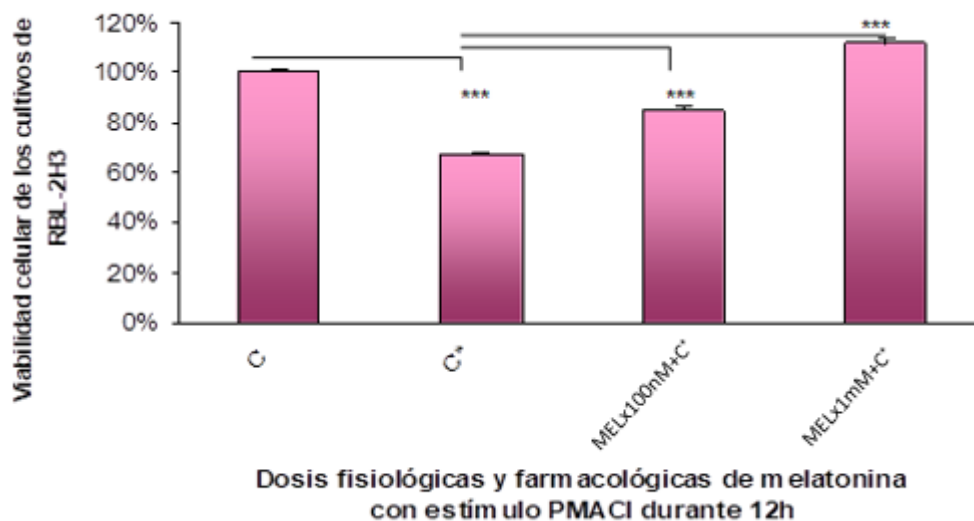
Al someter a las RBL-2H3 estimuladas con PMACI durante 2 horas, al pretratamiento exógeno de ½ hora con melatonina (MELx), a dosis fisiológicas (1nM y 100nM) y farmacológicas (100µM y 1mM), pudimos comprobar que la melatonina ejerce citoprotección sobre el mastocito, tanto más cuanto mayor era la concentración de ésta administrada en el medio, dando valores estadísticamente significativos (\*\*\*) únicamente para la dosis farmacológica 1mM (Figura

3).



**Figura 3. Citoprotección ejercida por la melatonina a dosis fisiológicas y farmacológicas en mastocitos RBL-2H3 estimulados con PMACI durante 2 horas.** Las células RBL-2H3 crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C, y se pretrataron durante 30 minutos con melatonina. Tras ello, se procedió a la estimulación química (PMACI) durante 2h. La melatonina ejerció citoprotección con valor estadísticamente significativo (\*\*\*) únicamente a concentración farmacológica 1mM.

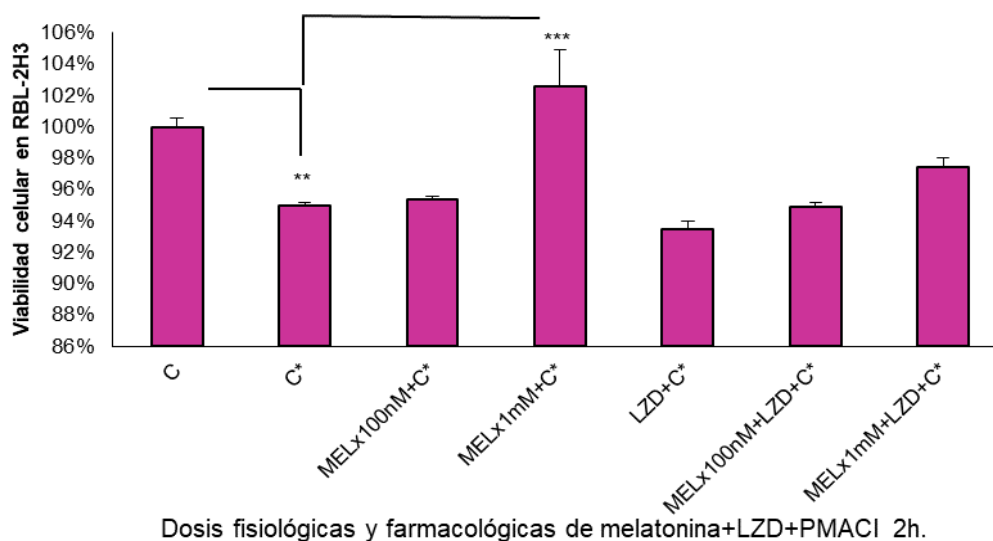
Del mismo modo, al someter a las RBL-2H3 estimuladas con PMACI durante 12 horas, al pretratamiento exógeno de ½ hora con melatonina (MELx), a dosis fisiológica (100nM) y farmacológica (1mM), pudimos comprobar que la melatonina ejerce citoprotección sobre el mastocito, tanto más cuanto mayor era la concentración de ésta administrada en el medio, dando valores estadísticamente significativos (\*\*\*) para la dosis fisiológica 100 nM y farmacológica 1mM, cuando se mantenían durante 12h con la estimulación (Figura 4).



**Figura 4. Citoprotección ejercida por la melatonina a dosis fisiológicas y farmacológicas en mastocitos RBL-2H3 estimulados con PMACI durante 12 horas.** Las células RBL-2H3 crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C, y se pretrataron durante 30 minutos con melatonina. Tras ello, se procedió a la estimulación química (PMACI) durante 12h. La melatonina ejerció citoprotección tanto a concentraciones fisiológicas (100nM) como farmacológicas (1mM) con valores estadísticamente significativos (\*\*\*) $p < 0.001$  en ambos casos.

#### **4.3.- Efecto del luzindol sobre la citoprotección ejercida por la melatonina durante 2 horas de estimulación**

El luzindol es un antagonista selectivo para los receptores de membrana de melatonina MT1 y MT2, por lo que con su uso provocaríamos la reversión o bloqueo de la función citoprotectora llevada a cabo por la melatonina. En esta experimentación, se usaron como pretratamiento las concentraciones fisiológicas y farmacológicas de melatonina 100nM y 1mM respectivamente. La figura 5 nos muestra como el efecto citoprotector de la melatonina, presenta una tendencia reductora, al usar luzindol, tanto a dosis fisiológicas como farmacológicas, aunque sin significación estadística.

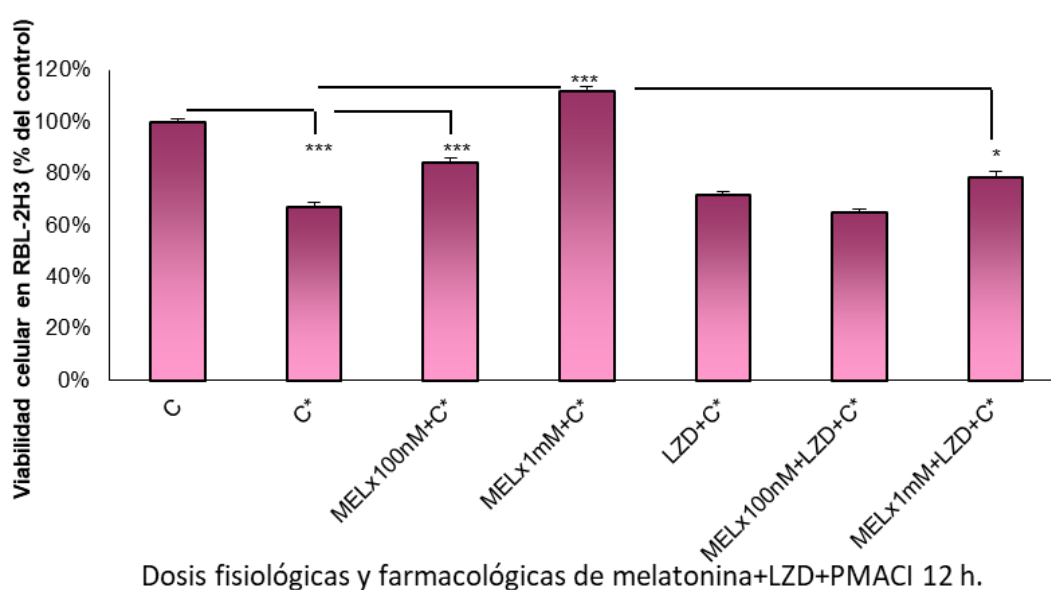


**Figura 5. Efecto del luzindol sobre la citoprotección ejercida por la melatonina en mastocitos RBL-2H3 estimulados con PMACI durante 2 horas.** Las células RBL-2H3, crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C, y se pretrataron, durante 30 minutos, con melatonina a concentraciones fisiológicas y farmacológicas de 100 nM y 1 mM respectivamente. Además, fueron tratadas con luzindol, un antagonista selectivo para los receptores de membrana MT1 y MT2 de melatonina, con anterioridad a la estimulación

química (PMACI) que duró 2h. El efecto citoprotector de la melatonina se ve reducido por el uso de luzindol.

#### **4.4.- Efecto del luzindol sobre la citoprotección ejercida por la melatonina durante 12 horas de estimulación**

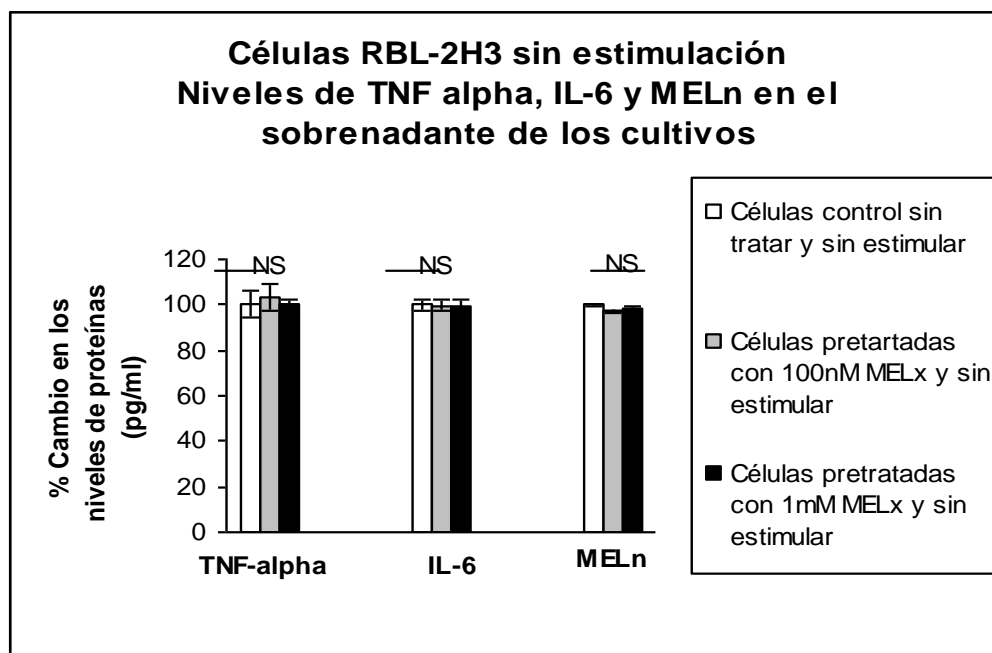
La figura 6 nos muestra como el efecto citoprotector, del pretratamiento con la melatonina, presenta una tendencia reductora cuando se usa luzindol. Esta tendencia a la baja afecta tanto a las dosis fisiológicas como farmacológicas de la melatonina, durante la estimulación con PMACI durante doce horas; destacando que fue la dosis farmacológica la que presentó valores estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Efecto del luzindol sobre la citoprotección ejercida por la melatonina en mastocitos RBL-2H3 estimulados con PMACI durante 12 horas. Las células RBL-2H3 crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C, y se pretrataron durante 30 minutos con melatonina a concentraciones fisiológicas y farmacológicas de 100 nM y 1 mM, así como con luzindol, un antagonista selectivo para los receptores de membrana MT1 y MT2 de la melatonina. Posteriormente, se las estimuló químicamente (PMACI) durante 12h. En todos los casos, la melatonina ejerció su efecto citoprotector si bien es cierto que dicha protección disminuye con el uso de luzindol alcanzando valores estadísticamente significativos para la dosis farmacológica de 1mM.

#### **4.5-Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) en la liberación de citoquinas y de la melatonina endógena MELn en cultivos de RBL-2H3 sin estimulación química**

Para conocer si el pretratamiento con MELx (1/2h) a dosis fisiológicas y farmacológicas (100  $\mu$ M y 1 mM) afecta por sí misma, a la liberación de citoquinas y de la melatonina endógena, las RBL-2H3 se mantuvieron en cultivo durante 12h sin recibir estimulación química con PMACI. La figura 7 muestra la inexistencia de diferencias significativas en la liberación de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 y MELn respecto a los cultivos control de RBL-2H3 que no recibieron pre-tratamiento ni estimulación química.



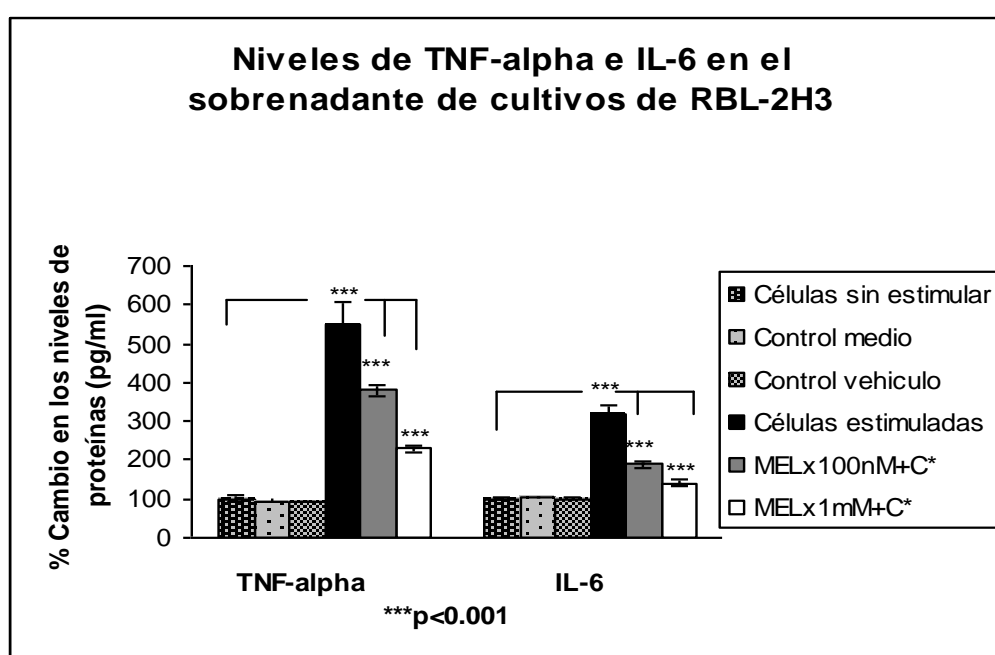
**Figura 7. Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) en la liberación de citoquinas y MELn en cultivos de RBL-2H3 sin estimulación química.** Las células RBL-2H3, crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C, fueron pretratadas con MELx, a concentraciones 100 nM y 1 mM, pero sin estimulación química (PMACI). Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en la liberación de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6, así como en la MELn respecto a los cultivos control sin pre-tratamiento ni estimulación química.

#### **4.6.-Estudio de la liberación de citoquinas proinflamatorias en cultivos de RBL-2H3 estimuladas con PMACI**

Los datos referentes a la estimulación química generada por PMACI sobre los cultivos celulares de RBL-2H3 muestran que su efecto es dosis y tiempo dependiente. Además, observamos que, tras la estimulación química, durante 12 h, los mastocitos sintetizaban y liberaban citoquinas proinflamatorias, en concreto TNF- $\alpha$  e IL-6, con valores estadísticamente significativos (\*\*\*) cuando se les comparaba con los mastocitos sin estimular (Figura 8). Específicamente, los niveles de TNF- $\alpha$  detectados en las células estimuladas fueron un 82% superior al de las células sin

estimular. A su vez, destacamos que en el caso de la IL-6 los datos fueron similares, si bien hemos de resaltar que en este caso la producción de dicha interleuquina fue un 68% mayor para las células estimuladas que para las no estimuladas.

Observamos también un aumento en la síntesis y liberación de la melatonina endógena (MELn), por los mismos mastocitos, como si se tratara de una citoquina más. La liberación de MELn en el medio tras 12h de estimulación química con PMACI se muestra en la figura 8. Comprobamos que las células sin estimular liberan MELn y que la estimulación con PMACI aumentó su secreción en un 63%. Destacamos aquí como controles de calidad, que las cantidades de melatonina detectadas tanto en el medio de cultivo solo, como en el medio con DMSO (control del vehículo) resultaron insignificantes.



**Figura 8. Niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el sobrenadante de los cultivos celulares de RBL-2H3.** Las células RBL-2H3, crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C, y fueron estimulados químicamente (PMACI) durante 12h. En respuesta, los mastocitos sintetizaron y liberaron citoquinas pro-inflamatorias, en concreto TNF- $\alpha$  e IL-6. El nivel de TNF- $\alpha$ , respecto a las células sin estimulación, fue un 82% superior mientras que los niveles de IL-6 fueron un 68% mayor. Además, el pretratamiento con MELx mostró un efecto inhibitor sobre dichas citoquinas liberadas por los mastocitos estimulados.

#### **4.7.-Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y la melatonina endógena (MELn) en cultivos celulares de RBL-2H3 con estimulación química (PMACI)**

Con la idea de poder determinar si la MELx es capaz de modular la producción

de TNF- $\alpha$  y de IL-6 generadas por la estimulación química (PMACI), pre-tratamos (1/2h) las células con diferentes concentraciones de melatonina. Tras esta experimentación, seleccionamos las concentraciones de melatonina, para el pretratamiento de las mismas, a 100 nM como dosis fisiológica y a 1 mM como dosis farmacológica. Tras el pretratamiento con melatonina, las células fueron lavadas varias veces y sometidas al estímulo químico con PMACI durante 12h. El análisis del sobrenadante de los cultivos, mediante técnicas de ELISA, nos permitieron conocer que MELx 100nM redujo la síntesis y liberación de TNF- $\alpha$  e IL-6 en los mastocitos estimulados con efectos inhibitorios del 30% y 40% respectivamente. Esta inhibición fue más marcada a mayores concentraciones de MELx usadas en el pretratamiento. Así, para MELx 1mM el efecto inhibitorio fue del 60% y 55%, respectivamente (Figura 8 y Tabla 1).

Citoquinas secreción	Pretratamiento Melatonina	% Inhibición
		30 min. Preincubación
TNF- $\alpha$	100nM	30% $\pm$ 2.8%
	1mM	60% $\pm$ 1.7%
IL-6	100nM	40% $\pm$ 3.3%
	1mM	55% $\pm$ 2%
MELn	100nM	24% $\pm$ 3.9%
	1mM	33% $\pm$ 2.5%

**Tabla 1.** Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y MELn en cultivos celulares de RBL-2H3 con estimulación química (PMACI). En esta tabla indicamos los porcentajes de inhibición de TNF- $\alpha$ , IL-6 y MELn procedentes de los mastocitos RBL-2H3 sometidos a 30 minutos de pretratamiento con MELx, dosis fisiológicas 100 $\mu$ M y farmacológicas 1 mM, antes de la estimulación con PMACI durante 12h.

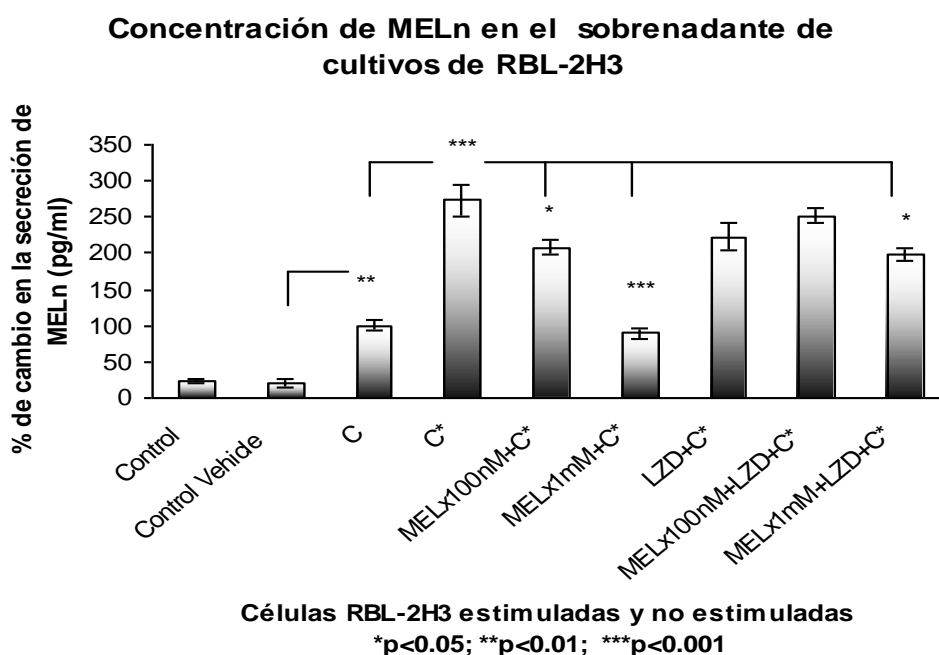
#### **4.8.-Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) sobre la síntesis y liberación de melatonina endógena (MELn) en cultivos de RBL-2H3 en respuesta a PMACI**

Para conocer si el pretratamiento con MELx, a dosis fisiológicas y farmacológicas (100 nM y 1 mM), puede modular la producción de MELn inducida por la presencia de PMACI, añadimos luzindol, un antagonista de los receptores de membrana de melatonina MT1 y MT2 [Rivara et al.,2005], durante 30 minutos. Destacamos aquí, que después de esta pre-incubación las células fueron lavadas tres



veces y activadas con PMACI.

La figura 9 y la tabla 1, nos muestra como los mastocitos pretratados con MELx 100nM y 1mM y estimulados con PMACI, redujeron la síntesis y liberación de MELn en un 24% y 33%, con valores estadísticamente significativos  $*p<0.05$  y  $***p<0.001$  respectivamente. Cuando el antagonista luzindol fue usado concomitantemente con el pretratamiento MELx, el efecto inhibitorio de MELx (100 nM y 1 mM) sobre la síntesis y liberación de MELn fue bloqueado, aunque no enteramente, y sólo a la dosis farmacológica de MELx 1mM presentó valores estadísticamente significativos  $*p<0.05$ .



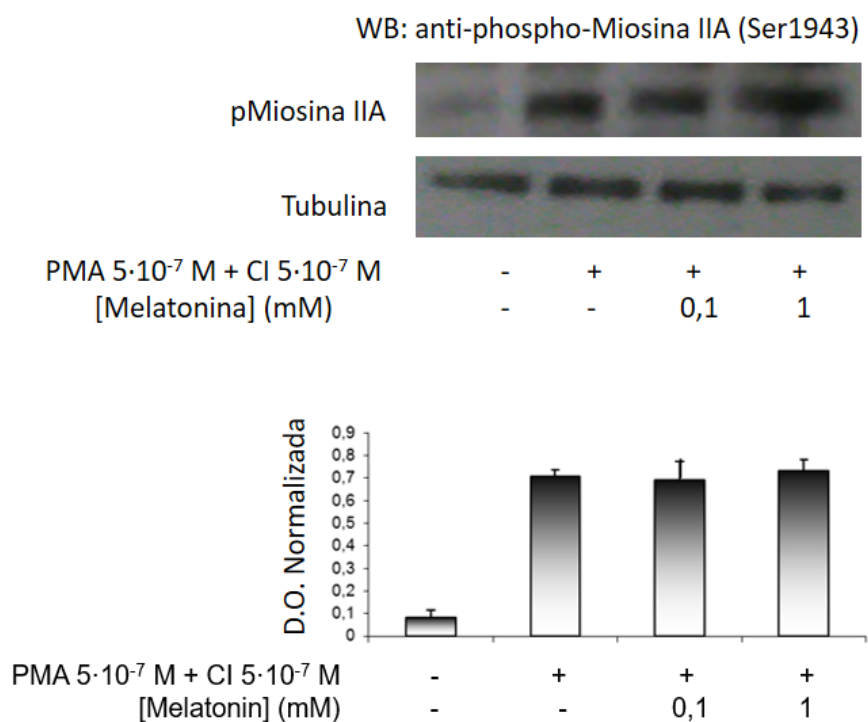
**Figura 9.** Efecto inhibitorio de la MELx sobre la síntesis y liberación de la MELn, inducida por el estímulo con PMACI, bloqueado al usar luzindol. Las células RBL-2H3, crecieron en medio con suero fetal bovino descomplementado, CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C, fueron pretratadas con melatonina y, posteriormente, estimulados químicamente (PMACI) durante 12h. Tras estudiar el sobrenadante de dichos cultivos mediante ELISA constatamos que el pretratamiento con MELx (100nM y 1mM) redujo la síntesis y liberación de MELn por parte de los mastocitos estimulados, con valores estadísticamente significativos  $*p<0.05$  y  $***p<0.001$  respectivamente. El uso de luzindol bloqueó estos efectos alcanzándose valores significativos con la dosis farmacológica de 1mM de MELx  $*p<0.05$ .

#### **4.9-Estudio del efecto de la melatonina exógena (MELx) sobre los mecanismos intracelulares responsables de la citoprotección**

Para conocer los mecanismos intracelulares responsables de la citoprotección que la MELx ejerce sobre los mastocitos estimulados y sobre su capacidad para

reducir las citoquinas pro-inflamatorias, estudiamos el efecto que el pretratamiento MELx ejerce sobre: A) la proteína Miosina AII y B) El factor nuclear NF- $\kappa$  $\beta$  mediante técnicas de Western Blot.

A) La Miosina AII: La miosina es una proteína que la encontramos formando parte del citoesqueleto de las paredes de los gránulos mastocitarios, donde se almacenan los mediadores solubles de la inflamación. Esta proteína puede ser fosforilada y activada por la proteína quinasa C (PCK), AMP-cíclico dependiente, permitiendo la movilidad y migración del gránulo hacia la membrana plasmática del mastocito generando la exocitosis del mismo. Al estimular químicamente los cultivos de mastocitos con PMACI durante 2h., se induce la activación de la PKC y la fosforilación de la Miosina, liberándose los mediadores inflamatorios. En nuestra experimentación, determinamos que el pre-tratamiento con MELx a concentración fisiológica 100 nM y farmacológica 1 mM, no interfirió en la modificación de esta ruta, ni la dosis fisiológica ni la farmacológica (Figura 10).

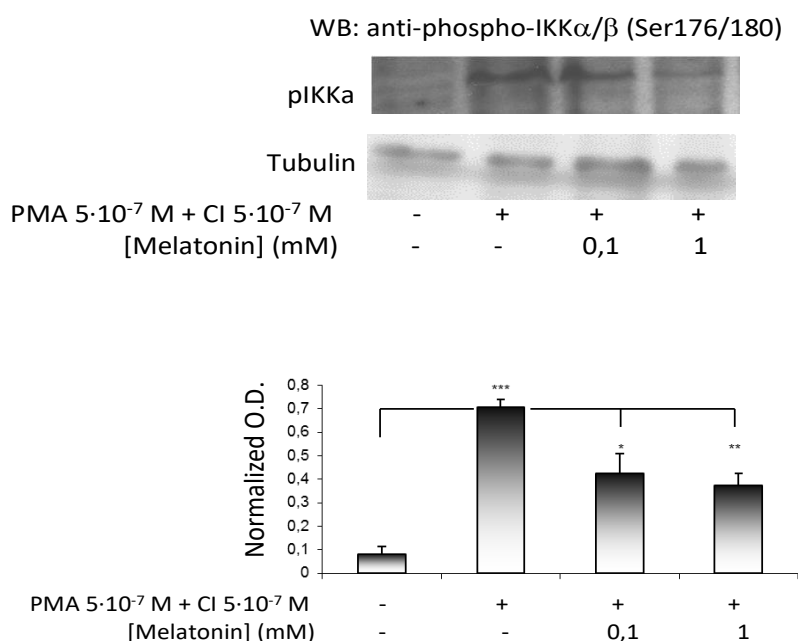


**Figura 10. Resultado de la técnica de Western Blot al estudiar el efecto de la MELx sobre la Miosina IIA, en los mastocitos estimulados con PMACI, durante 2h. Los resultados muestran que MELx no tuvo ningún efecto sobre dicha ruta de activación.**

B) Al estimular químicamente los cultivos de mastocitos con PMACI durante 2h., se induce la fosforilación de IK $\beta$ . IK $\beta$  forma parte del complejo IKK $\alpha$ / $\beta$  necesario para la activación del factor NF- $\kappa$  $\beta$  que a su vez activa la transcripción

nuclear de los genes de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6, así como la síntesis de MELn en el proceso de liberación de mediadores inflamatorios mastocitarios. En nuestra experimentación determinamos que el pre-tratamiento con MELx a concentración fisiológica 100 nM y farmacológica 1 mM, interfiere, al menos en parte, en la fosforilación necesaria para la activación del complejo IKK $\alpha/\beta$ , inhibiéndola; por eso los niveles de IKK- $\alpha$  fosforilada son menores al aumentar la concentración de melatonina.

En la figura 11 podemos observar como los niveles de mayor expresión de IKK $\alpha/\beta$  corresponden a los mastocitos estimulados con PMACI y no tratados. Estos niveles decaen proporcionalmente al pretratar con MELx 100nM (\* p<0.05) y MELx 1mM (\*\*p<0,01).



**Figura 11.** Resultado de la técnica de Western Blot al estudiar el efecto inhibitor de la MELx sobre la fosforilación de los factores IKK $\alpha/\beta$  inducida por la estimulación con PMACI durante 2h en cultivos de mastocitos. Los resultados muestran que los niveles de expresión de IKK $\alpha/\beta$  decaen de manera proporcional tras el pretratamiento con MELx a concentraciones fisiológicas y farmacológicas en los cultivos.

# ***DISCUSIÓN***

## 5.- DISCUSIÓN

La inflamación es un proceso defensivo que requiere la coordinación exhaustiva entre las diferentes fases de su desarrollo: inicio, mantenimiento y resolución. En cada una de estas fases están implicadas células y moléculas cuyo preciso control aún no está claramente establecido. En este sentido, hemos basado nuestro estudio en los mastocitos, células del sistema inmune innato en cuyo citoplasma se encuentran multitud de gránulos, repletos de histamina y otros mediadores, responsables de la inflamación. Están colocados en lugares estratégicos del organismo, en contacto con el exterior, como por ejemplo la piel y las mucosas respiratorias y digestivas. Poseen numerosos receptores de superficie que les permiten activarse y defendernos de patógenos y otros estímulos nocivos [Rich RR, 2013]. Los mediadores liberados por los mastocitos, poseen actividades pro y/o anti-inflamatorias que orquestan de forma mancomunada las diferentes fases del proceso. La presencia de moléculas con actividades contrapuestas es fundamental para la regulación de la inflamación en el tiempo y el espacio [Caelles et al., 2017]. En este sentido, hemos investigado el papel del PMACI, un estímulo químico, que provoca activación y citotoxicidad en la línea celular RBL-2H3, y lo hace dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición. Esta citotoxicidad la hemos puesto de manifiesto por una disminución de la viabilidad celular y alteraciones morfológicas en las cuales se podía apreciar una pérdida de la forma fusiforme y la adhesividad celular, así como la presencia de cuerpos apoptóticos. Estos cambios eran tanto más pronunciados, cuanto mayor era el tiempo de exposición a PMACI ( $\geq 14h$ ) [Maldonado et al., 2010, Maldonado et al., 2013; Maldonado et al., 2016]. Por otro lado, conocíamos la molécula de melatonina, liberada de la glándula pineal [Stehle et al., 2011] y otros lugares extrapineales entre los cuales se encuentran las células del sistema inmune [Das et al., 2008]. Aquí, está implicada en numerosas funciones fisiológicas entre las que se encuentran su papel antioxidante, inmunomodulador o antiinflamatorio [Maldonado et al., 2010; Maldonado et al., 2012]. Numerosos investigadores habían puesto de manifiesto el papel de citoprotección de la melatonina en las células del sistema inmune como, por ejemplo, en los monocitos [Radogna et al., 2007; Radogna et al., 2010], en los linfocitos T CD4+ [Pedrosa et al., 2010], en los linfocitos B [Paternoster et al., 2009], etc., sin embargo, poco se sabía sobre su labor sobre los mastocitos. La mayoría de investigadores coincidían en la idea de que la melatonina ejercía sus funciones citoprotectoras por medio de la regulación del estrés oxidativo, la apoptosis y la homeostasis mitocondrial [Espino et al., 2010b, Reiter et al., 2012, Rosales-Corral et al., 2012b]. Algunas de estas actividades son mediadas por medio de los receptores específicos de melatonina [Imbesi et al., 2009; Shiu et al., 2010] y otras son receptores independientes [Reiter et al., 1996; Tan et al., 2002], incluimos también las interacciones de la melatonina con las especies reactivas del oxígeno (ROS) y aquellas mediadas por sus metabolitos bioactivos [Tan et al., 2007; Hardeland, 2009; Schaefer and Hardeland, 2009].

En previos estudios de esta línea de investigación, demostramos que los

mastocitos tienen la maquinaria suficiente para sintetizar y liberar melatonina, como si se tratara de una citoquina más y también la capacidad para expresar, en su superficie, los receptores de membrana MT1 y MT2 [Maldonado et al., 2010]. Además, encontramos que cuando los mastocitos son estimulados con PMACI, estos aumentan la síntesis y liberación de melatonina y citoquinas pro-inflamatorias, así como la expresión de sus receptores MT1 y MT2 [Maldonado et al., 2010; Maldonado et al., 2016]. Estos datos nos sugieren que los mastocitos pueden absorber la melatonina del espacio intercelular, tras su liberación, y por un mecanismo autocrino o paracrino, frenar así la excesiva activación mastocitaria [Maldonado et al., 2010]. Pensábamos que los mastocitos tras la sobrestimulación con PMACI, actuaban aumentando la producción de melatonina y los receptores de membrana como un mecanismo de contrabalanceo para compensar y mejorar la sobrestimulación y situación de citotoxicidad generada.

Los hallazgos de nuestro trabajo, en esta tesis, confirmaron nuestras hipótesis y demuestran que el tratamiento con melatonina promueve la citoprotección sobre las células de la línea celular RBL-2H3 y que este efecto está directamente relacionado con la concentración de la melatonina utilizada. Así, las concentraciones farmacológicas de melatonina empleadas (1mM) aumentaron la citoprotección en los mastocitos con valores estadísticamente significativos en todos los casos (Figura 3 y 4). Mientras que las dosis fisiológicas de melatonina (100nM) sólo lo hicieron tras 12h de exposición (Figura 4). La citoprotección ejercida por la melatonina en los mastocitos fue llevada a cabo mayoritariamente a través de los receptores de membrana de alta afinidad MT1 y MT2 [Maldonado et al., 2010].

Considerando que la melatonina es conocida por su capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno, aumentar la eficiencia del transporte mitocondrial de electrones y promover la actividad de enzimas anti-oxidantes como: glutatión peroxidada, superóxido dismutasa y catalasa [Rodríguez et al., 2004]; proponemos que un posible mecanismo por el que la melatonina ejercería su acción citoprotectora podría ser la generación de un campo endógeno citoprotector alrededor de los mastocitos, por acumulación de melatonina, y la actuación sobre los receptores MT1 y MT2 mastocitarios inhibiéndolos [Reiter et al., 2000; Maldonado et al., 2010]. Además, la melatonina es una molécula anfifílica [Shida et al., 1994; Ceraulo et al., 1999], lo que significa que puede cruzar libremente las bicapas lipídicas de las membranas celulares y distribuirse por los compartimentos acuosos entre los cuales podemos incluir el citosol, el núcleo o la mitocondria [Menendez-Pelaez et al., 1993, Acuña-Castro et al., 2001, Acuña-Castro et al., 2003]. Estas propiedades de anfifilicidad podrían explicar porque en la figura 6 el luzindol, un antagonista no selectivo de los receptores de la melatonina, bloquea la protección ejercida por la melatonina 1mM, aunque no enteramente. Probablemente, la melatonina está aún presente en los mastocitos, ejerciendo su citoprotección vía receptor independiente [Reiter et al., 2007; Maldonado et al., 2013].

Todos estos datos nos sugieren que los mastocitos no sólo poseen un papel inicial en la respuesta inflamatoria defensiva, importantísima para la supervivencia, sino que también es clave, por su capacidad citoprotectora con la melatonina, en la restauración y recuperación de la homeostasis de los tejidos afectados.

Numerosos agentes, externos o internos, pueden iniciar la respuesta inflamatoria mastocitaria a través de la activación de una red de rutas de señalización de entre las que se encuentra la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B [Mohan et al., 1995; Baeuerle and Baichwal, 1997]. PMACI, el compuesto que hemos utilizado para activar a los mastocitos, está formado por la unión de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) y  $\text{Ca}^{++}$  (Calcio ionóforo A23187), dos compuestos que por sí solos inducen la activación de NF- $\kappa$ B en los mastocitos [Mohan et al., 1995; Manna et al., 1998; Cikler et al., 2005; Kim et al., 2006]. Esta activación con PMACI conduce a la disociación del complejo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B y la migración de NF- $\kappa$ B al núcleo, promoviendo la síntesis de citoquinas [Gosh and Baltimore, 1990; Mohan et al., 1995; Kim et al., 2014]. Un aumento de la actividad NF- $\kappa$ B asociada a la secreción elevada de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la IL-6, han sido encontradas en las respuestas inflamatorias de carácter alérgico [Trefzer et al., 2003; Kim et al., 2013]. TNF- $\alpha$  e IL-6 median respuestas multifuncionales incluyendo supervivencia celular, crecimiento, diferenciación y la respuesta inflamatoria defensiva de los mastocitos [Lippert et al., 2000].

En los últimos años, se han puesto de manifiesto los beneficios terapéuticos que tienen los tratamientos con agentes anti-inflamatorios de enfermedades cuya base anatomopatológica no era otra que la inflamación crónica, pero que hasta recientemente no se había identificado este componente inflamatorio [Lippert et al., 2000; Gregor and Hotamisligil, 2011; Kim et al., 2013; Shalapour and Karin, 2015; Caelles et al., 2017]. Por ello, pensamos que, centrando nuestra atención en regular la producción de citoquinas pro-inflamatorias por los mastocitos, como TNF- $\alpha$  e IL-6, podría ayudar en el control temporo-espacial de la inflamación y a generar herramientas terapéuticas útiles para las enfermedades de base inflamatoria. En esta dirección, estudiamos los efectos de la melatonina administrada desde el exterior o exógena (MELx) sobre la hiperestimulación y liberación de TNF- $\alpha$ , IL-6 y melatonina endógena (MELn) o producida por los propios mastocitos. El PMACI estimuló a los mastocitos llevándolos a un estado de hiperactividad que se puso en evidencia por una disminución en la viabilidad celular y por la liberación de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 y MELn en el medio (Figura 8, 9 y tabla 1). Cuando los mastocitos fueron pre-tratados con MELx, 100nM y 1mM, media hora antes del estímulo con PMACI, la viabilidad celular mejoró y significativamente se redujeron los niveles de producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 y MELn (Tabla 1).

Los efectos fueron dosis-dependientes, con resultados óptimos tanto a dosis fisiológicas (100nM) como farmacológicas (1mM) (Figuras 8 y 9). Así, el efecto inhibitorio de MELx sobre la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 fue del 30% y 40% para

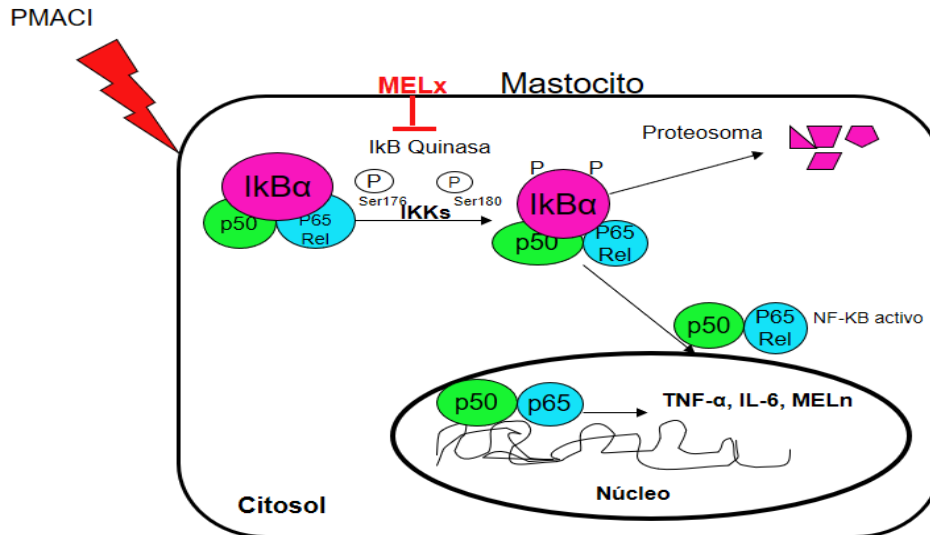
la dosis fisiológica, y de 60% y 55% respectivamente, para la farmacológica (Tabla1). Curiosamente, nuestros resultados muestran (Figura 9) como los mastocitos, sin estimular, también secretan MELn y como la estimulación con PMACI aumentó la producción en un 63%. Probablemente los mastocitos de forma constitutiva sintetizan y liberan melatonina como una molécula inmunoreguladora implicada en el mantenimiento de la homeostasis oxidante-antioxidante o sincronizando los efectos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en condiciones forzadas y fisiológicas celulares.

Luego, al activarse los mastocitos liberarían MELn como un mediador de inicio de la inflamación, posteriormente la propia MELn pondría en marcha mecanismos para mitigarla [Galli et al., 1996; Galli et al., 2005; Maldonado et al., 2010]. Estos resultados sugieren que la melatonina exógenamente añadida (MELx) puede interferir con la melatonina endogenamente generada MELn (Tabla 1). Parece ser que los efectos de MELx, sobre los mastocitos, son sólo relevantes cuando se producen situaciones de daño o agresión celular. Los mastocitos podrían estar actuando como sensores de dicho daño o lesión, detectando el riesgo celular y exacerbando la inflamación a través de la liberación adicional de MELn [Enoksson et al., 2011].

Como ocurre en otras muchas células del sistema inmune, la estimulación de los mastocitos activa la vía de señalización del NF- $\kappa$ B, la cual juega un importante papel en la síntesis de MELn, por inducción de la activación de la enzima Arylakylamina-N-acetiltransferasa (AA-NAT) [Pontes et al., 2006; Muxel et al., 2012; Hu et al., 2013; Markus et al., 2013; Villela et al., 2014]. El mismo grupo de investigadores [Pontes et al., 2006; Muxel et al., 2012], completaron la hipótesis añadiendo que la transcripción de los genes que codifican la enzima AA-NAT podría estar bajo el control del factor NF- $\kappa$ B, dado que los elementos KB están presentes en el promotor y en el primer intrón [Marcus et al., 2007]. Esto fue confirmado por el control de expresión de una proteína roja, con parte del promotor y el primer intrón de estos genes, en monocitos [Marcus et al., 2013; Pires-Lapa et al., 2013]. Los autores claramente muestran que cuando el NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo, por la acción de diferentes estímulos, los genes de la proteína roja y los de la enzima AA-NAT son transcritos y melatonina es detectada en el medio de cultivo. Esto mismo podría estar ocurriendo con los mastocitos cuando se les estimula con PMACI y aumentan los niveles de MELn en el medio de cultivo (Figura 9). MELn estaría actuando como un restaurador del balance fisiológico dentro y fuera del mastocito.

Considerando que en la ruta de señalización del NF- $\kappa$ B existen múltiples componentes, existirán también numerosos métodos y pasos en los que poder inhibir al NF- $\kappa$ B activado [Zhang et al., 2015] (Figura 12).





**Figura 12. Propuesta esquemática del posible efecto anti-inflamatorio de la melatonina sobre el proceso de la inflamación aguda.**

La activación de NF- $\kappa$ B por estímulos pro-inflamatorios implica a la fosforilación de Ser 177 y 181 del IKK $\beta$ , y Ser176 y 180 del IKK $\alpha$  [Mercurio et al., 1997; Ling et al., 1998]. De acuerdo a nuestros resultados, las RBL-2H3 estimuladas con PMACI, presentan una profunda inducción de la fosforilación de la IKK $\alpha$ , comparadas con las células sin estimular (Figura 11).

El pretratamiento con MELx, antes de la estimulación con PMACI, a concentraciones fisiológicas 100nM y farmacológicas 1mM, previene la fosforilación de IKK $\alpha$  y los efectos sobre la cascada IKK/I $\kappa$ B, contribuyendo a su vez al bloqueo de la activación del NF- $\kappa$ B. Los efectos inhibitorios de la melatonina sobre la actividad NF- $\kappa$ B han sido también encontrados en otras células del organismo como, por ejemplo: los macrófagos [Gilad et al., 1998], células musculares [Alonso et al., 2006], hepatocitos [Liang et al., 2009] o neuronas [Ali et al., 2015]. Así, este efecto inhibitorio del NF- $\kappa$ B juega un papel primordial en la disminución del daño inflamatorio generado en células y tejidos [Li et al., 2005].

Aunque nuestros resultados demuestran que la melatonina reduce la fosforilación de IKK $\alpha$ , no podemos olvidar que no es la única subunidad catalítica implicada (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y todas ellas, con similares habilidades, para fosforilar la proteína I $\kappa$ B de forma redundante y solapada; algunos experimentos de mutagénesis dirigidos directamente al sitio proponen que IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  pueden poseer funciones reguladoras distintas [Ghosh and Karin, 2002; Olivotto et al, 2015]. Las dos kinasas centrales IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  activan al NF- $\kappa$ B que puede translocarse al núcleo y desde allí regular la expresión de genes diana específicos.

La ruta de señalización canónica conducida por IKK $\beta$  regula la mayoría de

respuestas de estrés/inflamatorias y modula, entre otras, la inflamación, apoptosis y proliferación. La ruta no canónica, controlada por IKK $\alpha$ , media la inmunidad adaptativa y participa en la supervivencia y en los procesos de diferenciación de diversos tipos celulares. Por lo tanto, las dos subunidades IKK catalíticas están implicadas en papeles complementarios necesarios para el control de la inflamación [Olivotto et al., 2015].

En resumen, este estudio revela que PMACI induce la activación de NF- $\kappa$ B y causa una inflamación citotóxica sobre los mastocitos, la cual podría ser mitigada por el tratamiento con MELx. Esta mitigación o mejoría es mostrada por la recuperación de la viabilidad celular por parte de los mastocitos y la disminución de los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 y MELn al medio.

## IMPLICACIONES CLÍNICAS

La localización de los mastocitos en los lugares expuestos al medioambiente y su proximidad a los vasos sanguíneos, coloca a estas células en la situación ideal para generar respuestas inflamatorias, de carácter defensivo, para el huésped.

La inflamación es un mecanismo de defensa que el sistema inmune pone en marcha para defendernos de infecciones por patógenos y otros estímulos externos, físicos o químicos, que podrían lesionar nuestras células y tejidos. Así pues, se trata de un proceso beneficioso para nuestro organismo, motivo por el cual el sistema inmune monta estrategias **redundantes y sinérgicas** para conseguir dicha inflamación. Una vez resuelto el estímulo injurioso o lesivo, el propio sistema inmune activa elementos reguladores que resuelven la inflamación inicial y permiten volver al equilibrio u homeostasis. La resolución del proceso inflamatorio, cuando la amenaza ya no existe, requiere de una fina orquestación en la que están implicados numerosos elementos del sistema inmune como por ejemplo citoquinas anti-inflamatorias, apoptosis, macrófagos polarizados al fenotipo M2, linfocitos T y B reguladores, etc. Los fallos en la resolución de la inflamación y la perseverancia de la misma, de forma crónica y mantenida en el tiempo, es la base de los mecanismos de acción de muchas enfermedades de entre las cuales podemos destacar las artritis, la enfermedad de Alzheimer, la obesidad, las alergias e incluso el cáncer [Varricchi et al., 2017; Ugucioni et al., 2017; Liu et al., 2017].

Encontrar productos naturales, fármacos o moléculas que puedan controlar el proceso inflamatorio activo, de forma espontánea, y evitar el mantenimiento y cronificación de la inflamación es el objetivo de muchos trabajos básicos y pre-clínicos de investigación, incluyendo el nuestro. De hecho, cada vez surgen más fármacos biológicos en el mercado cuya finalidad fundamental es actuar contra citoquinas pro-inflamatorias como, por ejemplo: anticuerpos monoclonales humanizados anti IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o IL-17. Esto, nos está indicando que aquellos fármacos capaces de bloquear la inflamación tienen numerosas aplicaciones en la

patología humana. En este sentido, hemos analizado a la melatonina, una molécula sintetizada y liberada por las propias células del sistema inmune, con capacidad inmunomoduladora de forma que podría realizar una efectiva transición de la fase pro-inflamatoria a la anti-inflamatoria, impulsando el proceso para una resolución eficaz. Es decir, inicialmente la melatonina actuaría como un mediador inflamatorio ó una citoquina pro-inflamatoria más para posteriormente, cuando la inflamación ha ejercido su función dejando de ser necesaria, y con carácter autocrino o paracrino frenarla. Sin embargo, existen limitaciones en el uso de estos fármacos, incluyendo a la melatonina, ya que debido a la **redundancia y sinergismo** con que el sistema inmune genera los mediadores inflamatorios, se hace muy difícil encontrar un fármaco que pueda bloquear y neutralizar todos los frentes y dianas, tanto del sistema inmune innato como específico, que están implicados en la inflamación y su cronificación.

En el caso de la melatonina podemos decir que aunque no bloquea la inflamación, al cien por cien, sí que actúa en varios frentes para contenerla, como por ejemplo: a) por su papel antioxidante, reduciendo los radicales libres procedentes del metabolismo del oxígeno y del nitrógeno; b) por su papel de citoprotección, mejorando el funcionamiento celular; c) por su papel inmunomodulador, estimulando o reduciendo la respuesta inmune; d) por su papel anti-inflamatorio, inhibiendo el factor nuclear NF- $\kappa$ B; etc., Por todo ello, consideramos que melatonina podría ser un co-tratamiento útil en los procesos patológicos que cursan con un exceso de inflamación.

# **CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral nos han permitido inferir las siguientes conclusiones:

1.- El estímulo químico con PMACI activa al mastocito de forma dosis y tiempo dependiente. Siendo los tiempos más prolongados de  $\geq 12:00h$  los más citotóxicos, haciendo que el mastocito entre en hiperestimulación y apoptosis.

2.- El pretratamiento exógeno de melatonina ejerce una acción citoprotectora y de mejora de la viabilidad celular, sobre los mastocitos estimulados, especialmente las dosis farmacológicas ( $\geq 1mM$ ), las cuales promueven la supervivencia celular.

2.1.- La citoprotección ejercida por el pretratamiento exógeno de melatonina  $1mM$ , fue revertida al usar Luzindol un antagonista no selectivo de los receptores de membrana de melatonina MT1 y MT2.

3.- La acción citoprotectora de melatonina es mediada vía receptor dependiente y receptor independiente.

4.- Los mastocitos estimulados con PMACI presentan un aumento en la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias, específicamente TNF- $\alpha$  e IL-6, con respecto a los mastocitos sin estimular.

5.- Los mastocitos estimulados con PMACI generan un aumento en la síntesis y liberación de melatonina endógena (MELn) liberándola al medio como si esta fuese una citoquina más.

6.- El pretratamiento exógeno de melatonina a dosis fisiológicas (100nM) y farmacológicas (1mM), sobre los mastocitos sin estimular o en reposo, no tiene ningún efecto sobre la síntesis y liberación de MELn, TNF- $\alpha$  e IL-6, tanto para la dosis fisiológica como para la farmacológica.

7.- El pretratamiento exógeno de melatonina (MELx) a dosis fisiológicas (100nM) y farmacológicas (1mM), sobre los mastocitos estimulados, disminuye la síntesis y liberación de TNF- $\alpha$  e IL-6 de forma estadísticamente significativa (\*\*p<0,001), tanto para la dosis fisiológica como para la farmacológica.

7.1.- La reducción de la síntesis y liberación de TNF- $\alpha$  e IL-6 por el mastocito activado, cuando se le somete al pretratamiento con melatonina exógena (MELx) fue revertida al usar Luzindol, un antagonista no selectivo de los receptores de membrana de melatonina MT1 y MT2, y lo hizo de forma estadísticamente significativa (\*\*p<0,001) tanto para la dosis fisiológica como para la farmacológica.

8.- El pretratamiento exógeno de melatonina a dosis fisiológicas (100nM) y farmacológicas (1mM), sobre los mastocitos estimulados, reduce la síntesis y liberación de melatonina endógena (MELn) de forma estadísticamente significativa (\*p<0.05) y (\*\*p<0,001) respectivamente para la dosis fisiológica y farmacológica.

8.1.-La reducción de la síntesis y liberación de melatonina endógena (MELn) por el mastocito activado, cuando se le somete al pretratamiento con melatonina exógena (MELx) fue revertida, aunque no enteramente, al usar Luzindol, un antagonista no selectivo de los receptores de membrana de melatonina MT1 y MT2, y lo hizo de forma estadísticamente significativa (\*p<0.05) para la dosis farmacológica 1mM de MELx.

9.- El pretratamiento exógeno de melatonina a dosis fisiológicas (100nM) y farmacológicas (1mM), sobre los mastocitos estimulados, inhibe la ruta de activación mastocitaria IKK/NF- $\kappa$ B de forma estadísticamente significativa (\*p<0.05) y (\*\*p<0,01) respectivamente para la dosis fisiológica y farmacológica, pudiendo ser este uno de los mecanismos de acción por el que melatonina ejerce su acción anti-inflamatoria sobre los mastocitos.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Baker, D. L., & Pober, J.S. (2002). *Inmunología celular y molecular*. 4<sup>o</sup> Ed. Iberoamericana-McGraw-Hill.
- Abrink, M., Grujic, M., & Pejler, G. (2004). Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40897–905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405856200>
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., León, J., Carazo, A., & Khaldy, H. (2003). Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 527, 549–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15206773>
- Acuña-Castroviejo, D., Martín, M., Macías, M., Escames, G., León, J., Khaldy, H., & Reiter, R. J. (2001). Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *Journal of Pineal Research*, 30(2), 65–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11270481>
- Ader, R., Cohen, N., & Felten, D. (1995). Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet (London, England)*, 345(8942), 99–103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7815892>
- Aderem, A. (1992). Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(10), 438–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1455513>
- Aimoto, T., Rohde, B. H., Chiou, G. C., & Lauber, J. K. (1985). N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *Journal of Ocular Pharmacology*, 1(2), 149–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3880072>
- Albertini, M. C., Radogna, F., Accorsi, A., Ugucioni, F., Paternoster, L., Cerella, C., ... Ghibelli, L. (2006). Intracellular Pro-oxidant Activity of Melatonin Deprives U937 Cells of Reduced Glutathione without Affecting Glutathione Peroxidase Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091(1), 10–16. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.050>
- Ali, T., Badshah, H., Kim, T. H., & Kim, M. O. (2015). Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- $\kappa$ B/JNK signaling pathway in aging mouse model. *Journal of Pineal Research*, 58(1), 71–85. <https://doi.org/10.1111/jpi.12194>
- Alonso, M., Collado, P. S., & González-Gallego, J. (2006). Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *Journal of Pineal Research*, 41(1), 8–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00323.x>
- Anderson, G., Kubera, M., Duda, W., Lasoń, W., Berk, M., & Maes, M. (2013). Increased IL-6 trans-signaling in depression: focus on the tryptophan catabolite pathway, melatonin and neuroprogression. *Pharmacological Reports: PR*, 65(6), 1647–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553013>
- André, E., Conquet, F., Steinmayr, M., Stratton, S. C., Porciatti, V., & Becker-André, M. (1998). Disruption of retinoid-related orphan receptor  $\beta$  changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *The EMBO Journal*, 17(14), 3867–3877. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3867>
- Anisimov, S. V, & Popovic, N. (2004). Genetic aspects of melatonin biology. *Reviews in the Neurosciences*, 15(3), 209–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357143>
- Axelrod, J. (1974). The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science (New York, N.Y.)*, 184(4144), 1341–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4151465>
- Axelrod, J., & Weissbach, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin.



- Science (New York, N.Y.), 131(3409), 1312. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13795316>
- Baeuerle, P. A., & Baichwal, V. R. (1997). NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Advances in Immunology*, 65, 111–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9238509>
- Bagchi, M., Balmoori, J., Ye, X., Bagchi, D., Ray, S. D., & Stohs, S. J. (2001). Protective effect of melatonin on naphthalene-induced oxidative stress and DNA damage in cultured macrophage J774A.1 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 221(1–2), 49–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506186>
- Baldessarini, R. J., & Kopin, I. J. (1966). S-adenosylmethionine in brain and other tissues. *Journal of Neurochemistry*, 13(8), 769–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5911850>
- Baler, R., Coon, S., & Klein, D. C. (1996). Orphan Nuclear Receptor RZR $\beta$ : Cyclic AMP Regulates Expression in the Pineal Gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220(3), 975–978. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0517>
- Ban, J. Y., Kim, B. S., Kim, S. C., Kim, D. H., & Chung, J.-H. (2011). Microarray Analysis of Gene Expression Profiles in Response to Treatment with Melatonin in Lipopolysaccharide Activated RAW 264.7 Cells. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 15(1), 23. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2011.15.1.23>
- Baram, D., Adachi, R., Medalia, O., Tuvim, M., Dickey, B. F., Mekori, Y. A., & Sagi-Eisenberg, R. (1999). Synaptotagmin II negatively regulates Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis of lysosomes in mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(10), 1649–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330444>
- Baram, D., Vaday, G. G., Salamon, P., Drucker, I., Hershkovich, R., & Mekori, Y. A. (2001). Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(7), 4008–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11564820>
- Barbu, E. A., Zhang, J., Berenstein, E. H., Groves, J. R., Parks, L. M., & Siraganian, R. P. (2012). The Transcription Factor Zeb2 Regulates Signaling in Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 188(12), 6278–6286. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102660>
- Barjavel, M. J., Mamdouh, Z., Raghbate, N., & Bakouche, O. (1998). Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(3), 1191–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570533>
- Barrett, P., Conway, S., & Morgan, P. J. (2003). Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *Journal of Pineal Research*, 35(4), 221–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521626>
- Bauer, S., Kerr, B. J., & Patterson, P. H. (2007). The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(3), 221–232. <https://doi.org/10.1038/nrn2054>
- Baydas, G., Reiter, R. J., Akbulut, M., Tuzcu, M., & Tamer, S. (2005). Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience*, 135(3), 879–886. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.05.048>
- Bazan, J. F. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunology Today*, 11(10), 350–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2171545>
- Bazan, J. F. (1991). Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron*, 7(2), 197–208.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1714745>
- Becker-André, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J. H., & Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28531–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961794>
- Bejarano, I., Espino, J., Marchena, A. M., Barriga, C., Paredes, S. D., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2011). Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 353(1–2), 167–176. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0783-8>
- Benditt, E. P., & Arase, M. (1959). An enzyme in mast cells with properties like chymotrypsin. *The Journal of Experimental Medicine*, 110, 451–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13798801>
- Benítez-King, G., Ríos, A., Martínez, A., & Antón-Tay, F. (1996). In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1290(2), 191–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8645723>
- Beutler, B., Mahoney, J., Le Trang, N., Pekala, P., & Cerami, A. (1985). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 161(5), 984–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3872925>
- Bitencourt, C. S., Bessi, V. L., Huynh, D. N., Ménard, L., Lefebvre, J. S., Lévesque, T., ... Marleau, S. (2013). Cooperative role of endogenous leucotrienes and platelet-activating factor in ischaemia-reperfusion-mediated tissue injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(12), 1554–1565. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12118>
- Blalock, J. E. (2005). The immune system as the sixth sense. *Journal of Internal Medicine*, 257(2), 126–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01441.x>
- Bouhafs, R. K. L., & Jarstrand, C. (2002). Effects of antioxidants on surfactant peroxidation by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radical Research*, 36(7), 727–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12180122>
- Bowie, A., & O'Neill, L. A. J. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(4), 508–514. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.508>
- Bradding, P., Feather, I. H., Howarth, P. H., Mueller, R., Roberts, J. A., Britten, K., ... Heusser, C. H. (1992). Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(5), 1381–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402683>
- Bradding, P., Feather, I. H., Wilson, S., Bardin, P. G., Heusser, C. H., Holgate, S. T., & Howarth, P. H. (1993). Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 151(7), 3853–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376806>
- Brochetta, C., Suzuki, R., Vita, F., Soranzo, M. R., Claver, J., Madjene, L. C., ... Blank, U. (2014). Munc18-2 and Syntaxin 3 Control Distinct Essential Steps in Mast Cell Degranulation. *The Journal of Immunology*, 192(1), 41–51. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301277>
- Broxmeyer, H. E., Williams, D. E., Lu, L., Cooper, S., Anderson, S. L., Beyer, G. S., ... Rubin, B. Y. (1986). The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of

- tumor necrosis factor and interferon-gamma. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 136(12), 4487–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086433>
- Bruck, R., Aeed, H., Avni, Y., Shirin, H., Matas, Z., Shahmurov, M., ... Hochman, A. (2004). Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *Journal of Hepatology*, 40(1), 86–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672618>
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., ... Jockers, R. (1999). Dual Signaling of Human Mella Melatonin Receptors via G i2 , G i3 , and G q/11 Proteins. *Molecular Endocrinology*, 13(12), 2025–2038. <https://doi.org/10.1210/mend.13.12.0390>
- Bubenik, G. A. (1980). Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Hormone Research*, 12(6), 313–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6998853>
- Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., ... Volpe, F. (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nature Cell Biology*, 2(6), 346–351. <https://doi.org/10.1038/35014038>
- Caelles, C. (2017). La inflamación, primera línea de defensa o caballo de Troya. [https://doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_ANC.2017.06.1](https://doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2017.06.1)
- Calvo, J. R., González-Yanes, C., & Maldonado, M. D. (2013). The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. *Journal of Pineal Research*, 55(2), 103–120. <https://doi.org/10.1111/jpi.12075>
- Calvo, J. R., Rafii-el-Idrissi, M., Pozo, D., & Guerrero, J. M. (1995). Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *Journal of Pineal Research*, 18(3), 119–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7562368>
- Cardinali, D. P., Vacas, M. I., & Gejman, P. V. (1981). The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. *Journal of Neural Transmission*, 52(1–2), 1–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7026734>
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J. K., DeLamararter, J. F., & Becker-André, M. (1994). RZR<sub>s</sub>, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Molecular Endocrinology*, 8(6), 757–770. <https://doi.org/10.1210/mend.8.6.7935491>
- Ceraulo, L., Ferrugia, M., Tesoriere, L., Segreto, S., Livrea, M. A., & Turco Liveri, V. (1999). Interactions of melatonin with membrane models: portioning of melatonin in AOT and lecithin reversed micelles. *Journal of Pineal Research*, 26(2), 108–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100737>
- Chan, A. S. L., Lai, F. P. L., Lo, R. K. H., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Stanbridge, E. J., & Wong, Y. H. (2002). Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cellular Signalling*, 14(3), 249–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812653>
- Chang, C.-C., Tien, C.-H., Lee, E.-J., Juan, W.-S., Chen, Y.-H., Hung, Y.-C., ... Wu, T.-S. (2012). Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation in the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 and BV2 cells and a mouse model of meningitis. *Journal of Pineal Research*, 53(2), 188–197. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00986.x>
- Chaudhary, P. M., Ferguson, C., Nguyen, V., Nguyen, O., Massa, H. F., Eby, M., ... Nelson, P. S. (1998). Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4:

- evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood*, 91, 4020–4027.
- Chen, H.-M., Hsu, J.-T., Chen, J.-C., Ng, C.-J., Chiu, D.-F., & Chen, M.-F. (2005). Delayed neutrophil apoptosis attenuated by melatonin in human acute pancreatitis. *Pancreas*, 31(4), 360–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258371>
- Chen, H., Centola, M., Altschul, S. F., & Metzger, H. (1998). Characterization of gene expression in resting and activated mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(9), 1657–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802978>
- Cheng, L., Liu, J., Liu, Q., Liu, Y., Fan, L., Wang, F., ... Sun, G. (2017). Exosomes from Melatonin Treated Hepatocellularcarcinoma Cells Alter the Immunosuppression Status through STAT3 Pathway in Macrophages. *International Journal of Biological Sciences*, 13(6), 723–734. <https://doi.org/10.7150/ijbs.19642>
- Choy, E. (2004). Clinical experience with inhibition of interleukin-6. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 30(2), 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2004.01.008>
- Chuang, J. I., Mohan, N., Meltz, M. L., & Reiter, R. J. (1996). Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biology International*, 20(10), 687–92. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0091>
- Cikler, E., Ercan, F., Cetinel, S., Contuk, G., & Sener, G. (2005). The protective effects of melatonin against water avoidance stress-induced mast cell degranulation in dermis. *Acta Histochemica*, 106(6), 467–75. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2004.10.001>
- Coon, S. L., Mazuruk, K., Bernard, M., Roseboom, P. H., Klein, D. C., & Rodriguez, I. R. (1996). The Human SerotoninN-Acetyltransferase (EC 2.3.1.87) Gene (AANAT): Structure, Chromosomal Localization, and Tissue Expression. *Genomics*, 34(1), 76–84. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0243>
- Crivellato, E., Beltrami, C. A., Mallardi, F., & Ribatti, D. (2003). Paul Ehrlich's doctoral thesis: A milestone in the study of mast cells. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04573.x>
- Crivellato, E., Travan, L., & Ribatti, D. (2015). The Phylogenetic Profile of Mast Cells. In *Methods in molecular biology* (Vol. 1220, pp. 11–27). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_2)
- Currier, N. L., Sun, L. Z., & Miller, S. C. (2000). Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *Journal of Neuroimmunology*, 104(2), 101–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713348>
- Cutolo, M., Villaggio, B., Candido, F., Valenti, S., Giusti, M., Felli, L., ... Accardo, S. (1999). Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages and THP-1 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876, 246–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415616>
- Cuzzocrea, S., Costantino, G., & Caputi, A. P. (1998a). Protective effect of melatonin on cellular energy depletion mediated by peroxynitrite and poly (ADP-ribose) synthetase activation in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. *Journal of Pineal Research*, 25(2), 78–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755028>
- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Costantino, G., & Caputi, A. R. (1998b). Protective effect of melatonin in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. *Journal of Pineal Research*, 25(1), 24–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1998.tb00382.x>
- da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*,

- 62(10), 698–738. <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
- Das, A., Belagodu, A., Reiter, R. J., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2008). Cytoprotective effects of melatonin on C6 astroglial cells exposed to glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Journal of Pineal Research*, 45(2), 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00582.x>
- del Gobbo, V., Libri, V., Villani, N., Caliò, R., & Nisticò, G. (1989). Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 11(5), 567–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2807631>
- Deng, W.-G., Tang, S.-T., Tseng, H.-P., & Wu, K. K. (2006). Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood*, 108(2), 518–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3691>
- Deng, Z., Zink, T., Chen, H., Walters, D., Liu, F., & Liu, G. (2009). Impact of Actin Rearrangement and Degranulation on the Membrane Structure of Primary Mast Cells: A Combined Atomic Force and Laser Scanning Confocal Microscopy Investigation. *Biophysical Journal*, 96(4), 1629–1639. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.015>
- Drews, J. (2004). Timeline: Paul Ehrlich: Magister Mundi. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(9), 797–801. <https://doi.org/10.1038/nrd1498>
- Dubocovich, M. L., Rivera-Bermudez, M. A., Gerdin, M. J., & Masana, M. I. (2003). Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 8, d1093-d1108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957828>
- Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-Ghoul, W. M., Benloucif, S., & Masana, M. I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(12), 1211–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737724>
- Duncan, M. J., Takahashi, J. S., & Dubocovich, M. L. (1989). Characteristics and Autoradiographic Localization of 2-[ 125 I]Iodomelatonin Binding Sites in Djungarian Hamster Brain\*. *Endocrinology*, 125(2), 1011–1018. <https://doi.org/10.1210/endo-125-2-1011>
- Dvorak, A. M. (2005). Piecemeal Degranulation of Basophils and Mast Cells Is Effected by Vesicular Transport of Stored Secretory Granule Contents. In *Ultrastructure of Mast Cells and Basophils* (Vol. 85, pp. 135–184). <https://doi.org/10.1159/000086516>
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M. R., & Reppert, S. M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), 6133–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517042>
- Eck, M. J., & Sprang, S. R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 17595–605. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2551905>
- Eisenhut, M., & Choudhury, S. (2017). In Premature Newborns Intraventricular Hemorrhage Causes Cerebral Vasospasm and Associated Neurodisability via Heme-Induced Inflammation-Mediated Interleukin-1 Production and Nitric Oxide Depletion. *Frontiers in Neurology*, 8, 423. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00423>
- Enoksson, M., Lyberg, K., Möller-Westerberg, C., Fallon, P. G., Nilsson, G., & Lunderius-Andersson, C. (2011). Mast cells as sensors of cell injury through IL-33 recognition. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 186(4), 2523–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003383>

- Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1254–1266. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>
- Espino, J., Bejarano, I., Paredes, S. D., Barriga, C., Reiter, R. J., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2011). Melatonin is able to delay endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in leukocytes from elderly humans. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 33(4), 497–507. <https://doi.org/10.1007/s11357-010-9194-0>
- Espino, J., Bejarano, I., Paredes, S. D., González, D., Barriga, C., Reiter, R. J., ... Rodríguez, A. B. (2010a). Melatonin counteracts alterations in oxidative metabolism and cell viability induced by intracellular calcium overload in human leucocytes: changes with age. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107(1), 590–7. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00546.x>
- Espino, J., Bejarano, I., Redondo, P. C., Rosado, J. A., Barriga, C., Reiter, R. J., ... Rodríguez, A. B. (2010b). Melatonin Reduces Apoptosis Induced by Calcium Signaling in Human Leukocytes: Evidence for the Involvement of Mitochondria and Bax Activation. *Journal of Membrane Biology*, 233(1–3), 105–118. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9230-0>
- Evsukova, E. V., Okuneva, E. I., Zubzhitskaia, L. B., & Kvetnoi, I. M. (2008). [Melatonin expression in nasal polyps in patients with asthmatic triad]. *Arkhiv Patologii*, 70(3), 33–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18727430>
- Fauci, A. S., & Langford, C. A. (2016). *Harrison's rheumatology*.(4ed.). McGraw-Hill Professional.
- Fernandes, G., Carandente, F., Halberg, E., Halberg, F., & Good, R. A. (1979). Circadian rhythm in activity of lympholytic natural killer cells from spleens of Fischer rats. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 123(2), 622–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/458152>
- Fischer, T. W., Scholz, G., Knöll, B., Hipler, U. C., & Elsner, P. (2001). Melatonin reduces UV-induced reactive oxygen species in a dose-dependent manner in IL-3-stimulated leukocytes. *Journal of Pineal Research*, 31(1), 39–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11485003>
- Fjaerli, O., Lund, T., & Osterud, B. (1999). The effect of melatonin on cellular activation processes in human blood. *Journal of Pineal Research*, 26(1), 50–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102760>
- Föger, N., Jenckel, A., Orinska, Z., Lee, K.-H., Chan, A. C., & Bulfone-Paus, S. (2011). Differential regulation of mast cell degranulation versus cytokine secretion by the actin regulatory proteins Coronin1a and Coronin1b. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(9), 1777–87. <https://doi.org/10.1084/jem.20101757>
- Funaba, M., Ikeda, T., & Abe, M. (2003). Degranulation in RBL-2H3 cells: regulation by calmodulin pathway. *Cell Biology International*, 27(10), 879–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499669>
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M. M., & Tsai, M. (2005). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: Recent Advances. *Annual Review of Immunology*, 23, 749–786. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025>
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2010). Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *European Journal of Immunology*, 40(7), 1843–51. <https://doi.org/10.1002/eji.201040559>
- Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), 445–54. <https://doi.org/10.1038/nature07204>

- Galli, S. J., & Wershil, B. K. (1996). The two faces of the mast cell. *Nature*, 381(6577), 21–2. <https://doi.org/10.1038/381021a0>
- Ganguly, S., Gastel, J. A., Weller, J. L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M. A. A., ... Klein, D. C. (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), 8083–8088. <https://doi.org/10.1073/pnas.141118798>
- García-Faroldi, G., Melo, F. R., Ronnberg, E., Grujic, M., & Pejler, G. (2013a). Active Caspase-3 Is Stored within Secretory Compartments of Viable Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 191(3), 1445–1452. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300216>
- García-Faroldi, G., Rönnerberg, E., Orro, A., Calounova, G., Guss, B., Lundequist, A., & Pejler, G. (2013b). ADAMTS: Novel proteases expressed by activated mast cells. *Biological Chemistry*, 394(2), 291–305. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0270>
- García-Mauriño, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Rafii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., & Guerrero, J. M. (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(2), 574–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218571>
- García-Mauriño, S., Pozo, D., Calvo, J. R., & Guerrero, J. M. (2000). Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *Journal of Pineal Research*, 29(3), 129–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034109>
- García-Mauriño, S., Pozo, D., Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., & Guerrero, J. M. (1999). Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sciences*, 65(20), 2143–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10579467>
- García-Pergañeda, A., Guerrero, J. M., Rafii-El-Idrissi, M., Paz Romero, M., Pozo, D., & Calvo, J. R. (1999). Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Journal of Neuroimmunology*, 95(1–2), 85–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229118>
- Geary, G. G., Duckles, S. P., & Krause, D. N. (1998). Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K<sup>+</sup> channels and endothelial factors. *British Journal of Pharmacology*, 123(8), 1533–1540. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701761>
- Geary, G. G., Krause, D. N., & Duckles, S. P. (1997). Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *The American Journal of Physiology*, 273(3 Pt 2), H1530–6. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.3.H1530>
- Genovese, T., Paola, R. Di, Mazzon, E., Muià, C., Caputi, A. P., & Cuzzocrea, S. (2005). Melatonin limits lung injury in bleomycin treated mice. *Journal of Pineal Research*, 39(2), 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00229.x>
- Gentiletti, J., & Fava, R. A. (2003). Does vascular endothelial growth factor play a role in interleukin-6 receptor antagonist therapy for rheumatoid arthritis? *Arthritis & Rheumatism*, 48(6), 1471–1474. <https://doi.org/10.1002/art.11043>
- Ghosh, S., & Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF-κB by phosphorylation of its inhibitor IκB. *Nature*, 344(6267), 678–682. <https://doi.org/10.1038/344678a0>
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983155>

- Giguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M., & Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes & Development*, 8(5), 538–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926749>
- Gilad, E., Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Salzman, A. L., & Szabó, C. (1997). Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sciences*, 60(10), PL169-74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9064472>
- Gilad, E., Wong, H. R., Zingarelli, B., Virág, L., O'Connor, M., Salzman, A. L., & Szabó, C. (1998). Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(9), 685–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619447>
- Glenner, G. G., & Cohen, L. A. (1960). Histochemical Demonstration of a Species-Specific Trypsin-like Enzyme in Mast Cells. *Nature*, 185(4716), 846–847. <https://doi.org/10.1038/185846a0>
- Gordon, J. R., Burd, P. R., & Galli, S. J. (1990). Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today*. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90176-A](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90176-A)
- Grace, M. S., Cahill, G. M., & Besharse, J. C. (1991). Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Research*, 559(1), 56–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1782560>
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 415–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>
- Guerrero, J. M., & Reiter, R. J. (2002). Melatonin-immune system relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2), 167–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11899099>
- Guo, Z., Turner, C., & Castle, D. (1998). Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell*, 94(4), 537–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727496>
- Haas, R., Heinrich, P. C., & Sasse, D. (1979). Proteolytic enzymes of rat liver mitochondria. Evidence for a mast cell origin. *FEBS Letters*, 103(1), 168–171. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81274-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81274-0)
- Haldar, C., Häussler, D., & Gupta, D. (1992). Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. *Journal of Pineal Research*, 12(2), 79–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1578339>
- Hardeland, R. (2009). Melatonin: Signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *BioFactors*, 35(2), 183–192. <https://doi.org/10.1002/biof.23>
- Hardeland, R., & Poeggeler, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34(4), 233–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12662344>
- Hardeland, R., & Poeggeler, B. (2007). Actions of Melatonin, Its Structural and Functional Analogs in the Central Nervous System and the Significance of Metabolism. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 7(4), 289–303. <https://doi.org/10.2174/187152407783220823>
- Hardeland, R., Reiter, R. J., Poeggeler, B., & Tan, D. X. (1993). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(3), 347–57.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical*



- Journal, 374(Pt 1), 1–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical Journal*, 334 ( Pt 2), 297–314. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716487>
- Herxheimer, A., & Petrie, K. J. (2002). Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. In A. Herxheimer (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews* (p. CD001520). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001520>
- Hirose, T., Smith, R. J., & Jetten, A. M. (1994). ROR- $\gamma$ : The Third Member of ROR/RZR Orphan Receptor Subfamily That Is Highly Expressed in Skeletal Muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205(3), 1976–1983. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2902>
- Hitomi, T., Zhang, J., Nicoletti, L. M., Grodzki, A. C. G., Jamur, M. C., Oliver, C., & Siraganian, R. P. (2004). Phospholipase D1 regulates high-affinity IgE receptor-induced mast cell degranulation. *Blood*, 104(13), 4122–4128. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2091>
- Holaska, J. M., Black, B. E., Love, D. C., Hanover, J. A., Leszyk, J., & Paschal, B. M. (2001). Calreticulin Is a receptor for nuclear export. *The Journal of Cell Biology*, 152(1), 127–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11149926>
- Hriscu, M. L. (2005). Modulatory Factors of Circadian Phagocytic Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1057(1), 403–430. <https://doi.org/10.1196/annals.1356.032>
- Hriscu, M., Saulea, G., Ostriceanu, S., & Baci, I. (2002). Circadian phagocytic activity in rats under light-dark and constant light regimens. *Romanian Journal of Physiology : Physiological Sciences*, 39–40, 17–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15984664>
- Hsu, Y. R., Narachi, M., Davis, J. M., Hennigan, P., Goldman, R. A., Geis, A., ... Arakawa, T. (1986). Conformation and biological activity of TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  analogs. *Lymphokine Research*, 5 Suppl 1, S133-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3784608>
- Hu, Z.-P., Fang, X.-L., Fang, N., Wang, X.-B., Qian, H.-Y., Cao, Z., ... Wang, Y. (2013). Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF- $\kappa$ B system in high-fat-fed rabbits. *Journal of Pineal Research*, 55(4), 388–398. <https://doi.org/10.1111/jpi.12085>
- Huang, S.-H., Cao, X., & Wei, W. (2008). Melatonin decreases TLR3-mediated inflammatory factor expression via inhibition of NF- $\kappa$ B activation in respiratory syncytial virus-infected RAW264.7 macrophages. *Journal of Pineal Research*, 45(1), 93–100. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00560.x>
- Huether, G., Poeggeler, B., Reimer, A., & George, A. (1992). Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sciences*, 51(12), 945–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1518369>
- Imbesi, M., Arslan, A. D., Yildiz, S., Sharma, R., Gavin, D., Tun, N., ... Uz, T. (2009). The melatonin receptor MT1 is required for the differential regulatory actions of melatonin on neuronal “clock” gene expression in striatal neurons in vitro. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 87–94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00634.x>
- Itoh, M. T., Ishizuka, B., Kudo, Y., Fusama, S., Amemiya, A., & Sumi, Y. (1997). Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 136(1), 7–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9510062>

- Izzo, G., d'Istria, M., Serino, I., & Minucci, S. (2004). Inhibition of the increased 17beta-estradiol-induced mast cell number by melatonin in the testis of the frog *Rana esculenta*, in vivo and in vitro. *The Journal of Experimental Biology*, 207(Pt 3), 437–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691091>
- Jamur, M. C., Grodzki, A. C. G., Berenstein, E. H., Hamawy, M. M., Siraganian, R. P., & Oliver, C. (2005). Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood*, 105(11), 4282–4289. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0756>
- Janeway, C., Murphy, K. P., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Inmunobiología de Janeway*. McGraw-Hill.
- Jia, X.-W., Yuan, Y.-D., Yao, Z.-X., Wu, C.-J., Chen, X., Chen, X.-H., ... Shao, J. (2017). Association between IL-4 and IL-4R Polymorphisms and Periodontitis: A Meta-Analysis. *Disease Markers*, 2017, 8021279. <https://doi.org/10.1155/2017/8021279>
- Kadena, M., Kumagai, Y., Vandenbon, A., Matsushima, H., Fukamachi, H., Maruta, N., ... Kuwata, H. (2017). Microarray and gene co-expression analysis reveals that melatonin attenuates immune responses and modulates actin rearrangement in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485(2), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.063>
- Kalesnikoff, J., & Galli, S. J. (2008). New developments in mast cell biology. *Nature Immunology*, 9(11), 1215–23. <https://doi.org/10.1038/ni.f.216>
- Kane, C. D., & Means, a R. (2000). Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *The EMBO Journal*, 19, 691–701. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.691>
- Kang, Y.-S., Kang, Y.-G., Park, H.-J., Wee, H.-J., Jang, H.-O., Bae, M.-K., & Bae, S.-K. (2013). Melatonin inhibits visfatin-induced inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *Journal of Pineal Research*, 55(3), 294–303. <https://doi.org/10.1111/jpi.12072>
- Karasek, M., Carrillo-Vico, A., Guerrero, J.M., Winczyk, K., Pawlikowski, M. Expression of melatonin MT1 and MT2 receptors, and RORalpha1 receptor in... (2002). [https://www.researchgate.net/publication/11353152\\_Expression\\_of\\_melatonin\\_MT1\\_and\\_MT2\\_receptors\\_and\\_ROR1\\_receptor\\_in\\_transplantable\\_murine\\_Colon\\_38\\_cancer](https://www.researchgate.net/publication/11353152_Expression_of_melatonin_MT1_and_MT2_receptors_and_ROR1_receptor_in_transplantable_murine_Colon_38_cancer)
- Karownik, M., Reiter, R. J., Garcia, J. J., Tan, D. X., Qi, W., & Manchester, L. C. (2000). Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by  $\delta$ -aminolevulinic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1523(2–3), 140–146. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00110-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00110-0)
- Kawakami, M., & Cerami, A. (1981). Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 154(3), 631–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7276825>
- Kim, H.-H., Park, S.-B., Lee, S., Kwon, T. K., Shin, T.-Y., Park, P.-H., ... Kim, S.-H. (2014). Inhibitory effect of putranjivain A on allergic inflammation through suppression of mast cell activation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(3), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.12.006>
- Kim, S.-H., Jun, C.-D., Suk, K., Choi, B.-J., Lim, H., Park, S., ... Shin, T.-Y. (2006). Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. *Toxicological Sciences*, 91(1), 123–131. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj063>
- Kim, S.-J., Lee, G.-Y., Jung, J.-W., Oh, S.-R., Ahn, E.-M., Kim, S.-H., ... Um, J.-Y. (2013). The

- Ameliorative Effect of Sophoricoside on Mast Cell-Mediated Allergic Inflammation in Vivo and in Vitro. *Molecules*, 18(5), 6113–6127. <https://doi.org/10.3390/molecules18056113>
- Kim, Y. O., Ahn, Y. K., & Kim, J. H. (2000a). Influence of melatonin on immunotoxicity of cadmium. *International Journal of Immunopharmacology*, 22(4), 275–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689101>
- Kim, Y. O., Pyo, M. Y., & Kim, J. H. (2000b). Influence of melatonin on immunotoxicity of lead. *International Journal of Immunopharmacology*, 22(10), 821–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963854>
- Klebanoff, S. J., Vadas, M. A., Harlan, J. M., Sparks, L. H., Gamble, J. R., Agosti, J. M., & Waltersdorff, A. M. (1986). Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 136(11), 4220–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3009619>
- Klein, D. C., Ganguly, S., Coon, S., Weller, J. L., Obsil, T., Hickman, A., & Dyda, F. (2002). 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 365–73. <https://doi.org/10.1042/>
- Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C. A., & Ghosh, S. (1999). ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes & Development*, 13(16), 2059–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10465784>
- Kruithof, E. K., Satta, N., Liu, J., Dunoyer-Geindre, S., & Fish, R. J. (2007). Gene conversion limits divergence of mammalian TLR1 and TLR6. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 148. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-148>
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., & Wood, J. G. (2015). Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers in Immunology*, 6, 620. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>
- Kvetnoy, I. M. (1999). Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *The Histochemical Journal*, 31(1), 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405817>
- Kvetnoy, I. M., Yuzhakov, V. V., Sandvik, A. K., & Waldum, H. L. (1997). Melatonin in mast cells and tumor radiosensitivity. *Journal of Pineal Research*, 22(3), 169–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9213271>
- Lapage, G. (1952). Paul Ehrlich. *Nature*, 169(4296), 362. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14919570>
- Laudon, M., & Zisapel, N. (1986). Characterization of central melatonin receptors using 125I-melatonin. *FEBS Letters*, 197(1–2), 9–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419172>
- Lerner, A. B., Case, J. D., & Takahashi, Y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 1992–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14415935>
- Lewiński, A., Zelazowski, P., Sewerynek, E., Zerek-Mełeń, G., Szkudliński, M., & Zelazowska, E. (1989). Melatonin-induced suppression of human lymphocyte natural killer activity in vitro. *Journal of Pineal Research*, 7(2), 153–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2769568>
- Lewy, A. J., Wehr, T. A., Goodwin, F. K., Newsome, D. A., & Markey, S. P. (1980). Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4475), 1267–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7434030>
- Li, J.-H., Yu, J.-P., Yu, H.-G., Xu, X.-M., Yu, L.-L., Liu, J., & Luo, H.-S. (2005). Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. *Mediators of Inflammation*, 2005(4), 185–93. <https://doi.org/10.1155/MI.2005.185>

- Liang, R., Nickkholgh, A., Hoffmann, K., Kern, M., Schneider, H., Sobirey, M., ... Schemmer, P. (2009). Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 8–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00596.x>
- Ling, L., Cao, Z., & Goeddel, D. V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3792–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520446>
- Lippert, U., Möller, A., Welker, P., Artuc, M., & Henz, B. M. (2000). Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H1- and H2-receptor antagonists. *Experimental Dermatology*, 9(2), 118–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10772385>
- Lissoni, P. (1999). The pineal gland as a central regulator of cytokine network. *Neuro Endocrinology Letters*, 20(6), 343–349. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458197>
- Lissoni, P., Barni, S., Ardizzoia, A., Brivio, F., Tancini, G., Conti, A., & Maestroni, G. J. (1992). Immunological effects of a single evening subcutaneous injection of low-dose interleukin-2 in association with the pineal hormone melatonin in advanced cancer patients. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 6(4), 132–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1296454>
- Lissoni, P., Barni, S., Tancini, G., Brivio, F., Tisi, E., Zubelewicz, B., & Braczkowski, R. (1994). Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implication in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 8(4), 126–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7660855>
- Lissoni, P., Barni, S., Tancini, G., Rovelli, F., Ardizzoia, A., Conti, A., & Maestroni, G. J. (1993). A study of the mechanisms involved in the immunostimulatory action of the pineal hormone in cancer patients. *Oncology*, 50(6), 399–402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8233281>
- Lissoni, P., Pittalis, S., Rovelli, F., Roselli, M., & Ardizzoia, A. (1996). Modulation of cytokine production from TH2-lymphocytes and monocytes by the pineal neurohormone melatonin. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.3.3.541>
- Lissoni, P., Rovelli, F., Brivio, F., Brivio, O., & Fumagalli, L. (1998). Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Natural Immunity*, 16(1), 1–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789119>
- Liu, Z., Gan, L., Xu, Y., Luo, D., Ren, Q., Wu, S., & Sun, C. (2017). Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF-κB/GSDMD signal in mice adipose tissue. *Journal of Pineal Research*, 63, 1–17. <https://doi.org/10.1111/jpi.12414>
- Liu, Z., Gan, L., Zhang, T., Ren, Q., & Sun, C. (2018). Melatonin alleviates adipose inflammation through elevating α-ketoglutarate and diverting adipose-derived exosomes to macrophages in mice. *Journal of Pineal Research*, 64(1), e12455. <https://doi.org/10.1111/jpi.12455>
- Long, D. J., Iskander, K., Gaikwad, A., Arin, M., Roop, D. R., Knox, R., ... Jaiswal, A. K. (2002). Disruption of Dihyronicotinamide Riboside:Quinone Oxidoreductase 2 (NQO2) Leads to Myeloid Hyperplasia of Bone Marrow and Decreased Sensitivity to Menadione Toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46131–46139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208675200>
- Lotufo, C. M. C., Yamashita, C. E., Farsky, S. H. P., & Markus, R. P. (2006). Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *European Journal of Pharmacology*, 534(1–3), 258–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612844>
- Lotufo, C. M., Lopes, C., Dubocovich, M. L., Farsky, S. H., & Markus, R. P. (2001). Melatonin and

- N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *European Journal of Pharmacology*, 430(2–3), 351–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711054>
- Luchetti, F., Betti, M., Canonico, B., Arcangeletti, M., Ferri, P., Galli, F., & Papa, S. (2009). ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(3), 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.017>
- Luchetti, F., Canonico, B., Curci, R., Battistelli, M., Mannello, F., Papa, S., ... Falcieri, E. (2006). Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. *Journal of Pineal Research*, 40(2), 158–167. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00293.x>
- MacKenzie, R. S., Melan, M. A., Passey, D. K., & Witt-Enderby, P. A. (2002). Dual coupling of MT1 and MT2 melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochemical Pharmacology*, 63(4), 587–595. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00881-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00881-4)
- Mackowiak, P. A. (1998). Concepts of fever. *Archives of Internal Medicine*, 158(17), 1870–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759682>
- Maestroni, G. J. M., Sulli, A., Pizzorni, C., Villaggio, B., & Cutolo, M. (2002). Melatonin in rheumatoid arthritis: synovial macrophages show melatonin receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966, 271–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114283>
- Mahle, C. D., Goggins, G. D., Agarwal, P., Ryan, E., & Watson, A. J. (1997). Melatonin Modulates Vascular Smooth Muscle Tone. *Journal of Biological Rhythms*, 12(6), 690–696. <https://doi.org/10.1177/074873049701200626>
- Maldonado, M. D., Garcia-Moreno, H., & Calvo, J. R. (2013). Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: Possible clinical use. *Journal of Neuroimmunology*, 262(1–2), 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.06.013>
- Maldonado, M. D., García-Moreno, H., González-Yanes, C., & Calvo, J. R. (2016). Possible Involvement of the Inhibition of NF-κB Factor in Anti-Inflammatory Actions That Melatonin Exerts on Mast Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(8), 1926–1933. <https://doi.org/10.1002/jcb.25491>
- Maldonado, M. D., Manfredi, M., Ribas-Serna, J., Garcia-Moreno, H., & Calvo, J. R. (2012). Melatonin administrated immediately before an intense exercise reverses oxidative stress, improves immunological defenses and lipid metabolism in football players. *Physiology & Behavior*, 105(5), 1099–1103. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.015>
- Maldonado, M. D., Mora-Santos, M., Naji, L., Carrascosa-Salmoral, M. P., Naranjo, M. C., & Calvo, J. R. (2010). Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacological Research*, 62(3), 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.014>
- Maldonado, M. D., Moreno, H., & Calvo, J. R. (2009). Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 28(2), 188–91. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.02.001>
- Manna, S. K., Zhang, H. J., Yan, T., Oberley, L. W., & Aggarwal, B. B. (1998). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13245–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582369>
- Markus, R., Cecon, E., & Pires-Lapa, M. (2013). Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor κB (NF-κB)

- Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 10979–10997. <https://doi.org/10.3390/ijms140610979>
- Markus, R. P., Ferreira, Z. S., Fernandes, P. A. C. M., & Cecon, E. (2007). The Immune-Pineal Axis: A Shuttle between Endocrine and Paracrine Melatonin Sources. *Neuroimmunomodulation*, 14(3–4), 126–133. <https://doi.org/10.1159/000110635>
- Martín, M., Macías, M., Escames, G., Reiter, R. J., Agapito, M. T., Ortiz, G. G., & Acuña-Castroviejo, D. (2000). Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *Journal of Pineal Research*, 28(4), 242–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831160>
- Martins, E., Ferreira, A. C. F., Skorupa, A. L., Afeche, S. C., Cipolla-Neto, J., & Costa Rosa, L. F. B. P. (2004). Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(6), 1116–1121. <https://doi.org/10.1189/jlb.1203614>
- Masana, M. I., & Dubocovich, M. L. (2001). Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path Through the Dark. *Science Signaling*, 2001(107), pe39-pe39. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.107.pe39>
- McCord, C. P., & Allen, F. P. (1917). Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Journal of Experimental Zoology*, 23(1), 207–224. <https://doi.org/10.1002/jez.1400230108>
- Melchiorri, D., Reiter, R. J., Attia, A. M., Hara, M., Burgos, A., & Nistico, G. (1995). Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sciences*, 56(2), 83–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823762>
- Melicoff, E., Sansores-Garcia, L., Gomez, A., Moreira, D. C., Datta, P., Thakur, P., ... Adachi, R. (2009). Synaptotagmin-2 Controls Regulated Exocytosis but Not Other Secretory Responses of Mast Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19445–19451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002550>
- Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos, M. I., & Tan, D. (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: Immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(4), 373–382. <https://doi.org/10.1002/jcb.240530415>
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., ... Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5339), 860–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9346484>
- Metcalfe, D. D., & Boyce, J. A. (2006). Mast cell biology in evolution. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(6), 1227–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.03.031>
- Missbach, M., Jagher, B., Sigg, I., Nayeri, S., Carlberg, G., & Wiesenberg, I. (1996). Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$  with potent antiarthritic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 13515–13522. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13515>
- Mizuno, K., Tolmachova, T., Ushakov, D. S., Romao, M., Åbrink, M., Ferenczi, M. A., ... Seabra, M. C. (2007). Rab27b Regulates Mast Cell Granule Dynamics and Secretion. *Traffic*, 8(7), 883–892. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00571.x>
- Mohan, N., Sadeghi, K., Reiter, R. J., & Meltz, M. L. (1995). The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 37(6), 1063–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8747536>

- Morgan, P. J., Barrett, P., Howell, H. E., & Helliwell, R. (1994). Melatonin receptors: Localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochemistry International*, 24(2), 101–146. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)90100-7)
- Morrey, K. M., McLachlan, J. A., Serkin, C. D., & Bakouche, O. (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(6), 2671–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8077674>
- Müller, U., Jongeneel, C. V., Nedospasov, S. A., Lindahl, K. F., & Steinmetz, M. (1987). Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature*, 325(6101), 265–267. <https://doi.org/10.1038/325265a0>
- Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M., & Koeffler, H. P. (1986). Recombinant human TNF induces production of granulocyte–monocyte colony-stimulating factor. *Nature*, 323(6083), 79–81. <https://doi.org/10.1038/323079a0>
- Musshoff, U., Riewenherm, D., Berger, E., Fauteck, J.-D., & Speckmann, E.-J. (2002). Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus*, 12(2), 165–173. <https://doi.org/10.1002/hipo.1105>
- Muxel, S. M., Laranjeira-Silva, M. F., Carvalho-Sousa, C. E., Floeter-Winter, L. M., & Markus, R. P. (2016). The RelA/cRel nuclear factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Pineal Research*, 60(4), 394–404. <https://doi.org/10.1111/jpi.12321>
- Muxel, S. M., Pires-Lapa, M. A., Monteiro, A. W. A., Cecon, E., Tamura, E. K., Floeter-Winter, L. M., & Markus, R. P. (2012). NF- $\kappa$ B Drives the Synthesis of Melatonin in RAW 264.7 Macrophages by Inducing the Transcription of the Arylalkylamine-N-Acetyltransferase (AA-NAT) Gene. *PLoS ONE*, 7(12), e52010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052010>
- Naji, L., Carrillo-Vico, A., Guerrero, J. M., & Calvo, J. R. (2004). Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sciences*, 74(18), 2227–2236. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.08.046>
- Navajas, C., Kokkola, T., Poso, A., Honka, N., Gynther, J., & Laitinen, J. T. (1996). A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor. *European Journal of Pharmacology*, 304(1–3), 173–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8813600>
- Nelson, C. S., Marino, J. L., & Allen, C. N. (1996). Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport*, 7(3), 717–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8733729>
- Nielsen, D. A., Dean, M., & Goldman, D. (1992). Genetic mapping of the human tryptophan hydroxylase gene on chromosome 11, using an intronic conformational polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 51(6), 1366–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1463016>
- Nishida, K., Yamasaki, S., Ito, Y., Kabu, K., Hattori, K., Tezuka, T., ... Hirano, T. (2005). Fc $\epsilon$ RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, 170(1), 115–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.200501111>
- Nosjean, O., Nicolas, J. P., Klupsch, F., Delagrèze, P., Canet, E., & Boutin, J. A. (2001). Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. tissue distribution of MT3/QR2. *Biochemical Pharmacology*, 61, 1369–1379. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00615-3)
- Núñez Miguel, R., Wong, J., Westoll, J. F., Brooks, H. J., O'Neill, L. A. J., Gay, N. J., ... Monie, T. P.

- (2007). A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins. *PLoS ONE*, 2(8), e788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000788>
- O'Malley, K., & Moldawer, L. L. (2006). Interleukin-6: Still crazy after all these years. *Critical Care Medicine*, 34(10), 2690–2691. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000239424.59338.2F>
- O'Neill, L. A. J., & Dinarello, C. A. (2000). The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: Crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunology Today*, 21, 206–209. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01611-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01611-X)
- Olivotto, E., Otero, M., Marcu, K. B., & Goldring, M. B. (2015). Pathophysiology of osteoarthritis: canonical NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$ -dependent and kinase-independent effects of IKK $\alpha$  in cartilage degradation and chondrocyte differentiation. *RMD Open*, 1(Suppl 1), e000061. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2015-000061>
- Orinska, Z., Maurer, M., Mirghomizadeh, F., Bulanova, E., Metz, M., Nashkevich, N., ... Bulfone-Paus, S. (2007). IL-15 constrains mast cell-dependent antibacterial defenses by suppressing chymase activities. *Nature Medicine*, 13(8), 927–934. <https://doi.org/10.1038/nm1615>
- Ouyang, H., & Vogel, H. J. (1998). Melatonin and serotonin interactions with calmodulin: NMR, spectroscopic and biochemical studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1383(1), 37–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546044>
- Ozbek, E., Ilbey, Y. O., Ozbek, M., Simsek, A., Cekmen, M., & Somay, A. (2009). Melatonin Attenuates Unilateral Ureteral Obstruction-Induced Renal Injury by Reducing Oxidative Stress, iNOS, MAPK, and NF- $\kappa$ B Expression. *Journal of Endourology*, 23(7), 1165–1173. <https://doi.org/10.1089/end.2009.0035>
- Ozkanlar, S., Kara, A., Sengul, E., Simsek, N., Karadeniz, A., & Kurt, N. (2015). Melatonin Modulates the Immune System Response and Inflammation in Diabetic Rats Experimentally-Induced by Alloxan. *Hormone and Metabolic Research*, 48(2), 137–144. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1548937>
- Pang, S. F., Dubocovich, M. L., & Brown, G. M. (1993). Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research. *Biological Signals*, 2(4), 177–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8205160>
- Papanicolaou, D. A., Wilder, R. L., Manolagas, S. C., & Chrousos, G. P. (1998). The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine*, 128(2), 127–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9441573>
- Pardo, J., Wallich, R., Ebnet, K., Iden, S., Zentgraf, H., Martin, P., ... Simon, M. M. (2007). Granzyme B is expressed in mouse mast cells in vivo and in vitro and causes delayed cell death independent of perforin. *Cell Death & Differentiation*, 14(10), 1768–1779. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402183>
- Passante, E., & Frankish, N. (2009). The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflammation Research*, 58(11), 737–745. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0074-y>
- Patronoster, L., Radogna, F., Accorsi, A., Cristina Albertini, M., Gualandi, G., & Ghibelli, L. (2009). Melatonin as a modulator of apoptosis in B-lymphoma cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171(1), 345–9. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04910.x>
- Paul, P., Lahaye, C., Delagrangé, P., Nicolas, J.-P., Canet, E., & Boutin, J. A. (1999). Characterization of 2-[125 I]Iodomelatonin Binding Sites in Syrian Hamster Peripheral Organs.



<http://www.jpvet.org>

- Paumet, F., Le Mao, J., Martin, S., Galli, T., David, B., Blank, U., & Roa, M. (2000). Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 164(11), 5850–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10820264>
- Pedrosa, A. M. d. C., Weinlich, R., Mognol, G. P., Robbs, B. K., Viola, J. P. d. B., Campa, A., & Amarante-Mendes, G. P. (2010). Melatonin Protects CD4+ T Cells from Activation-Induced Cell Death by Blocking NFAT-Mediated CD95 Ligand Upregulation. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3487–3494. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902961>
- Pekala, P. H., Price, S. R., Horn, C. A., Hom, B. E., Moss, J., & Cerami, A. (1984). Model for cachexia in chronic disease: secretory products of endotoxin-stimulated macrophages induce a catabolic state in 3T3-L1 adipocytes. *Transactions of the Association of American Physicians*, 97, 251–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6100150>
- Peña, C., Rincon, J., Pedreanez, A., Viera, N., & Mosquera, J. (2007). Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *Journal of Pineal Research*, 43(3), 263–269. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00471.x>
- Perianayagam, M. C., Oxenkrug, G. F., & Jaber, B. L. (2005). Immune-Modulating Effects of Melatonin, N-Acetylserotonin, and N-Acetyldopamine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1053(1), 386–393. <https://doi.org/10.1196/annals.1344.033>
- Pickering, D. S., & Niles, L. P. (1990). Pharmacological characterization of melatonin binding sites in Syrian hamster hypothalamus. *European Journal of Pharmacology*, 175(1), 71–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2157597>
- Pioli, C., Caroleo, M. C., Nistico G, & Doria, G. (1993). Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *International Journal of Immunopharmacology*, 15(4), 463–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8365822>
- Pires-Lapa, M. A., Tamura, E. K., Salustiano, E. M. A., & Markus, R. P. (2013). Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *Journal of Pineal Research*, 55(3), 240–246. <https://doi.org/10.1111/jpi.12066>
- Platet, N., Cunat, S., Chalbos, D., Rochefort, H., & Garcia, M. (2000). Unliganded and Liganded Estrogen Receptors Protect against Cancer Invasion via Different Mechanisms. *Molecular Endocrinology*, 14(7), 999–1009. <https://doi.org/10.1210/mend.14.7.0492>
- Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Chen, L. D., Manchester, L. C., & Barlow-Walden, L. R. (1994). Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, 419–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7832450>
- Pontes, G. N., Cardoso, E. C., Carneiro-Sampaio, M. M. S., & Markus, R. P. (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *Journal of Pineal Research*, 41(2), 136–41. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00345.x>
- Pozo, D., Delgado, M., Fernandez-Santos, J. M., Calvo, J. R., Gomariz, R. P., Martin-Lacave, I., ... Guerrero, J. M. (1997). Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(6), 466–73.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9194527>
- Pozo, D., Garcia-Maurino, S., Guerrero, J. M., & Calvo, J. R. (2004). mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT1, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *Journal of Pineal Research*, 37(1), 48–54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00135.x>
- Prendergast, B. J., Cable, E. J., Patel, P. N., Pyter, L. M., Onishi, K. G., Stevenson, T. J., ... Bradley, S. P. (2013). Impaired leukocyte trafficking and skin inflammatory responses in hamsters lacking a functional circadian system. *Brain, Behavior, and Immunity*, 32, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.007>
- Puri, N., & Roche, P. A. (2008). Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2580–2585. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707854105>
- Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Siu, A. W., & Garcia, J. J. (2000). Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: protection by melatonin and related molecules. *Journal of Pineal Research*, 29(1), 54–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949541>
- Radogna, F., Cristofanon, S., Paternoster, L., D'Alessio, M., De Nicola, M., Cerella, C., ... Ghibelli, L. (2008). Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. *Journal of Pineal Research*, 44(3), 316–325. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00532.x>
- Radogna, F., Diederich, M., & Ghibelli, L. (2010). Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.041>
- Radogna, F., Paternoster, L., Albertini, M. C., Cerella, C., Accorsi, A., Bucchini, A., ... Ghibelli, L. (2007). Melatonin antagonizes apoptosis via receptor interaction in U937 monocytic cells. *Journal of Pineal Research*, 43(2), 154–162. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00455.x>
- Radogna, F., Paternoster, L., De Nicola, M., Cerella, C., Ammendola, S., Bedini, A., ... Ghibelli, L. (2009a). Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.05.012>
- Radogna, F., Sestili, P., Martinelli, C., Paolillo, M., Paternoster, L., Albertini, M. C., ... Ghibelli, L. (2009b). Lipoygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(2), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.05.011>
- Recchioni, R., Marcheselli, F., Moroni, F., Gáspár, R., Damjanovich, S., & Pieri, C. (1998). Melatonin Increases the Intensity of Respiratory Burst and Prevents L-Selectin Shedding in Human Neutrophils in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252(1), 20–24. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9582>
- Reiter, R. J. (1996). Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *European Journal of Endocrinology*, 134(4), 412–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640286>
- Reiter, R. J., Calvo, J. R., Karbownik, M., Qi, W., & Tan, D. X. (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 376–386. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05402.x>
- Reiter, R. J., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., & Tan, D.-X. (2012). Melatonin protection from

- chronic, low-level ionizing radiation. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 751(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2011.12.002>
- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., ... Acuña-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 1–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7776173>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Pilar Terron, M., Flores, L. J., & Koppisepi, S. (2007). Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Advances in Medical Sciences*, 52, 11–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18217386>
- Ren, D.-L., Ji, C., Wang, X.-B., Wang, H., & Hu, B. (2017). Endogenous melatonin promotes rhythmic recruitment of neutrophils toward an injury in zebrafish. *Scientific Reports*, 7(1), 4696. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05074-w>
- Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slangenaupt, S. A., & Gusella, J. F. (1995a). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), 8734–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568007>
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Cassone, V. M., Godson, C., & Kolakowski, L. F. (1995b). Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*, 15(5), 1003–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576645>
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 13(5), 1177–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7946354>
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Godson, C. (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 17(3), 100–2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8936344>
- Rich, R.R; Fleisher, T.A; Shearer, W. T. (2013). *Clinical Immunology principles and practices*. (4 ed.). Elsevier.
- Rivara, S., Lorenzi, S., Mor, M., Plazzi, P. V., Spadoni, G., Bedini, A., & Tarzia, G. (2005). Analysis of Structure–Activity Relationships for MT 2 Selective Antagonists by Melatonin MT 1 and MT 2 Receptor Models. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(12), 4049–4060. <https://doi.org/10.1021/jm048956y>
- Rodríguez, A. B., & Lea, R. W. (1994b). Effect of pinealectomy upon the nonspecific immune response of the ring-dove (*Streptopelia risoria*). *Journal of Pineal Research*, 16(3), 159–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7932039>
- Rodríguez, A. B., Marchena, J. M., Nogales, G., Durán, J., & Barriga, C. (1999). Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *Journal of Pineal Research*, 26(1), 35–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1999.tb00564.x>
- Rodríguez, A. B., Nogales, G., Ortega, E., & Barriga, C. (1998). Melatonin controls superoxide anion level: modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. *Journal of Pineal Research*, 24(1), 9–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9468113>
- Rodríguez, A. B., Ortega, E., Lea, R. W., & Barriga, C. (1997). Melatonin and the phagocytic process of heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 168(1–2), 185–190. <https://doi.org/10.1023/A:1006850518225>

- Rodríguez, A. B., Terrón, M. P., Durán, J., Ortega, E., & Barriga, C. (2001). Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *Journal of Pineal Research*, 31(1), 31–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11485002>
- Rodríguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36, 1–9.
- Rodríguez, I. R., Mazuruk, K., Schoen, T. J., & Chader, G. J. (1994a). Structural analysis of the human hydroxyindole-O-methyltransferase gene. Presence of two distinct promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31969–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989373>
- Roka, F., Brydon, L., Waldhoer, M., Strosberg, A. D., Freissmuth, M., Jockers, R., & Nanoff, C. (1999). Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Molecular Pharmacology*, 56(5), 1014–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531408>
- Romero, M. P., Osuna, C., García-Pergañeda, A., Carrillo-Vico, A., & Guerrero, J. M. (1999). The pineal secretory product melatonin reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in U-937 cells. *Journal of Pineal Research*, 26(4), 227–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340725>
- Rosales-Corral, S., Acuna-Castroviejo, D., Tan, D. X., López-Armas, G., Cruz-Ramos, J., Muñoz, R., ... Reiter, R. J. (2012). Accumulation of exogenous amyloid-beta peptide in hippocampal mitochondria causes their dysfunction: a protective role for melatonin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 843649. <https://doi.org/10.1155/2012/843649>
- Rossi, S. P., Windschuettl, S., Matzkin, M. E., Terradas, C., Ponzio, R., Puigdomenech, E., ... Frungieri, M. B. (2014). Melatonin in testes of infertile men: evidence for anti-proliferative and anti-oxidant effects on local macrophage and mast cell populations. *Andrology*, 2(3), 436–449. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00207.x>
- Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O., & Leppäluoto, J. (2005). The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sciences*, 76(10), 1123–1134. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.016>
- Sánchez-Hidalgo, M., Guerrero Montávez, J. M., Carrascosa-Salmoral, M. del P., Naranjo Gutierrez, M. del C., Lardone, P. J., & de la Lastra Romero, C. A. (2009). Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 29–35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00604.x>
- Sander, L. E., Frank, S. P. C., Bolat, S., Blank, U., Galli, T., Bigalke, H., ... Lorentz, A. (2008). Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *European Journal of Immunology*, 38(3), 855–863. <https://doi.org/10.1002/eji.200737634>
- Schaefer, M., & Hardeland, R. (2009). The melatonin metabolite N 1 -acetyl-5-methoxykynuramine is a potent singlet oxygen scavenger. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 49–52. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00614.x>
- Schechter, N. M., Irani, A. M., Sprows, J. L., Abernethy, J., Wintroub, B., & Schwartz, L. B. (1990). Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 145(8), 2652–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2212656>
- Scheller, J., Grötzinger, J., & Rose-John, S. (2006). Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling.

- Signal Transduction, 6(4), 240–259. <https://doi.org/10.1002/sita.200600086>
- Seljelid, R., & Eskeland, T. (1993). The biology of macrophages: I. General principles and properties. *European Journal of Haematology*, 51(5), 267–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8282087>
- Şener, G., Tuğtepe, H., Velioglu-Oğunc, A., Cetinel, Ş., Gedik, N., & Yeğen, B. C. (2006). Melatonin prevents neutrophil-mediated oxidative injury in Escherichia coli-induced pyelonephritis in rats. *Journal of Pineal Research*, 41(3), 220–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00357.x>
- Serin, M., Gülbaş, H., Gürses, I., Erkal, H. S., & Yücel, N. (2007). The histopathological evaluation of the effectiveness of melatonin as a protectant against acute lung injury induced by radiation therapy in a rat model. *International Journal of Radiation Biology*, 83(3), 187–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17378527>
- Sewerynek, E., Reiter, R. J., Melchiorri, D., Ortiz, G. G., & Lewinski, A. (1996). Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepato-Gastroenterology*, 43(10), 898–905. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884311>
- Seyfizadeh, N., Seyfizadeh, N., Gharibi, T., & Babaloo, Z. (2015). Interleukin-13 as an important cytokine: A review on its roles in some human diseases. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62(4), 341–378. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.4.2>
- Shafer, L. L., McNulty, J. A., & Young, M. R. (2001). Assessment of melatonin's ability to regulate cytokine production by macrophage and microglia cell types. *Journal of Neuroimmunology*, 120(1–2), 84–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694323>
- Shalaby, M. R., Aggarwal, B. B., Rinderknecht, E., Svedersky, L. P., Finkle, B. S., & Palladino, M. A. (1985). Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 135(3), 2069–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3926894>
- Shalpour, S., & Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3347–55. <https://doi.org/10.1172/JCI80007>
- Shang, Y., Xu, S.-P., Wu, Y., Jiang, Y.-X., Wu, Z.-Y., Yuan, S.-Y., & Yao, S.-L. (2009). Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chinese Medical Journal*, 122(12), 1388–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567158>
- Shida, C. S., Castrucci, A. M., & Lamy-Freund, M. T. (1994). High melatonin solubility in aqueous medium. *Journal of Pineal Research*, 16(4), 198–201. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7807375>
- Shin, S., Hur, G. H., Kim, Y. B., Yeon, G. B., Park, K. J., Park, Y. M., & Lee, W. S. (2000). Dehydroepiandrosterone and melatonin prevent Bacillus anthracis lethal toxin-induced TNF production in macrophages. *Cell Biology and Toxicology*, 16(3), 165–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032360>
- Shiu, S. Y. W., Pang, B., Tam, C. W., & Yao, K.-M. (2010). Signal transduction of receptor-mediated antiproliferative action of melatonin on human prostate epithelial cells involves dual activation of G $\alpha$ (s) and G $\alpha$ (q) proteins. *Journal of Pineal Research*, 49(3), 301–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00795.x>
- Silva, S. de O., Carvalho, S. R. Q., Ximenes, V. F., Okada, S. S., & Campa, A. (2006). Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. *Microbes and Infection*, 8(2), 420–425. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2005.07.004>

- Silva, S. O., Rodrigues, M. R., Ximenes, V. F., Bueno-da-Silva, A. E. B., Amarante-Mendes, G. P., & Campa, A. (2004). Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *Journal of Neuroimmunology*, 156(1–2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.07.015>
- Silver, R. B., Reid, A. C., Mackins, C. J., Askwith, T., Schaefer, U., Herzlinger, D., & Levi, R. (2004). Mast cells: a unique source of renin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37), 13607–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403208101>
- Simonneaux, V., & Ribelayga, C. (2003). Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacological Reviews*, 55(2), 325–395. <https://doi.org/10.1124/pr.55.2.2>
- Sitaram, B. R., & Lees, G. J. (1978). Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *Journal of Neurochemistry*, 31(4), 1021–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1978.tb00142.x>
- Slominski, A., Pisarchik, A., & Wortsman, J. (2004). Expression of genes coding melatonin and serotonin receptors in rodent skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1680(2), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.09.002>
- Smith, J. A., O'Hara, J., & Schiff, A. A. (1981). Altered diurnal serum melatonin rhythm in blind men. *Lancet (London, England)*, 2(8252), 933. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6117710>
- Soares, J. M., Masana, M. I., Erşahin, C., & Dubocovich, M. L. (2003). Functional Melatonin Receptors in Rat Ovaries at Various Stages of the Estrous Cycle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), 694–702. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.049916>
- Song, Y., Tam, P. C., Poon, A. M., Brown, G. M., & Pang, S. F. (1995). 2-[125I]iodomelatonin-binding sites in the human kidney and the effect of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(5), 1560–1565. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.5.7745000>
- Spies, T., Morton, C. C., Nedospasov, S. A., Fiers, W., Pious, D., & Strominger, J. L. (1986). Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(22), 8699–702. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3464978>
- Srinivasan, V., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., & Cardinali, D. P. (2008). Therapeutic Actions of Melatonin in Cancer: Possible Mechanisms. *Integrative Cancer Therapies*, 7(3), 189–203. <https://doi.org/10.1177/1534735408322846>
- Stefulj, J., Hörtner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wölfler, A., ... Liebmann, P. M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *Journal of Pineal Research*, 30(4), 243–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11339514>
- Stehle, J. H., Saade, A., Rawashdeh, O., Ackermann, K., Jilg, A., Sebestény, T., & Maronde, E. (2011). A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *Journal of Pineal Research*, 51(1), 17–43. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00856.x>
- Stoll, J., Kozak, C. A., & Goldman, D. (1990). Characterization and chromosomal mapping of a cDNA encoding tryptophan hydroxylase from a mouse mastocytoma cell line. *Genomics*, 7(1), 88–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2110547>
- Szmuszkovicz, J., Anthony, W., & Heinzelman, R. (1960). Notes- Synthesis of

- N-Acetyl-5-methoxytryptamine. *The Journal of Organic Chemistry*, 25(5), 857–859.  
<https://doi.org/10.1021/jo01075a623>
- Tadokoro, S., Nakanishi, M., & Hirashima, N. (2005). Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the fusion process. *Journal of Cell Science*, 118(10), 2239–2246. <https://doi.org/10.1242/jcs.02338>
- Taga, T., & Kishimoto, T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(15), 3387–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334470>
- Tan, D.-X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W.-B., Karbownik, M., & Calvo, J. R. (2000). Significance of Melatonin in Antioxidative Defense System: Reactions and Products. *Neurosignals*, 9(3–4), 137–159. <https://doi.org/10.1159/000014635>
- Tan, D., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W., Hanes, M. A., & Farley, N. J. (1999). High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sciences*, 65(23), 2523–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10622237>
- Tan, D., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R. M., ... Hardeland, R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2), 181–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11899100>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (2007). One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>
- Terrón, M. P., Paredes, S. D., Barriga, C., Ortega, E., & Rodríguez, A. (2004). Comparative study of the heterophil phagocytic function in young and old ring doves (*Streptopelia risoria*) and its relationship with melatonin levels. *Journal of Comparative Physiology B*, 174(5). <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0429-1>
- Tian, Y.-M., Zhang, G.-Y., & Dai, Y.-R. (2003). Melatonin rejuvenates degenerated thymus and redresses peripheral immune functions in aged mice. *Immunology Letters*, 88(2), 101–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880677>
- Ting, K. N., Blaylock, N. A., Sugden, D., Delagrangé, P., Scalbert, E., & Wilson, V. G. (1999). Molecular and pharmacological evidence for MT 1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats. *British Journal of Pharmacology*, 127(4), 987–995. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702612>
- Tiwari, N., Wang, C.-C., Brochetta, C., Ke, G., Vita, F., Qi, Z., ... Blank, U. (2008). VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood*, 111(7), 3665–3674. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-103309>
- Tkaczyk, C., Iwaki, S., Metcalfe, D. D., & Gilfillan, A. M. (2005). Roles of Adaptor Molecules in Mast Cell Activation. In *Mast Cells in Allergic Diseases* (Vol. 87, pp. 43–58). Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000087570>
- Tomas-Zapico, C., Antonio Boga, J., Caballero, B., Vega-Naredo, I., Sierra, V., Alvarez-Garcia, O., ... Coto-Montes, A. (2005). Coexpression of MT1 and ROR $\alpha$ 1 melatonin receptors in the Syrian hamster Harderian gland. *Journal of Pineal Research*, 39(1), 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00210.x>
- Torti, F. M., Dieckmann, B., Beutler, B., Cerami, A., & Ringold, G. M. (1985). A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. *Science (New York, N.Y.)*,

- 229(4716), 867–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3839597>
- Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., & Asadullah, K. (2003). Cytokine and anticytokine therapy in dermatology. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(5), 733–743. <https://doi.org/10.1517/14712598.3.5.733>
- Tsuboi, S., Kotani, Y., Ogawa, K., Hatanaka, T., Yatsushiro, S., Otsuka, M., & Moriyama, Y. (2002). An Intramolecular Disulfide Bridge as a Catalytic Switch for Serotonin N -Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44229–44235. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203305200>
- Ugucconi, M., Teixeira, M. M., Locati, M., & Mantovani, A. (2017). Editorial: Regulation of inflammation, its resolution and therapeutic targeting. *Frontiers in Immunology*, 8(APR), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00415>
- Varricchi, G., Galdiero, M. R., Loffredo, S., Marone, G., Iannone, R., Marone, G., & Granata, F. (2017). Are mast cells MASTers in cancer? *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00424>
- Veneroso, C., Tuñón, M. J., González-Gallego, J., & Collado, P. S. (2009). Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *Journal of Pineal Research*, 47, 184–191. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00699.x>
- Vetting, M. W., S. de Carvalho, L. P., Yu, M., Hegde, S. S., Magnet, S., Roderick, S. L., & Blanchard, J. S. (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.003>
- Villela, D., de Sá Lima, L., Peres, R., Peliciari-Garcia, R. A., do Amaral, F. G., Cipolla-Neto, J., ... Afeche, S. C. (2014). Norepinephrine activates NF- $\kappa$ B transcription factor in cultured rat pineal gland. *Life Sciences*, 94(2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.004>
- Voisin, P., Namboodiri, M. A., & Klein, D. C. (1984). Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(17), 10913–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6469990>
- Walther, D. J., & Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*, 66(9), 1673–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563478>
- Walther, D. J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., & Bader, M. (2003). Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science*, 299(5603), 76–76. <https://doi.org/10.1126/science.1078197>
- Wang, X., Lupardus, P., LaPorte, S. L., & Garcia, K. C. (2009). Structural Biology of Shared Cytokine Receptors. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 29–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090616>
- Wang, Y., Chen, S., & Xu, S. (2004). Effect of melatonin on the expression of nuclear factor-kappa B and airway inflammation in asthmatic rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Pediatrics*, 42(2), 94–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059481>
- Weaver, D. R., Stehle, J. H., Stopa, E. G., & Reppert, S. M. (1993). Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 76(2), 295–301. <https://doi.org/10.1210/jcem.76.2.8381796>
- Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, 14, 478–494. <https://doi.org/10.1038/nri3690>
- Williams, J. G., Bernstein, S., & Prager, M. (1998). Effect of melatonin on activated macrophage TNF, IL-6, and reactive oxygen intermediates. *Shock (Augusta, Ga.)*, 9(6), 406–11.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645491>

- Wingfield, P., Pain, R. H., & Craig, S. (1987). Tumour necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Letters*, 211(2), 179–184. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81432-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81432-1)
- Witt-Enderby, P. A., MacKenzie, R. S., McKeon, R. M., Carroll, E. A., Bordt, S. L., & Melan, M. A. (2000). Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 46(1), 28–42. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(200005\)46:1<28::AID-CM4>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(200005)46:1<28::AID-CM4>3.0.CO;2-5)
- Wu, J.-Y., Tsou, M.-Y., Chen, T.-H., Chen, S.-J., Tsao, C.-M., & Wu, C.-C. (2008). Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Journal of Pineal Research*, 45(1), 106–116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00567.x>
- Wurtman, R. J., Shein, H. M., & Larin, F. (1971). Mediation by  $\beta$ -adrenergic receptors of effect of norepinephrine on pineal synthesis of [ 14 C]serotonin and [ 14 C]melatonin. *Journal of Neurochemistry*, 18(9), 1683–1687. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb03741.x>
- Xia, M.-Z., Liang, Y.-L., Wang, H., Chen, X., Huang, Y.-Y., Zhang, Z.-H., ... Song, L.-H. (2012). Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Journal of Pineal Research*, 53(4), 325–334. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01002.x>
- Xu, G.-Y. et al. 1997. ‘Solution structure of recombinant human interleukin-6. *Journal of Molecular Biology*, 268(2), pp. 468–481. doi: 10.1006/jmbi.1997.0933.
- Yau, M. Y. C., Pang, C. S., Kravtsov, G., Pang, S. F., & Shiu, S. Y. W. (2002). 2[125I]Iodomelatonin binding sites in guinea pig platelets. *Journal of Pineal Research*, 32(2), 97–105. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2002.1822.x>
- Yi, W.-J., & Kim, T. S. (2017). Melatonin protects mice against stress-induced inflammation through enhancement of M2 macrophage polarization. *International Immunopharmacology*, 48, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.05.006>
- Yie, S. M., Niles, L. P., & Younglai, E. V. (1995). Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(5), 1747–1749. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.5.7745030>
- Zentella, A., Manogue, K., & Cerami, A. (1993). Cachectin/TNF-mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. *Cytokine*, 5(5), 436–47. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(93\)90033-2](https://doi.org/10.1016/1043-4666(93)90033-2)
- Zhang, D., Mi, M., Jiang, F., Sun, Y., Li, Y., Yang, L., ... Mei, Q. (2015). Apple Polysaccharide Reduces Nf-Kb Mediated Colitis-Associated Colon Carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 67(1), 177–190. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.965336>
- Zhang, H., Squadrito, G. L., Uppu, R., & Pryor, W. A. (1999). Reaction of Peroxynitrite with Melatonin: A Mechanistic Study. *Chemical Research in Toxicology*, 12(6), 526–534. <https://doi.org/10.1021/tx980243t>
- Zhang, S., Li, W., Gao, Q., & Wei, T. (2004). Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 501(1–3), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.08.015>
- Zucali, J. R., Broxmeyer, H. E., Gross, M. A., & Dinarello, C. A. (1988). Recombinant human tumor necrosis factors alpha and beta stimulate fibroblasts to produce hemopoietic growth factors in vitro. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(3), 840–4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3276782>

# ***ANEXO***

## 8.-ANEXO: TRABAJOS PREVIOS A ESTA TESIS DOCTORAL

### 8.1-Comunicaciones a congresos

- 1.- **Autores:** MD Maldonado, M Manfredi, J Ribas-Serna, H García-Moreno, JR Calvo.  
**Título:** “Immune and Biochemists Effects of Melatonin in the Acute Sport Training”.  
**Tipo de participación:** Comunicación en formato póster.  
**Congreso Nacional:** XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.  
**Publicación:** Libro de Actas.  
**Lugar de celebración:** Barcelona Palacio de Congresos.  
**Año:** 5- 8 de Septiembre de 2011.
  
- 2.- **Autores:** H García-Moreno, JR Calvo, MD Maldonado.  
**Título:** “Study brewing process in which this is loaded of melatonin”.  
**Tipo de participación:** Comunicación en formato póster. N° P08-43.  
**Congreso Internacional y Nacional:** XXII Congreso de la IUBMB. XXXVII Congreso de la FEBS (From Single Molecules to Systems Biology).  
**Publicación:** Libro de Actas.  
**Lugar de celebración:** Sevilla Palacio de Congresos.  
**Año:** 4 - 9 de Septiembre de 2012.
  
- 3.- **Autores:** H García-Moreno, C. González-Yanes, J.R. Calvo, M.C. Naranjo and MD Maldonado.  
**Título:** “Melatonin reverses the harmful effects of chemical stimulus on mast cells. Therapeutic implications”.  
**Tipo de participación:** Comunicación en formato póster. N° P08-97.  
**Congreso Internacional y Nacional:** XXII Congreso de la IUBMB. XXXVII Congreso de la FEBS (From Single Molecules to Systems Biology).  
**Publicación:** Libro de Actas.  
**Lugar de celebración:** Sevilla Palacio de Congresos.  
**Año:** 4 - 9 de Septiembre de 2012.

## 8.2-Artículos

1. Maldonado, MD., Manfredi, M., Ribas-Serna, J., **García-Moreno, H.**, Calvo, J.R. Melatonin administrated immediately before an intense exercise reverses oxidative stress, improves immunological defences and lipid metabolism in football players. **Physiology & Behavior**. **2012**; 105(5): 1099-1103. ISSN: 0031-9384. DOI:10.1016/j.physbeh.2011.12.015. **Indicios de calidad:** Esta revista alcanza un **factor de impacto de 3.160** en el año de su publicación (2012). ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: posición 30/341 Q1, en el área de Neuroscience & Behavioral. 5/14 Q2, en el área de Psychology Biological.
2. **García-Moreno, H.**, Calvo, J.R., Maldonado, MD. Study brewing process in which this is loaded of melatonin. **FEBS Journal**. **2012**; 279 (S1-204): 52-576. **Indicios de calidad:** Esta revista alcanza un **factor de impacto de 4.250** en el año de su publicación (2012). ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: posición 49/393 Q1, en el área de Biology & Biochemistry. 74/290 Q2, en el área de Biochemistry & Molecular Biology.
3. **García-Moreno, H.**, González-Yáñez, C., Calvo, J.R., Naranjo M.C., Maldonado M.D. Melatonin reverses the harmful effects of the chemical stimulus on mast cells. Therapeutic implications. **FEBS Journal**. **2012**; 279 (S1-221): 52- 576. **Indicios de calidad:** Esta revista alcanza un **factor de impacto de 4.250** en el año de su publicación (2012). ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: posición 49/393 Q1, en el área de Biology & Biochemistry. 74/290 Q2, en el área de Biochemistry & Molecular Biology.
4. **García-Moreno, H.**, Calvo, J.R, and Maldonado, M.D. High levels of melatonin generated during the brewing process. *Journal of Pineal Research* 2013; 55(1): 26-30. **Indicios de calidad:** Esta revista alcanza un **factor de impacto de 7,812** en el año de su publicación (2013). ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: posición 3/81 Q1, en el área de Physiology; 8/124 Q1, en Endocrinology & Metabolism; 14/256 Q1, en Neurosciences.
5. Maldonado, M.D, **García-Moreno, H.**, and Calvo, J.R. Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: possible clinical use. **Journal of Neuroimmunology** **2013**; 262; 62-65. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2013.06.013. **Indicios de calidad:** Esta revista alcanza un **factor de impacto de 2,786** en el año de su publicación (2013). ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: posición 60/339 Q1, en el área de Neuroscience & Behavior. 70/144, en el área de Immunology. 137/252 Q3, en el área de Neurosciences.
6. Maldonado, M.D., **García-Moreno, H.**, González-Yanes, C., and Calvo, J.R.

Possible involvement of the inhibition of NF- $\kappa$ B factor in anti-inflammatory actions that melatonin exerts on mast cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2016; 117: 1926-1933. **Indicios de calidad:** Esta revista alcanza un **factor de impacto de 3.446** en el año de su publicación (2016). ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: Posición 43/293 Q1, en el área Molecular Biology & Genetics. 101/289 Q2, en el área de Biochemistry & Molecular Biology. 86/187 Q2, en el área de Cell Biology.

# ***NOTAS***







